

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 901**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2005 E 05795356 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1786901**

54 Título: **Genes de inositol polifosfato 2-quinasa y sus usos**

30 Prioridad:

09.09.2004 US 608244 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.05.2013

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)
9330 Zionsville Road
Indianapolis IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**THOMPSON, MARK ALLEN;
SUN, YUEJIN;
BUTLER, HOLLY JEAN y
SHUKLA, VIPULA KIRAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 901 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

Genes de inositol polifosfato 2-quinasa y sus usos.

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular de plantas. Específicamente, la presente invención se refiere a la identificación y al uso de genes que codifican la enzima inositol polifosfato 2-quinasa (IPP2-K), que está implicada en el mecanismo de biosíntesis de ácido fítico en plantas, y al uso de dichos genes y sus mutantes para reducir los niveles de ácido fítico, y/o para aumentar los niveles de fósforo no incluido en ácido fítico en semillas de plantas y comida o piensos que contengan dicha semilla.

El papel del fósforo en la nutrición animal es bien conocido. El ochenta por ciento del fósforo del organismo de los animales se encuentra en el esqueleto, proporcionando estructura al animal. El veinte por ciento del fósforo presente en animales puede encontrarse en tejidos blandos, donde está implicado en una miríada de reacciones bioquímicas que incluyen la síntesis y la actividad de ADN, ARN, fosfolípidos y algunas vitaminas B.

Aunque el fósforo es crítico para la salud del animal, no todo el fósforo presente en el alimento está biodisponible. El 1,2,3,4,5,6-hexa-kis-fosfato de mio-inositol, conocido comúnmente como ácido fítico, es una molécula abundante en muchas semillas de plantas y tejidos vegetales tales como raíces y tubérculos. Las sales de ácido fítico (o fitatos) son la forma principal de almacenamiento de fósforo en semillas, representando típicamente entre el 65% y el 80% del fósforo total (P) de las semillas. Cuando los no rumiantes consumen dietas basadas en semillas, el ácido fítico consumido forma sales de varios minerales nutricionalmente importantes en el tracto digestivo. La excreción de dichas sales reduce la retención y la utilización (es decir, la biodisponibilidad) tanto del fósforo como de los minerales. Por consiguiente, esto da como resultado una deficiencia de minerales tanto en humanos como en animales alimentados con estas semillas. Además, el fósforo ligado a ácido fítico en los residuos de animales contribuye a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.

Se han propuesto varias estrategias para reducir el impacto negativo que tiene en la dieta, en la retención de fósforo y minerales y en el medio ambiente, el contenido en ácido fítico de las semillas. Las estrategias incluyen la eliminación del ácido fítico de la dieta mediante una intervención post-recolección y reducir genéticamente el contenido en ácido fítico. