

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 702**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04770716 .1**
96 Fecha de presentación: **27.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1668137**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **POTENCIACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE POLIPÉPTIDOS HETERÓLOGOS EN SEMILLAS DE PLANTAS A TRAVÉS DE SUPRESIÓN DIRIGIDA DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO ENDÓGENAS.**

30 Prioridad:
27.08.2003 IS 693103
27.08.2003 US 497923 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
ORF Liftaekni HF.
Vikurhvarf 3
203 Kopavogur, IS

72 Inventor/es:
ORVAR, Bjorn, Larus

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 375 702 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

Potenciación de la acumulación de polipéptidos heterólogos en semillas de plantas a través de supresión dirigida de proteínas de almacenamiento endógenas

5

Campo de la invención

La presente invención está en el campo de la biología molecular vegetal y se refiere específicamente a los métodos para aumentar la expresión de proteínas heterólogas en semillas de plantas suprimiendo la competencia de expresión endógena de las proteínas de almacenamiento de semillas en el endospermo de plantas monocotiledóneas.

10

Antecedentes

Muchas plantas expresan y almacenan en el endospermo de semillas en desarrollo una gran reserva de proteínas que sirven para diferentes funciones, tales como diferentes tipos de proteínas de almacenamiento, enzimas metabólicas, endoquitinasas, inhibidores de síntesis de proteínas, inhibidores de proteasa, amilasas, lectinas y peroxidasas. Las proteínas de almacenamiento en el endospermo pueden ascender a más del 15% en peso seco de semilla, tal como es común en muchas especies de cultivos monocotiledóneos. Por consiguiente, en determinado estadio de desarrollo, la maquinaria celular en el endospermo de la semilla está ocupada principalmente con la producción y el almacenamiento de estas proteínas particulares. Además, la mayoría de los genes de proteína de almacenamiento se encuentran en múltiples copias, reflejando la importancia de la rápida acumulación de estas proteínas, en el intervalo de unos días a unas semanas.

20

La capacidad biológica inherente para la acumulación de proteínas en el endospermo en desarrollo de semillas de cultivo significa que muchas plantas de cultivo, especialmente monocotiledóneas, tienen el potencial para ser un vehículo eficiente y práctico para la producción a gran escala de proteínas recombinantes heterólogas, por ejemplo polipéptidos de alto valor para la industria farmacéutica; un procedimiento de fabricación a menudo denominado agricultura molecular. Además, el almacenamiento de polipéptidos heterólogos en semillas reduce el coste de procesamiento posterior puesto que estas semillas pueden almacenarse durante años sin afectar a la calidad del polipéptido heterólogo. La expresión de tales proteínas está, preferiblemente, bajo el control de promotores específicos de endospermo o específicos de semilla.

25

30

Se utilizan estrategias de biología molecular generales, tales como la selección de promotores apropiados y la localización subcelular, cuando se mejoran los niveles de expresión de la proteína heteróloga en la planta particular usada para agricultura molecular, aunque el nivel de expresión también se ve afectado de manera crítica por la naturaleza de la proteína que va a expresarse, su complejidad y función. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de la proteína heteróloga (porcentaje bajo de proteína soluble total o %TSP) han sido una preocupación particular, incluso cuando se expresa en semillas. Se requiere un enfoque biotecnológico novedoso para potenciar adicionalmente el nivel de expresión. Esto es un reto considerable, especialmente puesto que el mecanismo celular ya está programado para su papel endógeno que, en semillas en desarrollo, está ocupado preferiblemente con la acumulación de proteínas de almacenamiento y la preparación general para la supervivencia dependiente de la latencia. Los promotores lo más frecuentemente usados para dirigir la expresión del gen heterólogo de interés en el endospermo o en semillas de plantas monocotiledóneas son, en buena parte, promotores de genes de proteína de almacenamiento, tales como el GluB-1, un promotor específico de endospermo del arroz de 1,3 kb (Patel *et al.* 2000; número de registro de GeneBank X54314), o el promotor de D-hordeína de la cebada de 0,45 kb (Sørensen *et al.* 1996; número de registro de GeneBank X84368). Aunque estos promotores son fuertes para dirigir la expresión de proteínas heterólogas de interés, su actividad en tiempo y espacio coinciden con la actividad de promotores endógenos que dirigen las proteínas de almacenamiento más abundantes, provocando la competencia por recursos limitados, tales como aminoácidos, sitios de unión ribosómicos y el conjunto de enzimas que participan en la traducción y el procesamiento postraduccional. Esta competencia afecta negativamente a los niveles de expresión del polipéptido heterólogo de interés.

35

40

45

50

Sería sumamente deseable tener un método para suprimir la expresión de genes endógenos, tales como muchos de los genes de proteína de almacenamiento endógenos que están compitiendo activamente por recursos, en tiempo y espacio, con la expresión de la proteína heteróloga de interés. Por tanto, la supresión de proteínas de almacenamiento podría tener diversas necesidades industriales si pudiera proporcionarse un método práctico de supresión. Esto puede ser un reto de magnitud considerable en la agricultura molecular, especialmente si el gen endógeno es un miembro de una familia de múltiples genes. En la cebada, por ejemplo, el sumidero principal para recursos en el endospermo son las proteínas de almacenamiento de B-hordeína que pueden representar hasta el 50% de las proteínas del endospermo totales (Shewry 1993: en Barley; Chemistry and Technology).

55

60

El término "sumidero" y las expresiones "genes sumidero" ("*sink genes*") y "proteínas sumidero" ("*sink proteins*") se refieren en el presente documento a genes y productos génicos que se expresan activamente y absorben una cantidad sustancial de recursos disponibles en la célula, es decir, un sumidero "drena" de una célula una parte sustancial de sus recursos, y por tanto limita los recursos disponibles para la expresión de otros genes y productos

65

génicos.

La tecnología antisentido está surgiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de productos génicos endógenos específicos en células vegetales (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.759.829; Örvar *et al.* 1997; Coles *et al.* 1999). Sin embargo, esta tecnología no es un enfoque práctico para suprimir directamente la expresión de genes que son miembros de una familia de genes, que es frecuentemente el caso con las proteínas de almacenamiento de semillas, tales como los genes de B-hordeína que son al menos 20 por genoma haploide (Shewry *et al.* 1985); la tecnología se adecua mejor a manipular la expresión de genes que no pertenecen a una familia de genes.

Otros método para reducir la expresión de genes endógenos es la aplicación de ARN bicatenario (ARNbc) para el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). Este silenciamiento génico inducido por ARN o interferencia por ARN, en el que tanto la hebra de ARN sentido como su hebra antisentido complementaria de un gen endógeno particular se combinan en un ARNbc, se mostró por primera vez en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998). Hamilton *et al.* (1999) indicaron que los ARN con pocos nucleótidos (21-23 nucleótidos de longitud) son productos de degradación del ARNbc que regulan la escisión del ARNm diana endógeno en PTGS en plantas. Un enfoque más potente de silenciamiento génico bicatenario en plantas ha sido el método descrito por Wesley *et al.* (2001) en el que un gen de silenciamiento génico se construye de tal manera que forma un ARN de "bucle en horquilla" (ARNhp) tras la transcripción. Una forma del silenciamiento génico por ARNhp es el ARNhp sometido a corte y empalme de intrón (ARNihp) en el que el espaciador en el bucle en horquilla es un intrón. El ihpARN puede producir un PTGS muy fuerte en plantas (véase también Waterhouse *et al.* 2001 y Smith *et al.* 2000). Métodos para producir tales constructos de PTGS en un vector especial se describen en la solicitud de patente estadounidense 2003-A-0049835.

El documento EP 1312672 da a conocer una célula vegetal transformada que carece de proteína de almacenamiento de semillas endógena en la que se ha introducido un gen foráneo mediante fertilización cruzada. La descripción hace uso de mutantes que son defectuosos y por tanto no expresan una proteína de almacenamiento de semillas importante, y sugiere, como alternativa a tales mutantes, generar plantas con un nivel reducido de proteína de almacenamiento de semillas mediante supresión conjunta o el método antisentido, es decir posibilitar que se reduzca la supresión directa del gen que codifica para la proteína de almacenamiento.

El documento EP 1327685 da a conocer la identificación y provisión de un factor de transcripción RISBZ1 en arroz, y el uso de dicho factor de transcripción para potenciar la expresión de proteínas de almacenamiento de semillas o una proteína foránea recombinante deseada codificada por un gen foráneo introducido en una célula vegetal transformada, en el sentido de 3' de un promotor que contiene la secuencia diana de RISBZ1.

Existe una necesidad de nuevos métodos para mejorar la expresión de genes heterólogos en agricultura molecular y especialmente en plantas monocotiledóneas tales como la cebada. La capacidad de reducir la competencia en la expresión entre genes heterólogos de interés y genes "sumidero" endógenos con el fin de aumentar la expresión de proteínas de interés farmacéutico en agricultura molecular, aún no se ha conseguido en la técnica. La técnica anterior tampoco ha demostrado cómo el silenciamiento génico dirigido, usando por ejemplo PTGS inducido por ARNhp, puede, de hecho, aumentar los niveles de expresión de genes heterólogos de interés en la agricultura molecular.

Sumario y objetos de la invención

El objetivo principal de la presente invención se resume en proporcionar métodos y constructos de ácido nucleico para niveles crecientes de acumulación de polipéptidos heterólogos de interés en semillas transgénicas usadas como vehículo de producción en agricultura molecular. Un enfoque principal es limitar la competencia por los recursos de la traducción de proteínas de ARNm no deseado endógeno que codifica para proteínas de almacenamiento específicas de endospermo en plantas monocotiledóneas a favor de la expresión del polipéptido heterólogo de interés producido de manera recombinante en el endospermo mencionado anteriormente.

Los métodos anteriores para suprimir la expresión de genes que son miembros de una familia de genes consisten en seleccionar como diana un miembro individual o regiones homogéneas dentro de la secuencia codificante de los miembros de la familia de genes que son característicos de todos ellos. Un objetivo de la presente invención es evitar las desventajas de estos métodos descritos anteriormente, atenuando la expresión de la familia de genes suprimiendo la expresión de reguladores de la transcripción de genes individuales que de una forma coordinada organizan la regulación de la expresión de una pluralidad de miembros de la familia de genes mencionada anteriormente.

Otro objetivo de la presente invención es usar el PTGS inducido por ARNhp de reguladores de la transcripción para suprimir la expresión de proteínas de almacenamiento importantes en el endospermo de plantas monocotiledóneas, y, de ese modo, evitar usar la denominada tecnología antisentido que es más convencional en la técnica, o la denominada supresión conjunta, con el mismo fin.

Si pudiera lograrse el PTGS inducido por ARNhp de reguladores de la transcripción de genes de proteína de

almacenamiento importantes, tales como las hordeínas en cebada, sin afectar a los niveles de expresión de los reguladores de la transcripción del promotor particular que dirige el transgén que codifica para la proteína heteróloga de interés, se reduciría la competencia por recursos limitados para la traducción a favor del ARNm que codifica para la proteína heteróloga de interés, conduciendo a un aumento de acumulación de la proteína heteróloga particular de interés.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para suprimir la expresión de reguladores de la transcripción de genes de proteína de almacenamiento importantes, y, por tanto, reducir los niveles de expresión de dichos genes de proteína de almacenamiento, sin afectar a la actividad del promotor particular que dirige la expresión del transgén de interés, codificando para la proteína heteróloga que está produciéndose en la planta.

Un primer aspecto de la invención proporciona un método para potenciar la expresión y acumulación de un polipéptido heterólogo de interés en semillas de plantas, comprendiendo dicho método:

(a) transformar una célula vegetal con una secuencia de ADN para un promotor específico de semilla operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para uno o más reguladores de la transcripción (TF), o parte(s) de los mismos, que incluyen una combinación quimérica de diferente(s) TF, regular la transcripción de uno o más genes endógenos que codifican para proteínas de almacenamiento de semillas, en el que la hebra transcrita de dicha secuencia de ADN de TF puede formar un ARN "horquilla" que puede suprimir, retardar o reducir de otra forma la expresión de una o más de dichas proteínas de almacenamiento de semillas en dicha célula vegetal, y

(b) seleccionar un promotor específico de semilla que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por los reguladores de la transcripción descritos anteriormente en (a), y

(c) transformar la misma u otra célula vegetal descrita en (a) con una secuencia de ADN para un promotor descrito en (b) operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido heterólogo de interés;

(d) regenerar una planta a partir de dicha(s) célula(s) huésped vegetal(es) transformada(s), y hacer crecer dicha planta en condiciones en las que dicha(s) secuencia(s) de ADN que codifican para uno o más TF, o parte(s) de los mismos, se transcribe, reduciendo de ese modo la expresión de dicho ARNm endógeno, reduciendo así la expresión de dichas proteínas de almacenamiento de semillas, y potenciando así la expresión y acumulación de dicho polipéptido heterólogo de interés.

En una realización útil, la(s) secuencia(s) de ADN de la etapa (a) y la secuencia de ADN de la etapa (c) se introducen en la misma célula vegetal. En tales realizaciones, la secuencia puede estar operativamente unida en una secuencia de ADN.

Sin embargo, en otras realizaciones interesantes, la(s) secuencia(s) de ADN de la etapa (a) se introduce(n) en el genoma de una primera célula huésped vegetal, y dicha secuencia de ADN de la etapa (c) se introduce en el genoma de una segunda célula huésped vegetal. Entonces, una primera planta transgénica se regenera a partir de dicha primera célula huésped vegetal y una segunda planta transgénica se genera a partir de dicha segunda célula huésped vegetal, y una población de la progenie de plantas transgénicas se genera a partir del cruzamiento sexual entre dicha primera y dicha segunda planta transgénica, teniendo las plantas de la población de la progenie células que comprenden tanto la(s) secuencia(s) de ADN que codifica(n) para dicho uno o más TF, como las secuencias de ADN que codifican para la proteína heteróloga de interés, de modo que las plantas pueden expresar y acumular dicha proteína heteróloga. En realizaciones preferidas, la proteína de almacenamiento de semillas suprimida es una hordeína de cebada, por ejemplo, una o ambas de B-hordeína y C-hordeína.

La secuencia de ADN que codifica para el polipéptido heterólogo de interés puede ser una secuencia de ADN que codifica para una proteína procariota o eucariota, que puede acumularse en una célula vegetal según la invención. Ejemplos de proteínas que pueden seleccionarse para la producción según la presente invención son colágenos, colagenasa, polipéptidos de secuencia homeótica, anticuerpos monoclonales, anticuerpos secretados, anticuerpos de cadena sencilla, lectina de unión a manosa, pepsina, quimiotripsina, tripsina, caseína, hormona de crecimiento humana, albúmina sérica humana, insulina humana, lactoferrina, lisozimas, celulasas, pectinasas, hemicelulasas, fitasas, hidrolasas, peroxidasas, fibrinógeno, factor IX, factor XIII, trombina, proteína C, xilanasas, isoamilasa, glucoamilasa, amilasas, lisozima, beta-glucanasa, glucocerebrosidasa, caseínas, lactasa, ureasa, glucosa isomerasa, invertasa, estreptavidina, esterasas, fosfatasa alcalina, inhibidores de proteasa, proteasas, papaína, cinasas, fosfatasa, desoxirribonucleasas, ribonucleasas, fosfolipasas, lipasas, lacasa, proteínas de seda de araña, proteínas anticongelantes, defensinas o péptidos antimicrobianos, factores de crecimiento y citocininas.

En algunas realizaciones, dicha secuencia de ADN codifica para una proteína deseada de un organismo termófilo, tal como por ejemplo una molécula de unión a hidrato de carbono (CBM). Un ejemplo de una CMB adecuada es la CBM9-2 de *Thermotoga maritima*. La secuencia de ADN genómico de CBM9-2 está disponible como número de registro de GeneBank Z46264 y pertenece a la familia IX de CBM. También, las proteínas de fusión que comprenden dicha CBM u otra CMB adecuada pueden codificarse por la secuencia de ADN y sobreexpresarse en las semillas según la invención. Se describen métodos de purificación de tales CBM y proteínas de fusión de CBM en detalle

adicional en las solicitudes de patente internacional en tramitación junto con la presente del solicitante "Procedimiento no desnaturalizante para purificar proteínas recombinantes de plantas" y "Procedimiento para escisión proteolítica y purificación de proteínas recombinantes" presentadas simultáneamente con esta solicitud.

5 En una realización particular, dicha secuencia de ADN comprende un gen B4 de secuencia homeótica (HoxB4) humano que codifica para la proteína HoxB4. Dicha proteína HoxB4 humana tiene preferiblemente la secuencia representada como SEQ ID NO: 1, o identidad de secuencia sustancial con SEQ ID NO: 1, de modo que la proteína expresada preferiblemente tiene todas las características funcionales de la proteína HoxB4 nativa. La identidad de secuencia sustancial indica en el contexto del presente documento una identidad de secuencia de al menos el 50% y más preferiblemente al menos el 60%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 70%, tal como al menos el 80% y preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos el 90%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 95% o el 99%.

15 Tal como se indica en el presente documento, dicha secuencia de ADN que codifica para uno o más TF o parte(s) de los mismos puede preferiblemente formar un ARN "horquilla" que puede suprimir, retardar o reducir de otra forma la expresión de una o más de dichas proteínas de almacenamiento de semillas. Dicha secuencia de ADN puede comprender una secuencia de TF completa, sin embargo, en algunos casos, la supresión se efectuará incluso si sólo hay una parte de la secuencia de TF. Por tanto, en estas realizaciones, se requiere una parte suficientemente larga de una o más secuencias de TF de modo que se vea afectada la supresión. En algunos casos, una parte de la secuencia de TF de tan sólo 20 nucleótidos de longitud es suficiente, pero se usa preferiblemente una parte en el intervalo de al menos 20-500 nucleótidos, que incluye aproximadamente 20-200, tal como en el intervalo de 20-100, o en el intervalo de 50-100 nucleótidos de longitud.

25 En determinadas realizaciones útiles, la secuencia de ADN que codifica para uno o más TF es una secuencia de ADN quimérica, tal como se define en el presente documento, que comprende regiones de dos o más secuencias de ADN que codifican para los TF, o partes de los mismos. En otras realizaciones útiles, la secuencia de ADN que codifica para uno o más TF en una secuencia de ADN quimérica, también puede incluir una secuencia de intrón que puede formar un bucle en un ARN "horquilla".

30 Realizaciones preferidas hacen uso de secuencias de ADN que codifican para un TF o parte del mismo, que comprenden una región que codifica para un TF o parte del mismo del grupo de las proteínas bZIP, más preferiblemente las proteínas bZIP seleccionadas de proteínas BLZ1 y BLZ2 de cebada (véase Onate *et al.* 1999). Dicha secuencia de ADN puede comprender una parte de la secuencia que codifica para tal proteína, de longitud suficiente para afectar a la supresión, o una combinación de partes de las secuencias que codifican para dichas proteínas.

35 Dicha secuencia de ADN comprende preferiblemente la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 4, o una secuencia que codifica para una proteína con identidad de secuencia sustancial con cualquiera de la secuencias de aminoácido codificadas por dichas secuencias, o una secuencia con una parte de SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 4, de longitud suficiente para provocar la supresión según el método de la invención. Tal como se indicó anteriormente, cualquier combinación de dicha secuencias, tal como una combinación de una o más partes de las secuencias anteriores puede ser útil, un ejemplo de tal combinación se muestra como SEQ ID NO: 5 que es una quimera de partes de BLZ1 y BLZ2.

45 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para usar la tecnología de PTGS inducido por ARNhp para suprimir la expresión de reguladores de la transcripción de genes de proteína de almacenamiento importantes. Por tanto, en determinadas realizaciones, los métodos de la invención aplican la tecnología de PTGS inducido por ARNhp para suprimir la expresión de proteínas de almacenamiento endógenas y, por tanto, aumentar la disponibilidad de recursos, tales como aminoácidos, sitios de unión ribosómicos y el conjunto de enzimas que participan en la traducción y el procesamiento postraduccional, para la traducción de ARNm que codifica para el polipéptido heterólogo de interés. Por tanto, en realizaciones preferidas, dicha secuencia de ADN que codifica para uno o más TF o parte(s) o combinación de los mismos, preferiblemente del grupo de las proteínas bZIP tal como se describió anteriormente, puede expresar un ARN "horquilla" (ARNhp) en dicha célula vegetal. Dicha secuencia de ADN comprende preferiblemente una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y cualquier parte o combinación de las mismas, de longitud suficiente para provocar la supresión según los métodos descritos en el presente documento, es decir, particularmente en semillas y/o endospermo, tal como preferiblemente en el endospermo en la cebada.

60 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y herramientas de biología molecular para reducir los niveles de B-hordeínas y C-hordeínas en el endospermo de cebada. Más particularmente, un objeto de la presente invención es proporcionar constructos génicos que comprenden regiones de los genes BLZ1 y BLZ2 que pueden formar ARNhp y, por tanto, posibilitan la reducción de la expresión de dichos genes del endospermo.

65 Más particularmente, la invención proporciona constructos génicos de regiones de los genes BLZ1 y BLZ2 que codifican para transcritos que forman un ARNhp que puede producir el PTGS en el endospermo de cebada.

En una realización preferida de lo anterior, un método para preparar plantas transgénicas con un nivel reducido de proteínas de almacenamiento del endospermo comprende: (1) proporcionar una célula de planta monocotiledónea, preferiblemente cebada, que puede regenerarse en una planta fértil; (2) transformar la célula vegetal con constructo de ácido nucleico que comprende un casete de expresión, leído en la dirección 5' a 3', un promotor específico de semilla, preferiblemente específico de endospermo, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el regulador de la transcripción que regula la proteína de almacenamiento de semillas endógena, otro promotor específico de semilla, preferiblemente específico de endospermo que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por el regulador de la transcripción que regula el/los gen(es) de proteína de almacenamiento que va(n) a suprimirse, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido heterólogo de interés y una región no traducida en 3'; (3) regenerar dicha célula vegetal para proporcionar la primera planta transgénica que tiene niveles reducidos de reguladores de la transcripción que regulan la expresión de la proteína de almacenamiento de semillas y que tiene niveles reducidos de proteínas de almacenamiento endógenas.

Constructos de ADN son útiles en la presente invención para expresión de alto nivel de polipéptidos heterólogos de interés en semillas monocotiledóneas. Tales constructos de ADN incluyen: un promotor que es funcional en una semilla monocotiledónea dada y operativamente unido a una secuencia que codifica para un polipéptido heterólogo de interés; y un constructo génico quimérico de regiones de los genes BLZ1 y BLZ2 que codifican para un transcrito que puede formar ARNhp que puede producir el PTGS en el endospermo de cebada operativamente unido a un promotor que es funcional en una semilla monocotiledónea dada.

Otro aspecto de la invención proporciona plantas de cebada transgénicas, tales como aquéllas descritas anteriormente, que pueden obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento. Dichas plantas tienen las características deseadas mencionadas anteriormente, es decir, suprimen la expresión de proteínas "sumidero" de recursos importantes seleccionadas con el fin de potenciar la expresión y acumulación de proteínas producidas de manera recombinante deseadas. Las plantas preferidas según la invención incluyen plantas de cebada, de la variedad *Hordeum vulgare*, que pueden usarse según la invención para la expresión y acumulación de proteínas heterólogas en semillas. Las plantas de cebada de la presente invención tienen en su genoma secuencias que codifican para los TF preferidos descritos en el presente documento tal como un TF o parte del mismo del grupo de las proteínas bZIP.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Electroforesis en poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio de la proteína total de *Hordeum vulgare* cv. Skegja (49 días tras la anthesis) usando extracción acuosa (carril 1), extracción con sal (carril 2) y extracción con EtOH (carril 3). Las flechas indican la B-hordeína (inferior) y la C-hordeína (superior).

Figura 2. Análisis en gel de agarosa de productos de amplificación de PCR usando a) cebadores SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 (véase el ejemplo 2) y b) cebadores SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 (ejemplo 3). Se separaron los productos sobre gel de agarosa al 1,0%, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo UV. Los marcadores de tamaño a la izquierda son EcoRI/HindIII-corte lambda. Las flechas indican los productos amplificados.

La figura 3 ilustra la representación esquemática de la clonación del vector de transformación vegetal binaria pbDH101 para la transformación de cebada con el gen quimérico HoxB4-CBM con optimización de codones para la expresión en el tejido del endospermo de cebada bajo la regulación del promotor de D-hordeína. Abreviaturas: D-hor, promotor de D-hordeína; CBM, dominio de unión a hidrato de carbono que codifica para gen con optimización de codones de *Thermatoga maritima*; HoxB4, con optimización de codones (SEQ ID NO: 20); L, ligador (PTPTPT; P es prolina, T es treonina); kd, secuencia de KDEL; pinII, señal de terminación de gen de inhibidor II de proteinasa de patata; CaMV 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; hph, higromicina fosfotransferasa de *E. coli* (número de registro de GeneBank K01193); Nos-ter, señal de terminación de nopalina sintasa; R, borde derecho; L, borde izquierdo.

La figura 4 es una representación esquemática del gen construido para la supresión de manera dirigida inducida por el ARN horquilla de BLZ1 y BLZ2 en cebada bajo la regulación del promotor de D-hordeína. Las BLZ1/BLZ2 de 114 pb en orientación sentido y en orientación antisentido, respectivamente, pueden formar la sección del tallo mientras que el intrón 4 de 88 pb forma el bucle en el bucle en horquilla.

La figura 5 ilustra esquemáticamente la clonación del vector de transformación vegetal binario pbDH104 para la transformación de cebada con supresión de manera dirigida inducida por ARNhp de BLZ1 y BLZ2 en el tejido del endospermo de cebada bajo la regulación del promotor de D-hordeína. Abreviaturas: D-hor, promotor de D-hordeína; hpB1/2, un fragmento supresor de 620 pb compuesto por secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) derivadas de BLZ1 y BLZ2; CBM, dominio de unión a hidrato de carbono que codifica para gen con optimización de codones de *Thermatoga maritima*; HoxB4, gen B4 de secuencia homeótica con optimización de codones (SEQ ID NO: 20); L, ligador (PTPTPT; P es prolina, T es treonina); pinII, señal de terminación de gen de inhibidor II de proteinasa de patata; CaMV 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; hph, higromicina fosfotransferasa de *E. coli* (número de registro de GeneBank K01193); Nos-ter, señal de terminación de nopalina sintasa; R, borde derecho; L,

borde izquierdo.

Descripción detallada de la presente invención

5 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

El término "proteína" se usa en el presente documento de manera intercambiable con "polipéptido" y "péptido".

10 El término "heterólogo" usado en el presente documento puede usarse de manera intercambiable con el término "no nativo" o "foráneo" o "exógeno" y se aplica a proteínas y/o secuencias de ADN modificadas *in vitro* que no se encuentran normalmente en los organismos huésped que no se han sometido a manipulación genética que implica tecnología de ADN recombinante. La expresión "polipéptido heterólogo de interés" o "polipéptido de interés" usada en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido pretendido para la expresión en un organismo huésped usando los métodos o composiciones de la presente invención. Como ejemplos no limitantes, pueden producirse 15 polipéptidos farmacológicos (por ejemplo, para usos médicos) o polipéptidos industriales (por ejemplo, enzimas) según la presente invención.

La expresión "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos específica.

20 Un "promotor" se define como una serie de secuencias de control de ácido nucleico o sitios de unión a reguladores de la transcripción que dirigen la transcripción de un ácido nucleico operativamente unido. El promotor se refiere a una secuencia de ácido nucleico que controla la expresión de un ARN funcional o una secuencia codificante. La expresión "operativamente unido" se refiere a un enlace funcional entre un promotor (secuencia de control de 25 expresión de ácido nucleico, o serie de sitios de unión a factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que el promotor dirige la transcripción de el ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Los "reguladores de la transcripción" o "factores de transcripción" se refieren a proteínas reguladoras que actúan en trans que pueden unirse a elementos que actúan en cis, también denominados motivos que actúan en cis, que son 30 secuencias de ADN cortas ubicadas en el sentido de 5' de los genes, o dentro de los intrones, o en el sentido de 3' del codón de terminación.

La expresión "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo.

35 La expresión "combinación quimérica" o "gen quimérico" o "gen híbrido" se refiere a cualquiera de dos o más secuencias de ADN unidas que forman un gen que no es un gen endógeno, que comprende secuencias reguladoras y/o codificantes que no se encuentran normalmente juntas en la naturaleza. La expresión "constructo génico" o "constructo de ADN" o "constructo de ácido nucleico" se refiere a cualquiera de las secuencias de ADN o combinación de secuencias de ADN que se ensamblan mediante estrategias de biología molecular general.

40 El término "expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la biosíntesis de un producto génico, que incluye la transcripción de (ARNm) sentido, ARN antisentido u otros polímeros de ARN de los mismos o bien en forma mono o bien bicatenaria que resulta de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. La expresión también puede referirse a la traducción de ARNm de dicho gen en un polipéptido.

45 El término "transformación" se refiere a la transferencia de una molécula de ácido nucleico al genoma de un organismo huésped, dando como resultado herencia genéticamente estable. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos". El término "transgénicos" significa que la célula huésped vegetal de la invención contiene al menos una molécula de ácido nucleico foránea, preferiblemente dos moléculas de ácido nucleico foráneas integradas de manera estable en el 50 genoma. Los ejemplos de métodos de transformación vegetal incluyen transformación mediada por *Agrobacterium* (De Blaere *et al.* 1987) y tecnología de transformación por bombardeo de partículas o "pistola génica" (Klein *et al.* (1987); patente estadounidense n.º 4.945.050).

55 La expresión "inhibición antisentido" o "antisentido" o "supresión antisentido" se refieren a una hebra antisentido suficientemente complementaria a un producto de transcripción endógeno o ARNm de modo que la traducción y la expresión del producto de transcripción endógeno se inhiben o se reducen. La expresión "supresión de manera dirigida" se refiere a usar tecnología de ADN recombinante para diseñar y aplicar secuencias de ADN que pueden codificar para transcritos de ARN que pueden interferir en y suprimir la expresión de genes endógenos seleccionados para la supresión en algún organismo vivo dado. La expresión "transgén supresor" se refiere a cualquier secuencia de ADN heteróloga que codifica para transcritos de ARN que pueden interferir en y suprimir la 60 expresión de genes endógenos. La expresión "supresión conjunta" se refiere a cuando un gen introducido en una célula con transformación y que tiene secuencia similar o idéntica a un gen endógeno en esa misma célula provoca la supresión tanto del gen endógeno como del gen introducido.

65 Las proteínas "bZIP" usadas en el presente documento, se refieren a proteínas reguladoras que contienen los

denominados dominios de hélice básica/cremallera de leucina que están implicados en la unión a y dimerización de ADN y que comúnmente se unen a las secuencias de ADN que contienen el núcleo 5'ACGT'3.

El término "hordeínas" usado en el presente documento, se refiere a proteínas de almacenamiento en cebada y específicamente sintetizadas en el endospermo, y se dividen en 4 grupos: β - (beta, también denominadas B-), D-, C- y gamma-hordeínas.

La expresión "agricultura molecular" usada en el presente documento se refiere al procedimiento de usar plantas para producir compuestos biológicos valiosos tales como proteínas para procesamiento adicional.

En la presente invención, pueden usarse plantas monocotiledóneas que pueden manipularse genéticamente. Preferiblemente la planta es una planta monocotiledónea, más preferiblemente seleccionada de cebada, maíz, trigo, avena y arroz. La cebada tiene muchas características deseadas convirtiéndola en un candidato preferido para la presente invención, prefiriéndose particularmente la especie de cebada *Hordeum vulgare*. Una planta que puede transformarse genéticamente es una planta en la que una secuencia de ADN heteróloga, que incluye una secuencia de ADN para una región codificante o una secuencia de ADN que codifica para un transcrito de ARN que puede formar ARNhp, puede introducirse, expresarse, mantenerse de manera estable y transmitirse a generaciones posteriores de la progenie. Se han usado métodos de transformación y manipulación genética para producir plantas de cebada que usan como marcadores seleccionables herbicidas que incluyen, por ejemplo, bialaphos o basta, o antibióticos, tales como higromicina.

Tras seleccionar una planta huésped adecuada, se selecciona un promotor para dirigir la expresión del gen heterólogo de interés. Varios promotores que están activos en células vegetales se han descrito en la bibliografía. Se prefiere que los promotores utilizados en el constructo de ADN de la presente invención tengan actividad fuerte en los tejidos en los que se desea la acumulación del polipéptido heterólogo de interés, tal como en el endospermo de semillas de plantas monocotiledóneas. Se prefiere además que el promotor de elección no se regule mediante reguladores de la transcripción que estén seleccionados como diana para suprimirse mediante el método de esta invención, tal como los reguladores de la transcripción que regulan la expresión de genes de proteína de almacenamiento endógenos que compiten por recursos con la expresión de un gen heterólogo de interés. Tales promotores pueden obtenerse a partir de una variedad de material genético vegetal o a partir de virus vegetales. Tal como se describirá a continuación, se prefiere que el promotor particular seleccionado sea adecuado para la expresión de una proteína heteróloga en semillas monocotiledóneas, más preferiblemente en cebada, y lo más preferiblemente en el tejido del endospermo de la semilla. La clonación y el análisis de tal promotor adecuado útil para el fin de esta invención se describe en el ejemplo 2.

Además se prefiere aún, que se analice el patrón de expresión del perfil de proteína en el tejido diana seleccionado para la acumulación de la proteína heteróloga de interés y las proteínas de almacenamiento más abundantes identificadas para supresión de manera dirigida según la invención. El análisis puede basarse en la técnica anterior tal como los datos recogidos de bibliografía publicada. Esto también puede incluir monitorear simultáneamente los patrones de expresión de miles de genes con un enfoque de microalineamiento, usando ARNm extraído de dicho tejido en instantes que solapan con el perfil de expresión temporal del promotor seleccionado para dirigir la expresión de la proteína heteróloga, o usando análisis de transferencia de tipo Northern, RT-PCR y/o inmunotransferencia de tipo Western. Basándose en la información reunida los genes candidatos con expresión alta que compiten en tiempo y espacio con la expresión del gen heterólogo de interés se seleccionan para la supresión de manera dirigida según la invención.

El plásmido recombinante de la invención puede obtenerse ligando (insertando) las secuencias de ADN de interés en un plásmido apropiado que puede replicarse en un huésped bacteriano. Las secuencias de ADN, tales como el gen que codifica para la proteína heteróloga de interés o las secuencias de ADN diseñadas para la supresión de manera dirigida de genes endógenos deben estar preferiblemente operativamente incorporadas en el plásmido que puede contener, además de un promotor y para este fin, y si se desea, secuencias de ADN potenciadoras adicionales, regiones de unión al armazón, intrones, señal de adición de poli(A), secuencia de unión a ribosoma y gen marcador seleccionable de interés tal como gen de resistencia a la higromicina, gen de resistencia a la ampicilina, gen de resistencia a bialaphos, o similares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse según el uso convencional por los expertos habituales en la técnica relevante.

Métodos

Extracción de ARN y análisis de transferencia de tipo Northern

Se aísla ARN total usando TRIzol (Gibco BRL) según las instrucciones del fabricante y 10 μ g de ARN total por carril

sometido a electroforesis, y transferido a una membrana Hybond N (Amersham) mediante acción capilar. Se reticula el ARN a la membrana usando un Stratolinker (Stratagene), y se hibrida el filtro con hibridación de alta rigurosidad y lavado tal como se describe (Davis *et al.*, 1994). Se someten a radiomarcado las sondas con ^{32}P mediante cebado al azar (T7 QuickPrime Kit®; Pharmacia) según las instrucciones del fabricante. Imágenes digitales negativas de transferencias teñidas con EtBr se usan como controles de carga.

Transformación de la cebada

a) Material vegetal para transformación genética

Se sembraron semillas de *Hordeum vulgare* cv Golden Promise en una mezcla del 75% de turba de esfagno ligera y el 25% de piedra pómez (tamaño de grano medio) y se hicieron crecer las plantas a 18°C durante el día (16 horas) y a 12°C durante la noche (8 horas) y humedad relativa del 70% bajo 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz continua durante el día en fluorescente blanco frío y subirrigado a necesidad con agua. En estas condiciones las plantas crecieron vegetativamente durante aproximadamente 55-95 días o hasta que las semillas inmaduras estaban listas como material para transformación, que es aproximadamente de 8 a 14 días tras la antesis. Se esterilizaron las semillas en hipoclorito de sodio al 3% durante 40 min. en agitador rotatorio y se enjuagó con cinco cambios de agua estéril.

b) Cepas bacterianas y preparación para la transformación vegetal

Se usa *Agrobacterium tumefaciens*, que alberga un vector binario en trans con un plásmido Ti que tiene una región vir, para introducir en la cebada la región T-ADN con el constructo de ADN que regula la expresión de la proteína heteróloga de interés. Se realiza la transformación tanto de XL-Blue de *E. coli* como de bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación tal como se describe por Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982). Para la preparación para la transformación de la planta, se inocula una única colonia del cultivo de *Agrobacterium* con 5 ml de medio Agro (triptona 5 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, manitol 5 g/l, ácido glutámico 1 g/l, KH_2PO_4 250 mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l, biotina 1 $\mu\text{g/l}$, pH 7,0, rifampicina 25 $\mu\text{g/ml}$, espectinomicina 50 $\mu\text{g/ml}$) y se hizo crecer durante de 24 a 40 horas a 27°C. A tubos Eppendorf estériles, se añaden 200 μl de cultivo a 200 μl de glicerol acuoso al 30% (previamente esterilizado) y se sometió el cultivo a vórtex bien y se dejó en la mesa durante 2 horas antes de almacenarlo a -80°C. Para cada transformación, se retiró un tubo del congelador a -80°C, se descongeló y se añadieron aproximadamente 200 μl de solución madre bacteriana de *Agrobacterium* a 5 ml de medio Agro sin antibiótico. Entonces se hace crecer el cultivo durante de 17 a 20 horas a 27°C antes de usarlo para la inoculación de material vegetal (véase a continuación).

c) Preparación de explantes de cebada para la transformación inducida por *Agrobacterium*

El día uno, se escogieron aproximadamente 10 cabezas de cebada, aproximadamente de 8 a 14 días tras la antesis, se retiraron las espigas y semillas y se seleccionaron embriones de entre 1,5 mm y 2 mm de tamaño. Era necesario que el material vegetal inicial estuviera sano y fuera maduro, y no anegado, y las semillas debían ser verdes sin señales de enfermedad u hongos. Se colocaron las semillas en tubo Falcon de 50 ml (no lleno más de la mitad) y se enjuagó con etanol al 70% y luego se vertió el etanol. Entonces se añadió disolución blanqueadora al 20% (White King) y se mezcló durante 20 minutos. En una campana de flujo de aire laminar, se vertió la disolución blanqueadora, se enjuagaron las semillas con agua estéril (aproximadamente 5 - 8 enjuagues) y se puso el tubo a 4°C durante la noche. El día dos, se colocaron las semillas en una placa Petri estéril sobre la plataforma del microscopio. Se localizó la posición del embrión, se separó el extremo de la semilla y se hizo un corte a lo largo del lado de la semilla. Entonces, se sostuvo firmemente la semilla con pinzas y se presionó el centro de la semilla de modo que saliera el embrión. Se sostuvo al embrión con pinzas y se insertó una hoja de bisturí en la estría entre el escudete y el eje y se extirpa lentamente el eje. Se colocó el embrión menos el eje en un medio de regeneración, el lado del corte hacia arriba, en el centro de la placa Petri con aproximadamente 25 embriones por placa.

d) Se propagaron todos los vectores binarios en medio de cultivo LB para XL-Blue de *E. coli* que contiene espectinomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C y se purificó el vector posteriormente a partir de 100 ml de cultivo hecho crecer durante la noche usando el kit QIAGEN® Plasmid Midi. Se introdujo el vector binario purificado en la *Agrobacterium tumefaciens* con electroporación colocando 1 μl (1 μg) del vector en una cubeta estéril con espacio de 0,1 cm (BioRad), lavando el vector con 40 μl de células electrocompetentes, y fijando el voltaje a 2,5 kV y la capacitancia a 21 μF para la electroporación. Se esparcieron las células sobre placas de selección YEP que contenían espectinomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y rifampicina 20 $\mu\text{g/ml}$ hechas crecer a 28°C durante 2 días. Entonces, se llevó a cabo el análisis de digestos por restricción de plásmido de los transformantes de *A. tumefaciens* para verificar que el vector binario está intacto.

e) Infección por *Agrobacterium* de explantes de cebada

Se pipetearon aproximadamente 20 μl de cultivo de *Agrobacterium* sobre cada embrión garantizando que todos los embriones entraran en contacto con la disolución. Se dio la vuelta a los embriones (lado del corte hacia abajo) y se

arrastraron a lo largo del medio de regeneración hacia fuera de la placa, eliminando el exceso de *Agrobacterium*. Entonces se transfirieron los embriones a placas con medio de regeneración recién preparado (lado del corte hacia arriba) a intervalos espaciados equitativamente (25 por placa) y se colocó en un armario a oscuras a 24°C

- 5 f) Regeneración y organogénesis en cultivo tisular de cebada tras la infección por *Agrobacterium*. Tras tres días se transfirieron los embriones a un medio de regeneración recién preparado con un marcador seleccionable, tal como bialaphos o higromicina y se dejó ahí durante de cuatro a seis semanas, subcultivando cada dos semanas. Para regenerar los brotes, se transfirieron los callos a medio de inducción de brotes (SIM) y los callos que sobrevivieron y los brotes de regeneración se transfirieron a SIM recién preparado cada dos semanas hasta que se formaron pequeñas plántulas. Luego, se transfieren las plántulas a medio de inducción de raíces (RIM) y las plantas que sobreviven se plantaron en tierra para selección adicional.

Extracción de ADN, PCR y clonación

- 15 Se extrajo el ADN genómico para amplificación por PCR de aproximadamente 200 mg de tejido de hoja joven usando el NucleoSpin Plant Kit® de Clontech, y según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo las reacciones de PCR en un termociclador Peltier (MJ Research, PTC-200) con tapa calentada. Se sintetizaron químicamente todos los cebadores con un sintetizador de ADN completamente automatizado (Perkin-Elmer). Se fraccionaron por tamaño todos los fragmentos de ADN en gel de agarosa teñido con EtBr al 1% bajo luz UV y se purificó usando el kit de extracción de gel QIAquick® (Qiagen). Se adquirieron las enzimas de restricción de New England Biolabs Inc (Beverly, Mass.) y Fermentas y se usaron según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo la clonación y otras manipulaciones de ADN según procedimientos convencionales tal como se describe por Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982) pero todas las reacciones de ligación usaron las siguientes condiciones: ADN ligasa T4 (2,5 U) en un tampón [Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ATP 0,5 mM, polietilenglicol-8000 al 2,5%] a 16°C durante 16 horas. Se usaron como receptores XL-Blue de *Escherichia coli* competentes en experimentos de transformación para manipulaciones de ADN y construcción de clones de plásmido. Se prepararon todos los midiprep de ADN de plásmido usando el kit Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen) y se llevó a cabo la secuenciación de fragmentos de ADN usando secuenciación de ADN automatizada (ABI, Pharmacia).

30

Ejemplo 1

Análisis de proteínas “sumidero” en el endospermo de *Hordeum vulgare*

- 35 Puede llevarse a cabo un análisis de expresión de proteínas en semillas de *Hordeum vulgare* cultivo Skegla usando SDS-PAGE de proteínas extraídas de semillas recogidas 49 días tras la antesis (dpa) para identificar aquellas proteínas expresadas en el endospermo que contribuyen de manera importante en el nivel de proteína total del endospermo y, por tanto, posible candidato para supresión de manera dirigida. Se molieron finamente a mano semillas enteras de cinco ejes de cebada en nitrógeno líquido antes de la adición del tampón de extracción apropiado. Se usaron dos tipos de tampones de extracción, además de extracción acuosa, en ambas muestras. En primer lugar, se realizó la extracción de proteínas totales en condiciones reductoras con extracción de etanol (EtOH al 70%) en presencia de 2-mercaptoetanol al 1%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y polivinilpirrolidina al 1% (PM 360.000). En segundo lugar, se realizó la extracción de proteínas totales en condiciones reductoras en presencia de NaCl 170 mM, 2-mercaptoetanol al 1%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y polivinilpirrolidina al 1% (PM 360.000). Tras moler la muestra en nitrógeno líquido, se añadieron 5 ml del tampón de extracción al vial de extracción seguido por molienda continua durante 3 min. Se clarificó el extracto mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. a 4°C, seguido por una concentración por centrifugación de diez veces en concentradores Ultrafree-4 con corte de 5 kDa molecular (UFV4BCC00-Millipore Corp. Bedford, MA, EE.UU.). Se añadió una muestra de 100 µl del extracto concentrado, clarificado a 100 µl de tampón de muestra 2x y se colocó la mezcla en un baño de agua en ebullición durante 5 min. Tras enfriar, se cargaron 10 µl de la muestra sobre gel de poli(acrilamida) al 12% separado con SDS-PAGE. Tras la SDS-PAGE, se tiñó el gel con tinción de azul de Coomassie R250, y se destiñó para visualizar las bandas de proteína. Los resultados mostraron que las proteínas más abundantes en el endospermo en desarrollo en *H. vulgare* cultivo Skegla son B- y C-hordeínas (figura 1). Los resultados indican que al suprimir los reguladores de la transcripción que regulan los genes que codifican para B- y C-hordeínas es muy probable que se reduzca la competencia por recursos y permitir la acumulación aumentada de un polipéptido heterólogo expresado, según la invención.

55

Ejemplo 2

- 60 Selección de promotor para supresión de manera dirigida de B- y C-hordeínas en *Hordeum vulgare* usado como vehículo de expresión para proteínas heterólogas

Los promotores génicos de las hordeínas B (registro de GeneBank n.º X53690) y hordeínas C (registro de GeneBank n.º M36941) contienen elementos que actúan en cis idénticos al 100% identificados en ambas, que participan en su regulación de transcripción (Muller y Knudsen 1993; Vicente-Carbajosa *et al.* 1992). Estos elementos cis están dentro de la denominada caja del endospermo (EM) ubicada aproximadamente 300 pb en el

65

sentido de 5' del codón de iniciación de traducción. La EM alberga dos motivos que actúan en cis distintivos para el factor de transcripción uniendo, la caja de prolamina (PB), 5'-TGTAAG-3', y el motivo similar a GCN4 (GLM), 5'-(G/A)TGA(G/C)TCAT-3'. El GLM se reconoce por dos factores de transcripción, BLZ1 (registro de GeneBank n.º X80068), y BLZ2 (registro de GeneBank n.º X80068). Tras la unión, se activa la transcripción del gen particular (véase Onate *et al.* 1999). Estos dos genes son genes de única copia y por tanto buenos candidatos para la supresión de manera dirigida descrita por esta invención. Vicente-Carbajosa *et al.* (1998) sometieron a prueba su supresión antisentido en un sistema de expresión transitorio sin investigar el efecto sobre plantas, plantas transformadas de manera estable, o sobre la acumulación de proteínas de almacenamiento. Además, el efecto de tal supresión sobre la acumulación de proteínas heterólogas en el mismo tejido no se ha investigado. Un criterio importante en la ingeniería de la supresión de manera dirigida según la invención es que el promotor que dirige el transgén que codifica para la proteína heteróloga de interés no debe contener motivos que actúan en cis reconocidos por el regulador de la transcripción particular responsable de la expresión de las proteínas de almacenamiento a suprimir. Como las B- y C-hordeínas contienen el GLM reconocido por BLZ1 y BLZ2 los promotores de hordeína B y C no pueden usarse para dirigir la expresión del transgén heterólogo que codifica para la proteína heteróloga deseada. Otro criterio importante es que el promotor que dirige el propio transgén supresor se dirige mediante un promotor específico de tejido, por ejemplo promotor específico de endospermo, de modo que la expresión de los reguladores de la transcripción en otros tejidos, en los que puedan necesitarse, no se vería afectada. Esto es importante puesto que muchos factores de transcripción, tal como el BLZ1 en cebada, se expresan en más de un tejido. Aún otro criterio es evitar la "autosupresión" del transgén supresor usando un promotor para dirigir el transgén supresor que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por reguladores de la transcripción que van a suprimirse mediante la invención.

Basándose en estos criterios, se seleccionó un promotor candidato para la supresión de manera dirigida de C-hordeínas de banda.

Aislamiento, clonación y análisis del promotor de D-hordeína de *Hordeum vulgare* cv Skegla

Se diseñaron cebadores para amplificar la región del promotor proximal desde -435 hasta -16 basándose en el sitio de iniciación de traducción del gen de D-hordeína tal como se describe en la secuencia GeneBank id. X84368, se sintetizó como cebador sentido, 5'GGAATTCC_{EcoRI}CTTCGAGTGCCCGCCGATTTGCCAGCAATGG (SEQ ID NO: 9), con un sitio de restricción EcoRI introducido en el extremo 5', y se sintetizó como cebador antisentido, 5'ATAAGAATGCGGCCGC_{NotI}AATGAATTGATCTCTAGTTTTGTGG (SEQ ID NO: 10), con un sitio de restricción NotI introducido en el extremo 5'. El fin de la introducción de estos sitios de restricción en el extremo 5' de los cebadores era ayudar en la clonación del fragmento amplificado. La composición de la disolución de reacción usada para amplificar el fragmento de 420 pb, usando el ADN genómico de *Hordeum vulgare* cv. Skegla como molde, fue la siguiente:

Disolución de ADN genómico	4 µl (50 ng)
Agua esterilizada	12 µl
Tampón para PCR 10x [Tris-HCl 100 mM (pH 8,8), KCl 500mM, Nonidet P40 al 0,8%]	2,5 µl
Cebador sentido 50 pmol/µl	1 µl (50 pmol)
Cebador antisentido 50 pmol/µl	1 µl (50 pmol)
MgCl ₂	1 µl (2,5 mM)
dNTP	2,5 µl (1mM)
Taq ADN polimerasa (Fermentas)	1 µl (5 U)
Total	25 µl

Se mezcló meticulosamente la disolución de reacción anterior, excepto 9 µl de agua esterilizada y la Taq ADN polimerasa, y se calentó la disolución hasta 94°C durante 3 min., luego se enfrió hasta 80°C durante 30 s y se añadieron la Taq ADN polimerasa y 9 µl de agua esterilizada. Se realizó el primer ciclo de la PCR tal como sigue: se calentó la reacción hasta 94°C durante 30 s, se enfrió hasta 57°C durante 30 s para la hibridación, y luego se calentó hasta 72°C o 45 s para la extensión. Los siguientes 30 ciclos fueron tal como sigue: desnaturalización térmica a 94°C durante 30 s, hibridación a 62°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 45 s. Tras completar los 30 ciclos, se calentó la reacción hasta 72°C durante 4 min. Se digirió el fragmento amplificado de 420 pb (figura 2a) con EcoRI/NotI y luego se ligó al sitio EcoRI/NotI I del vector pKOH122 para proporcionar el plásmido recombinante pDH104. Entonces, se decidió la secuencia de nucleótidos del inserto de ADN de 420 pb (SEQ ID NO: 11). Según la secuencia el promotor de D-hordeína no contiene el GLM y, por tanto, la supresión de B- y C-hordeínas a través de la supresión de manera dirigida o bien de BLZ1 o bien de BLZ2 (véase la explicación anteriormente) no afectaría a la actividad del promotor de D-hordeína y, por tanto, la expresión de la proteína heteróloga de interés. Además, puesto que el promotor de D-hordeína es exclusivamente específico de endospermo este promotor es útil para dirigir el transgén supresor diseñado para suprimir la expresión de BLZ1 y BLZ2.

Como es crítico evitar la "autosupresión" del transgén supresor, usando el promotor para dirigir el transgén supresor

que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por reguladores de la transcripción que van a suprimirse por la invención, usando el promotor de D-hordeína, que carece el GLM, para dirigir el gen supresor que suprime BLZ1 y BLZ2, no provocaría tal “autosupresión”.

5 Ejemplo 3

Clonación de la región codificante de D-hordeína y análisis de la expresión endógena del gen de D-hordeína a nivel de ARNm.

10 Se diseñaron un cebador sentido, 5'GGAATTCC_{EcoRI} ATGGCTAAGCGGCTGGTCCTC (SEQ ID NO: 12), y un cebador antisentido, 5'GGAATTCC_{EcoRI}TTGCAATTGGATAGGTCTCTTG (SEQ ID NO: 13), para amplificar un fragmento de 727 pb a partir de la región codificante del gen de D-hordeína tal como se describe en la secuencia GeneBank id. X84368. La composición de la disolución de reacción usada para amplificar el fragmento de 727 pb, usando el ADN genómico de *Hordeum vulgare* cv. Skegla como molde, fue la siguiente:

15	Disolución de ADN genómico	4 µl (50 ng)
	Agua esterilizada	12 µl
	Tampón para PCR 10x [Tris-HCl 100 mM (pH 8,8), KCl 500 mM, Nonidet P40 al 0,8%]	2,5 µl
	Cebador sentido 50 pmol/µl	1 µl (50 pmol)
	Cebador antisentido 50 pmol/µl	1 µl (50 pmol)
	MgCl ₂	1 µl (2,5 mM)
	dNTP	2,5 µl (1mM)
	Taq ADN polimerasa (Fermentas)	1 µl (5 U)
	<hr/> Total	<hr/> 25 µl

Se mezcló meticulosamente la disolución de reacción anterior, excepto 9 µl de agua esterilizada y la Taq ADN polimerasa, y se calentó la disolución hasta 94°C durante 3 min., luego se enfrió hasta 80°C durante 30 s y se añadieron la Taq ADN polimerasa y 9 µl de agua esterilizada. Se realizó el primer ciclo de la PCR tal como sigue: se calentó la reacción hasta 94°C durante 30 s, se enfrió hasta 60°C durante 30 s para hibridación, y luego se calentó hasta 72°C durante 45 s para extensión. Los siguientes 30 ciclos fueron tal como sigue: desnaturalización térmica a 94°C durante 30 s, hibridación a 65°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 45 s. Tras completarse los 30 ciclos, se calentó la reacción hasta 72°C durante 4 min. Se digirió el fragmento amplificado de 727 pb (figura 2b) con EcoRI y luego se ligó al sitio EcoRI del vector pKOH122 para producir el plásmido recombinante pDH136. Entonces, se decidió la secuencia del inserto de ADN (SEQ ID NO: 14).

30 Se analiza adecuadamente el nivel de estado estacionario del ARNm del gen de D-hordeína en el endospermo de 40 DAP, embrión de 40 DAP, hojas, tallo y raíz usando análisis de transferencia de tipo Northern: se aísla el ARN total de 200-250 mg de material vegetal a partir de diferentes partes de la planta o tejidos de *Hordeum vulgare* cv Skegla, se separa en gel de agarosa-formaldehído al 1,2% y se somete a transferencia sobre una membrana Zeta-Probe (Millipore, Bedford, Mass.) según las instrucciones del fabricante. Se realizan la transferencia, la hibridación y el lavado tal como se describió (Davis *et al.*, 1994). Se realiza la hibridación usando un fragmento de 747 pb, con cebado al azar, radiomarcado con ³²P del gen de D-hordeína (SEQ ID NO: 14) como sonda.

35 Ejemplo 4

Clonación de HoxB4 con optimización de codones del endospermo de cebada en el vector de transformación vegetal pBDH101

40 Se sintetiza HoxB4 con optimización de codones para la expresión bajo la regulación del promotor de D-hordeína en cebada mediante GeneArt GmbH (Alemania), usando la información de secuencia básica tal como se describe en GeneBank ID NM_024015 e información de utilización de codones para la expresión con optimización de codones en el endospermo bajo la regulación del promotor de D-hordeína tal como se describió (véase la solicitud en tramitación junto con la presente del solicitante “Methods for high level expression of polypeptides in plants using codon optimization”). El fragmento de 791 pb (SEQ ID NO: 20) está flanqueado por sitios NcoI (CCATGG) para la clonación e incluía una secuencia de 27 nucleótidos que codifican para el sitio de escisión de enterocinasa-ligador DDDDKPTPTPT en el extremo 3'. El fragmento HoxB4 se liga en el sitio NcoI/NcoI de pKOH122 para crear pDH170. Entonces, se libera el fragmento con NcoI y se liga en el sitio NcoI en pDH152, sustituyendo el fragmento EK-L en pDH152 para producir pDH156. Luego, el fragmento del promotor de D-hordeína de pDH104 se liga en el sitio EcoRI/NotI de pDH156 para producir pDH157. El fragmento promotor de D/SP/HoxB4-E-L/CBM/kd/pinII se libera con Sse83871/SfiI y se liga en el sitio Sse83871/SfiI de pKOH250 para generar el vector de transformación vegetal pBDH101 (figura 3).

Ejemplo 5

Construcción del vector de transformación vegetal pbDH104 con supresión de manera dirigida inducida por ARN horquilla de BLZ1 y BLZ2 bajo la regulación del promotor de D-hordeína

5 Se sintetizó el gen para la supresión de manera dirigida inducida por ARN horquilla de BLZ1 y BLZ2 mediante GeneArt GmbH (Alemania) como un fragmento supresor de 592 pb seguido por un fragmento de extremos terminales de nos de 265 pb (SEQ ID NO: 8), y se clonó en el sitio HindIII/EcoRI en pUC19 para producir pDH144. El
10 fragmento es una composición quimérica de secuencias de nucleótidos a partir del gen de BLZ1 (SEQ ID NO: 2) y el gen de BLZ2 (SEQ ID NO: 4), formando brazos sentido y antisentido, y una secuencia de nucleótidos de 88 pb que representan el intrón 4 del gen de BLZ1 (secuencia GeneBank id. X80068), diseñado para formar un bucle en horquilla de ARN tras la transcripción (figura 4). Se liberó el fragmento de 857 pb hpB1/2-nos con SacII/EcoRI y se
15 substituyó por el fragmento BLZ1-nos antisentido en pDH158 para producir pDH160. Se liberó el inserto completo en pDH160 con digestión con Sse83871/SgfI y se ligó en el sitio Sse83871/SgfI de pKOH250 para generar el vector de transformación vegetal binario pbDH104 (figura 5) que puede producir una integración estable de la secuencia de ADN entre los bordes izquierdos (L) y bordes derechos (R) del vector en el genoma de la planta.

Ejemplo 6

20 Transformación genética de cebada con pbDH101 y pDH104

Se recoge la semilla inmadura de *Hordeum vulgare* cv Golden Promise, aproximadamente de 8 a 14 días tras la antesis, y se almacena durante la noche a 4°C en la oscuridad. Se trata la semilla inmadura incubada en frío con EtOH al 70% durante 1 min. y luego durante 10 min. en clorhidrato de sodio al 0,6%, seguido por lavado meticuloso
25 (5-8 veces) con agua destilada estéril y se coloca sobre una placa Petri estéril bajo un microscopio de disección en cámara de flujo laminar en condiciones estériles. Se ubica la posición del embrión, se corta el extremo de la semilla y se realiza una escisión a lo largo del lateral de la semilla. Se sostiene la semilla con pinzas y se presiona la mitad de la semilla de modo que se extrae el embrión. Se sostiene el embrión en su lugar con las pinzas, se inserta la hoja del bisturí en la estría entre el escudete y el eje y se extirpa lentamente el eje. Se coloca el escudete sobre medios
30 de inducción de callo, con el corte hacia arriba, y se inocula con de 25 µl a 40 µl de *Agrobacterium tumefaciens* de concentración total que porta el vector de transformación vegetal durante 1 a 5 minutos. Tras la inoculación, se arrastra el escudete al exterior de la placa para disminuir la carga bacteriana y para reducir el sobrecrecimiento durante la fase de cultivo conjunto. Se transfiere el escudete infectado a una nueva placa con medios de inducción de callo y se incuba la placa a 24°C en la oscuridad durante 3 días. Después de 3 días, se transfiere el escudete a
35 nuevo medios de inducción de callo pero con timentina 100 µg/ml para destruir el *Agrobacterium* e higromicina 50 µg/ml para seleccionar las células transformadas y se incuban durante 4 semanas en la oscuridad a 24°C, realizando subcultivos tras 2 semanas. Entonces, se transfiere el callo a medios de inducción de brotes que incluyen BAP 2,5 mg/l, timentina 50 µg/ml e higromicina 25 µg/ml, y se incuba a alta luminosidad durante de 4 a 10 semanas. Se transfieren plántulas de regeneración individuales a un medio de enraizamiento (timentina 50 µg/ml e higromicina
40 25 µg/ml y sin hormonas). Después del desarrollo de brotes con raíces hasta aproximadamente de 5 a 7 cm, se trasplantaron las plantas transgénicas en el suelo y se hicieron crecer ahí bajo iluminación completa.

Ejemplo 9

45 Acumulación de la proteína HoxB4-CBM tras la supresión de manera dirigida de BLZ1 y BLZ2

Para medir la acumulación de las B- y C-hordeínas en plantas transgénicas transformadas con o bien pbDH101 (sólo hoxB4-cbm) o bien pbDH104 (ARNhp de BLZ1/2 expresado con hoxB4-cbm), puede usarse el método con azul brillante de Coomassie G coloidal tal como se describe por Smith (en The Protein Protocols Handbook ed. Walker, 2ª
50 ed., Humana Press, 2002). Luego, se separan las proteínas solubles de los extractos de semillas con SDS-PAGE junto con proteínas convencionales, se tiñe el gel posteriormente durante 1 hora con la disolución de tinción (azul brillante G al 0,04% (p/v) en ácido perclórico al 3,5% (p/v)), seguido por destañido del gel en agua destilada durante 4 horas. Se analiza la intensidad de las bandas de B- y C-hordeína respectivas con densitometría de barrido y se compara la intensidad de banda relativa en plantas transgénicas transformadas con pbDH101 o pbDH104. Esto
55 proporciona una estimación de la supresión de B- y C-hordeína provocada por el ARNhp de BLZ1/2. Puede verificarse la identidad y el nivel de expresión del HoxB4-CBM en plantas transformadas con pbDH101 o pbDH104 y se mide mediante inmunotransferencia de tipo Western de un fragmento del mismo gel que contiene un duplicado de muestras. Pueden someterse a electrotransferencia las bandas a partir del fragmento de gel sobre una membrana de nitrocelulosa usando Mini transblot Cell de Biorad pero se marcan los contornos del fragmento del gel sobre el
60 filtro antes de la transferencia. Después de la transferencia y el desensamblaje del producto intercalado gel/membrana, se hibrida la nitrocelulosa con antisueros policlonales contra CBM, y tras múltiples etapas de lavado (2*5 min., 2*15 min., 1*5 min.), se incuba durante 45 min. con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Después etapas de lavado posteriores, descritas anteriormente, y tras la adición de los sustratos fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y cloruro de nitroazul de tetrazolio a la membrana, la reacción de color de HRP

identifica positivamente la banda como HoxB4-CBM y proporciona una estimación del efecto de la expresión de ARNhp de BLZ1/2 al nivel de hoxB4-CBM.

Referencias

5
 Coles *et al.* (1999) *Plant J.* 17:547-556.

Davis *et al.* (1994): En: *Basic Methods in Molecular Biology*, Norwalk, Connecticut: Appelton and Lenge:350-355.

10
 De Blaere *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 143:277.

Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806-811.

15
 Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70-73.

Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

20
 Muller *et al.* (1993) *Plant J.* 4:343-355.

Onate *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:9175-9182.

Patel *et al.* (2000) *Molecular Breeding* 6:113-123.

25
 Sanford *et al.* Patente estadounidense n.º 4.945.050.

Shewmaker *et al.* Patente estadounidense n.º 5.759.829.

30
 Shewry *et al.* (1985) *Biochem. Genet.* 23:389-402.

Smith *et al.* (2000) *Nature* 40: 319-320.

Sørensen *et al.* (1996) *Mol. Gen. Genet.* 250:750-760.

35
 Takaiwa *et al.* (2003) solicitud de patente europea EP 1 327 685 A1

Vicente-Carbajosa *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:453-458.

40
 Vicente-Carbajosa *et al.* (2000) *Plant J.* 13(5):629-640.

Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natt. Acad. Sci.* 95:13959-13964.

Wesley *et al.* (2001) *Plant J.* 27:581-590.

45
 Örvar *et al.* (1997) *Plant J.* 11:1297-1305.

Listado de secuencias

50
 <110> ORF ehf.
 ÖRVAR, Björn

<120> POTENCIACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE POLIPÉPTIDOS HETERÓLOGOS EN SEMILLAS DE PLANTAS A TRAVÉS DE SUPRESIÓN DIRIGIDA DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO ENDÓGENAS

55
 <130> P3505PC00

<150> Documento IS 6931
 <151> 27/08/2003

60
 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.1

65
 <210> 1
 <211> 251
 <212> PRT

ES 2 375 702 T3

<213> *Homo sapiens*
 <400> 1

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys
 1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp
 20 25 30

His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe
 35 40 45

Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg
 50 55 60

Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro
 85 90 95

Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala
 100 105 110

Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His
 115 120 125

Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp
 130 135 140

Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly
 145 150 155 160

Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu
 165 170 175

Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg

	180		185		190										
Val	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu	Ser	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile
		195					200					205			
Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Asp	His	Lys	Leu	Pro
	210					215					220				
Asn	Thr	Lys	Ile	Arg	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Pro	Gly	Arg	Pro	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu					
				245					250						

<210> 2
 <211> 1173
 <212> ADN

5

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 2

atggagcgcg	tcttctccgt	cgaggagatc	cccgaccctg	tctggggcca	gccgtcgccg	60
cggcagcgcg	ggcgccggcc	gccggagggc	gccatgaacc	ggtgcccgtc	cgagtgggtac	120
ttccagaagt	tcctcgagga	ggccgtgctc	gacagccccg	ccgccgacct	tagcccgatg	180
tccggtgcta	gcggacgagg	tcaagcggcc	tgccgtccgc	gtggcgtggc	ggggacggcg	240
acgggccccg	cggtggacct	ggtggagtac	aacgccatgc	tcaagcagaa	gctcgagaag	300
gacctcgccg	ccgtcgccat	gtggagggcc	tctggtgcca	tgccctcaga	acgttttgca	360
gctagtccgt	catgcccaaa	tgcatatggt	cagcatatag	gcactattaa	tcccatagga	420
ggtaatgtgg	ttccacttca	aaacaagcta	gctggtggcg	caagcggggg	gtcgggtcca	480
catctgggtac	aaaatgctga	tgcccttgta	aagcaagccg	ctagctcttc	ttcgcgggag	540
cagtcagaag	atgatgatat	ggaaggagaa	gatgagatca	ctgggaatgg	ggtccctact	600
gatcaaaggc	tgcgaggagg	gaagcaatcc	aatcgggaat	cggccaggcg	ttcaagaagc	660
agaaaggcag	ctcacctgaa	tgaactcgaa	gcacaggtat	cacagttaag	agttgaaaac	720
tcctcgctgt	taaggcggct	tgctgatggt	aatcagaaat	acaatggtgc	tgctggtgac	780
aataggggtg	taaaggcggg	tggtgaaacc	ttaagagcaa	aggtgaagat	ggccgaggac	840
tcggtgaagc	gggtgacagg	catgagcgtc	ctgttccctg	cagggtccga	catgtcatct	900
ctcagcatgc	ccttacttgg	ctctccatca	gaagccacct	ccgacgctgc	gttcccggac	960
gacctgagcg	cttacttctc	cacaagcgag	gctggaggta	acaacggata	catgcccggag	1020
atggcttcct	cggcgcaaga	ggatgacaac	ttcctcaacg	agaccatgga	taccagcaag	1080
atgggcagac	ccgactcgct	gcatcgtgtg	gcgagcctgg	agcacctcca	gaagaggatg	1140
tgcggcgggc	cagcttcgtc	cggatcgacc	tca			1173

10

<210> 3
 <211> 334
 <212> ADN
 <213> *Hordeum vulgare*

5
 <400> 3

```

ggccgaggac tcggtgaagc gggtgacagg cätgagcgct ctgttccctg caggggtccga      60
catgtcatct ctcagcatgc ccttccactgg ctctccatca gaagccacct ccgacgctgc      120
gttcccggac gacctgagcg cttacttctc cacaagcgag gctggaggta acaacggata      180
catgcccgag atggcttcct cggcgcaaga ggatgacaac ttcctcaacg agaccatgga      240
taccagcaag atgggcagac ccgactcgct gcatcggtg gcgagcctgg agcacctcca      300
gaagaggatg tgcggcgggc cagcttcgtc cgga      334
    
```

<210> 4
 <211> 1230
 <212> ADN
 <213> *Hordeum vulgare*

10
 15
 <400> 4

```

atggagcccc tgttctcact gctggaggag gcgatgcccc agccccgactc taacccccggt      60
cggacctcgc cgccgcagct gcaggcacac gtgctcgcgg gaggagtcag aggagcagga      120
ggagtgggcg tcggtgagat cgttggcgat ggcgcgacag aattgtgctt cgacaagtcc      180
atggaggagc cgtcgctgct caacgtcccc acggagccag tggcgaacct ggacgcctcg      240
acgcttcacc ctaatccac ggcggagggt agccgcaaga ggcgggtacga cgttcatgag      300
gaggaggagg tgggtgggggt catccccacg ccgcctgcgg cgggcgcggt gctggacccc      360
gtgggctaca acgcgatgct gagacggaag ttggacgcgc atctcgccgc cgtcgccatg      420
tggaggacta ctcgaggaat ttgccgacaa agctcccatg acaatagagc atcacaaaat      480
ccagattcta tccaaggctc agaaaatcac actggagatg ctagtgtgca acaacttagc      540
tcttcctcat gggagccatc accatcggat gatgatatgg aaggggaggc acaacaatt      600
ggaactatga atattagtgc agagaaagtg aacaaaagaa aagaatctaa cggggattcg      660
gcgagacgct caaggagtag aaaagcagct catacgaagg aactagagga gcaagtctca      720
ctattaagag ttgcaaataa ctccttgatg agacatctag cagatgtaag tcacagatac      780
gtcaataccg ctattgacaa tagggatttg aaggcaaatg ttgaaaccct agaagcaaag      840
gtaaagatgg ccgaggaaac tatgaagaga attacatcca ccaacaattt cccccaagca      900
atatctggca tgtcatctct caggacccat ttcagtgggt cccaattgga tggcatcttt      960
gatactacat tgccaaccca aaacatgtca cttaccatt tttccactac agcaacaaat      1020
tttgätgtga gcagcaacta catccccgag cttagctccgg cataccagat ccatgatcaa      1080
atatcttcgc tacatacgca acctatgcca tgcttggatc atcaccacg gaggatgccc      1140
tttggatttc caagtacatt ggtgcctacc ccacaacggg aatccactac attggattca      1200
aatgaaatag gcaacatggt gatgcagtag      1230
    
```

ES 2 375 702 T3

	<210> 5	
	<211> 733	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Hordeum vulgare</i>	
	<400> 5	
	gatactacat tgccaaccca aaacatgtca cttaaccatt tttccactac agcaacaaat	60
	tttgatgtga gcagcaacta catccccgag cttagctccgg cataccagat ccatgatcaa	120
	atatcttcgc tacatacgca acctatgcct gcttggatca tcaccacagg aggatgcctt	180
	ttggtattcc aagtacattg gtgcctaccc cacaacggga atccactaca ttggattcaa	240
	atgaaatagg caacatggtg atgcagtagg aattatgtga gagacctgag ccggaattat	300
	tattttaaaa taaatattgt cgttgttctt ggtggccatt gggggatttt gtaatggttt	360
	ctcaccttgt taagctcaga cttgtttaag gccggccggg gccgaggact cggatgaagcg	420
	ggtgacaggc atgagcgctc tgttccctgc aggggccgac atgtcatctc tcagcatgcc	480
	cttactggc tctccatcag aagccacctc cgacgctgcg ttcccggacg acctgagcgc	540
	ttacttctcc acaagcgagg ctggaggtaa caacggatac atgcccgaga tggcttctc	600
	ggcgcaagag gatgacaact tcctcaacga gacctggat accagcaaga tgggcagacc	660
	cgactcgctg catcgtgtgg cgagcctgga gcacctccag aagaggatgt gcggcggggc	720
	agcttcgtcc gga	733
10	<210> 6	
	<211> 346	
	<212> ADN	
	<213> <i>Hordeum vulgare</i>	
15	<400> 6	
	ccgcggactg ggaatggggt ccctactgat caaaggctgc ggaggaggaa gcaatccaat	60
	cgggaatcgg ccaggcgttc aagaagcaga aaggcagctc acctgaatga actcgaagca	120
	ctcgagcagg tttgacaatt tacattgttg tttcttgact ggcagtggat tctgaaaaag	180
	gcgctaata ga gtttttgttg tggatggctc gttacagggt agatcttgct tcgagttcat	240
	tcaggtgagc tgcctttctg cttcttgaac gcctggccga ttcccgattg gattgcttcc	300
	tcctccgcag cctttgatca gtagggacct cattcccagt tctaga	346
20	<210> 7	
	<211> 358	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> parte sintetizada de ADNc de BLZ1	
	<400> 7	

ES 2 375 702 T3

ccgcggacaa acaattggaa ctatgaatat tagtgcagag aaagtgaaca aaagaaaaga 60
atctaaccgg gattcggcga gacgctcaag gagtagaaaa gcagctcata cgaaggaact 120
agaggactcg agcaggtttg acaatttaca ttgttgtttc ttgactggca gtggattctg 180
aaaaaggcgc taatgagttt ttgttgtgga tggctcgta caggttagat cttcctctag 240
ttccttcgta tgagctgctt ttctactcct tgagcgtctc gccgaatccc ggtagattc 300
ttttcttttg ttcactttct ctgcactaat attcatagtt ccaattgttt gttctaga 358

<210> 8
 <211> 857
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> secuencia que codifica para ARNhp, tallo tanto de BLZ1 como de BLZ2

10

<400> 8

aagcttccgc ggactgggaa tggggtcctt actgatcaaa ggctgcggag gaggaagcaa 60
tccaatcggg aatcggccag gcgttcaaga agcagaaagg cagctcacct gaatgaactc 120
gaagcaaca acaattggaa ctatgaatat tagtgcagag aaagtgaaca aaagaaaaga 180
atctaaccgg gattcggcga gacgctcaag gagtagaaaa gcagctcata cgaaggaact 240
agaggactcg agcaggtttg acaatttaca ttgttgtttc ttgactggca gtggattctg 300
aaaaaggcgc taatgagttt ttgttgtgga tggctcgta caggttagat cttcctctag 360
ttccttcgta tgagctgctt ttctactcct tgagcgtctc gccgaatccc ggtagattc 420
ttttcttttg ttcactttct ctgcactaat attcatagtt ccaattgttt gttgcttcga 480
gttcattcag gtgagctgcc tttctgcttc ttgaacgcct ggccgattcc cgattggatt 540
gcttcctcct ccgcagcctt tgatcagtag ggacccatt cccagttcta gagaagcaga 600
tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat 660
gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat 720
gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatcgc 780
gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat 840
gttactagat cgaattc 857

<210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> cebador sintetizado

20

<400> 9
 ggaattccct tcgagtgcc gccgattgc cagcaatgg 39

25

<210> 10
 <211> 41
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> cebador sintetizado

5 <400> 10
ataagaatgc ggccgcaatg aattgatctc tagttttgtg g 41

10 <210> 11
<211> 414
<212> ADN
<213> *Hordeum vulgare*

15 <400> 11

ccttcgagtg	cccgccgatt	tgccagcaat	ggctaacaga	cacatattct	gccaaaaccc	60
cagaacaata	atcacttctc	gtagatgaag	agaacagacc	aagatacaaa	cgtccacgct	120
tcagcaaaca	gtaccccaga	actaggatta	agccgattac	gcggttttag	cagaccgtcc	180
ctgttttgca	aagctccaat	tcctccttgc	ttatccaatt	tcttttgtgt	tggcaaactg	240
cacttgtcca	accgattttg	ttcttcccgt	gtttcttctt	aggctaacta	acacagccgt	300
gcacatagcc	atggtccgga	atcttcacct	cgccctata	aaagcccagc	caatctccac	360
aatctcatca	tcaccgagaa	caccgagaac	cacaaaacta	gagatcaatt	catt	414

20 <210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador sintetizado

<400> 12
ggaattccat ggctaagcgg ctggtcctc 29

30 <210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador sintetizado

<400> 13
ggaattcctt gcaattggat aggtctcttg 30

40 <210> 14
<211> 3
<212> ADN
<213> *Hordeum vulgare*

45 <400> 14
ggg 3

50 <210> 15
<211> 791
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

ES 2 375 702 T3

<223> ADNc sintetizado

<400> 15

5 ccatggcaat gagctccttc ttgatcaact ccaactacgt ggatcccaag ttcccacat 60
 gcgaggagta ctcccaaagc gattacctcc ccagcgatca ttcccaggg tactacgccg 120
 gcggccaaag gcgggagagc agcttccaac cagaggcagg cttcgggcgg cgcgcagcat 180
 gcaccgtgca acgctacgca gcctgccggg atcccgggcc accaccccca ccaccacccc 240
 caccaccacc cccaccaccc ccagggctgt cccacggggc acccgcacca ccaccagccg 300
 gggccctcct ccccgagcca ggccaacgct gcgaggcagt gagcagcagc ccaccacccc 360
 caccatgcdc ccaaaaccca ctgcatcca gcccatcca ttccgcatgc aaggagccag 420
 tgggtgtacc gtggatgcdc aagggtgatg tgagcaccgt gaacccaac tacgccggcg 480
 gggagccaaa gcgctcccgg accgcctaca cccgccaaca agtgttggag ctggagaagg 540
 agttccatta caaccgctac ctgacccggc gccggagggt ggagatcgcc catgcactct 600
 gcctctccga gcgccaatc aagatctggt tccaaaaccg gcgcatgaag tggaagaagg 660
 atcataagtt gccaaacacc aagatccgct ccggggggggc agcaggctcc gccggggggc 720
 ccccaggccg gccaaacggg ggcccacgcg cactcgacga cgacgacaag ccaaccccaa 780
 cccaacctg g 791

REIVINDICACIONES

1. Método para potenciar la expresión y acumulación de un polipéptido heterólogo de interés en semillas de plantas, comprendiendo dicho método:
 - (a) transformar una célula vegetal con una secuencia de ADN que comprende un promotor específico de semilla operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para uno o más reguladores de la transcripción (TF), o parte(s) de los mismos, en el que dicho uno o más TF puede(n) ser una combinación quimérica de diferente(s) TF, que regulan la transcripción de uno o más genes endógenos que codifican para proteínas de almacenamiento de semillas, en el que la hebra transcrita de dicha secuencia puede suprimir, retardar o reducir de otra forma la expresión de una o más de dichas proteínas de almacenamiento de semillas en dicha célula vegetal, y
 - (b) seleccionar un promotor específico de semilla que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por dichos reguladores de la transcripción en (a), y
 - (c) transformar la misma u otra célula vegetal en (a) con una secuencia de ADN para dicho promotor específico de semilla en (b) operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido heterólogo de interés;
 - (d) regenerar una planta a partir de dicha(s) célula(s) huésped vegetal(es) transformada(s), y hacer crecer dicha planta en condiciones en las que dicha(s) secuencia(s) de ADN que codifican para uno o más TF, o parte(s) de los mismos, se transcribe, reduciendo de ese modo la expresión de dicho ARNm endógeno, reduciendo así la expresión de dichas proteínas de almacenamiento de semillas, y potenciando así la expresión y acumulación de dicho polipéptido heterólogo de interés.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la hebra transcrita de dicha secuencia que codifica para uno o más reguladores de la transcripción (TF) o parte(s) de los mismos puede(n) formar un ARN "horquilla" que puede suprimir, retardar o reducir de otra forma la expresión de una o más de dichas proteínas de almacenamiento de semillas en dicha célula vegetal.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha célula huésped vegetal se selecciona del grupo de plantas monocotiledóneas.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha célula huésped vegetal se selecciona del grupo de plantas monocotiledóneas que contiene cebada, maíz, trigo, avena y arroz.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho promotor seleccionado es un promotor de D-hordeína de cebada.
6. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha(s) secuencia(s) de ADN de la etapa (a) y dicha secuencia de ADN de la etapa (b) están operativamente unidas en una secuencia de ADN.
7. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha(s) secuencia(s) de ADN de la etapa (a) y dichas secuencias de ADN de la etapa (b) se introducen en la misma célula vegetal.
8. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha(s) secuencia(s) de ADN de la etapa (a) se introducen en el genoma de una primera célula huésped vegetal, y en el que dicha secuencia de ADN de la etapa (b) se introduce en el genoma de una segunda célula huésped vegetal.
9. Método según la reivindicación 8, en el que una primera planta transgénica se regenera a partir de dicha primera célula huésped vegetal y una segunda planta transgénica se genera a partir de dicha segunda célula huésped vegetal, y en el que una población de la progenie de plantas transgénicas se genera a partir de cruzamiento sexual entre dicha primera y dicha segunda planta transgénica.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha una o más proteína(s) de almacenamiento de semillas es una hordeína de cebada.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para un polipéptido heterólogo de interés codifica para una proteína del grupo de proteínas procariotas o eucariotas.
12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para un polipéptido heterólogo de interés codifica para una proteína de un organismo termófilo.
13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que dicha secuencia codifica para un módulo de unión a

hidrato de carbono (CBM).

- 5 14. Método según la reivindicación 11, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para una proteína procariota o eucariota se selecciona del grupo que consiste en secuencias de ADN que codifican para colágenos, colagenasa, polipéptidos de secuencia homeótica, anticuerpos monoclonales, anticuerpos secretados, anticuerpos de cadena sencilla, lectina de unión a manosa, pepsina, quimiotripsina, tripsina, caseína, hormona de crecimiento humana, albúmina sérica humana, insulina humana, celulasas, pectinasas, hemicelulasas, fitasas, hidrolasas, peroxidasas, fibrinógeno, factor IX, factor XIII, trombina, proteína C, xilanasas, isoamilasa, glucoamilasa, amilasa, lisozima, beta-glucanasa glucocerebrosidasa, 10 caseínas, lactasa, ureasa, glucosa isomerasa, invertasa, estreptavidina, esterases, fosfatasa alcalina, inhibidores de proteasa, papaína, cinasas, fosfatasa, desoxirribonucleasas, ribonucleasas, fosfolipasas, lipasas, lacasa, proteínas de seda de araña, proteínas anticongelantes, defensinas o péptidos antimicrobianos, factores de crecimiento y citocininas.
- 15 15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para una proteína eucariota es un gen B4 de secuencia homeótica (HoxB4) humano que codifica para una proteína HoxB4.
16. Método según la reivindicación 15, en el que dicha proteína HoxB4 tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 20 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para uno o más TF es una secuencia de ADN quimérica que comprende regiones de dos o más secuencias de ADN que codifican para los TF, o partes de los mismos.
- 25 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para un TF o parte del mismo comprende una región que codifica para un TF o parte del mismo del grupo de las proteínas bZIP.
- 30 19. Método según la reivindicación 18, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para una proteína BZIP comprende una secuencia de ADN seleccionada de
- a) una secuencia de ADN que codifica para la proteína BLZ1 de cebada o una parte de la misma;
- b) una secuencia de ADN que codifica para la proteína BLZ2 de cebada o una parte de la misma;
- 35 c) una combinación de a) y b).
- 40 20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha secuencia de ADN se selecciona de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y cualquier parte o combinación de las mismas.
- 45 21. Método según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para TF puede expresar un ARN horquilla (ARNhp) en dicha célula vegetal.
22. Método según la reivindicación 21, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para TF comprende una región o parte de la misma que codifica para un TF del grupo de las proteínas bZIP.
23. Método según la reivindicación 22, en el que dicha proteína bZIP se selecciona de BLZ1, BLZ2 y una combinación quimérica de BLZ1 y BLZ2.
- 50 24. Método según la reivindicación 23, en el que dicha secuencia de ADN comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y cualquier parte o combinación de las mismas.
- 55 25. Planta de cebada transgénica que se transforma con:
- a) una secuencia de ADN que comprende un promotor específico de semilla operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para uno o más reguladores de la transcripción (TF), o parte(s) de los mismos, que incluye una combinación quimérica de diferente(s) TF, que regulan la transcripción de uno o más genes endógenos que codifican para proteínas de almacenamiento de semillas,
- 60 b) un promotor específico de semilla que no tiene elementos que actúan en cis reconocidos por dichos reguladores de la transcripción operativamente unido a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga de interés,
- 65 expresando dicha planta en sus semillas dicha proteína heteróloga y expresando sustancialmente menos proteína de almacenamiento de semillas que una planta no recombinante correspondiente.

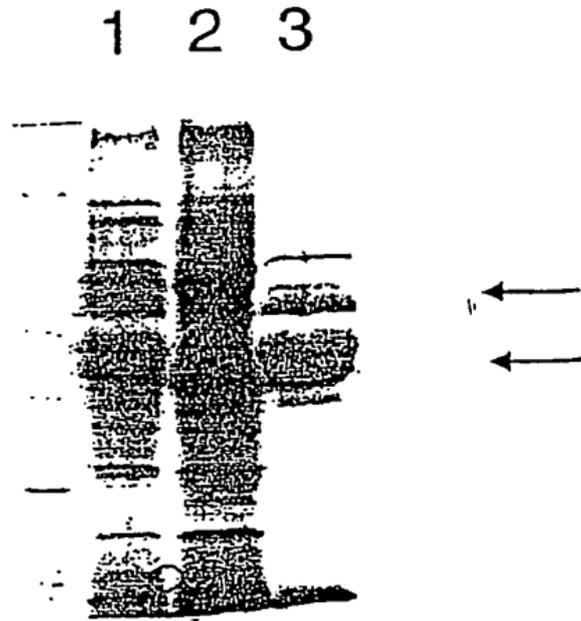
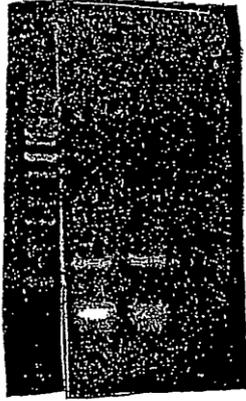


Figura 1

SM3H



a)

2a)

E/A



b)

2b)

Figura 2

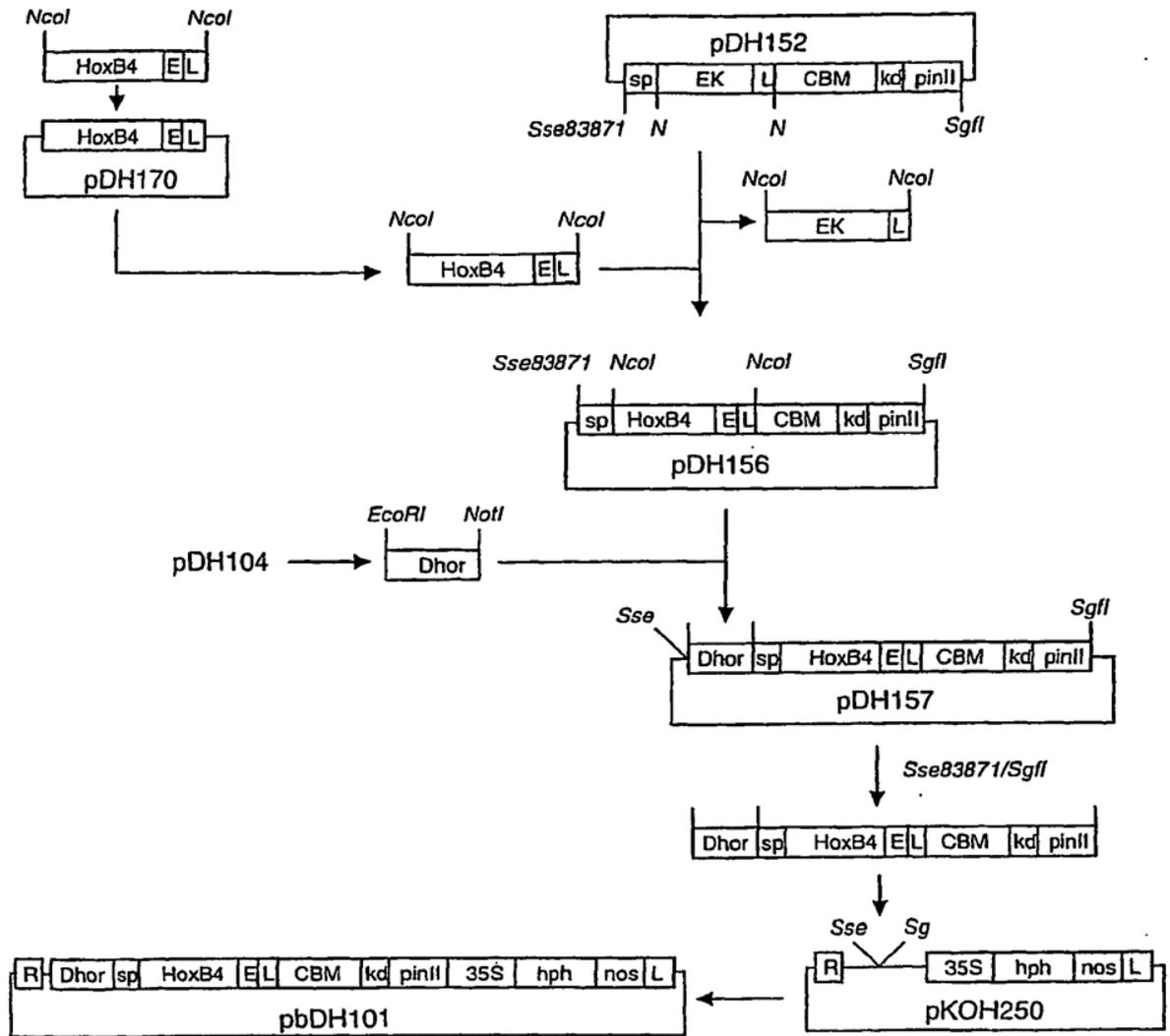
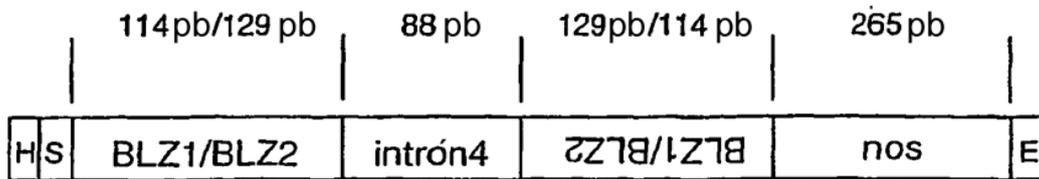


Figura 3



H = HindIII
S = SacII
E = EcoRI

Figura 4

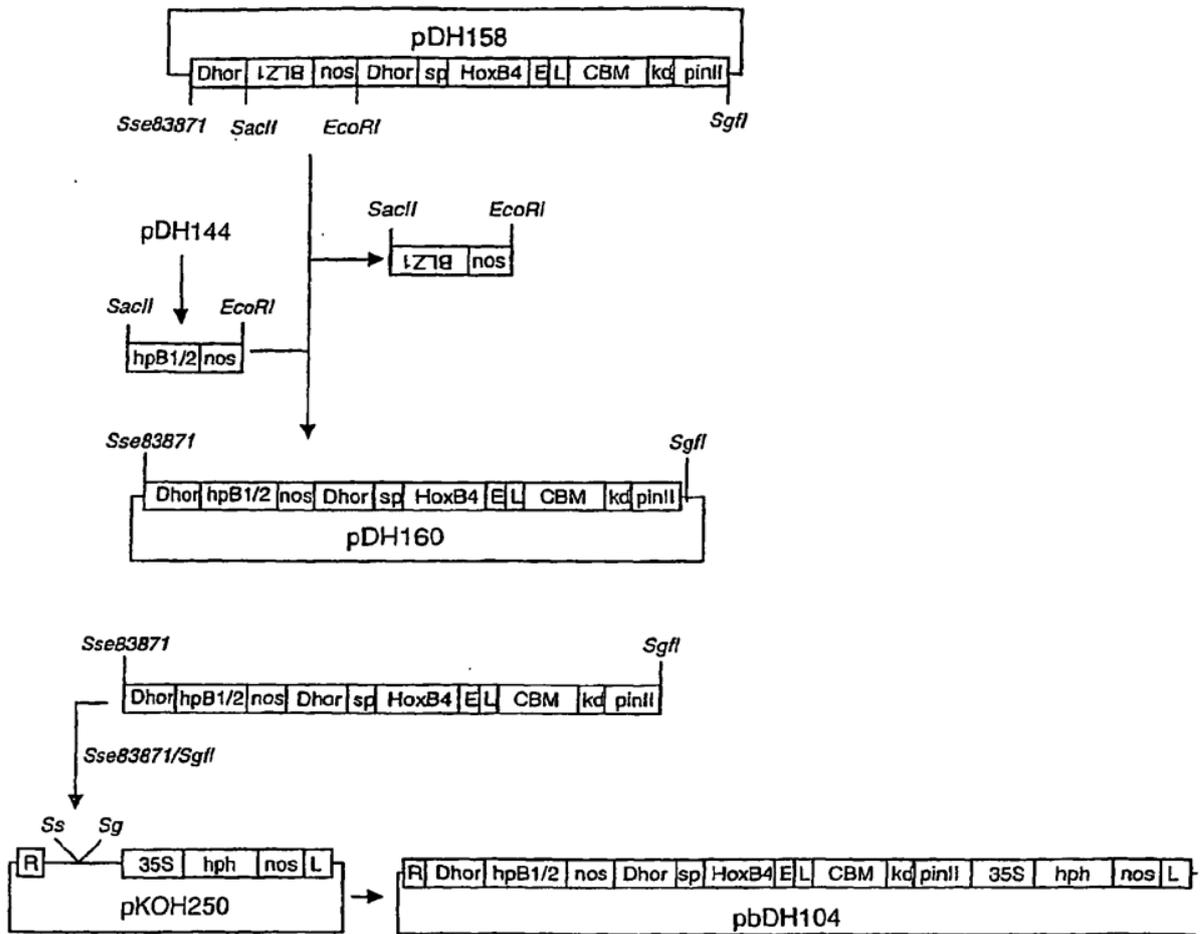


Figura 5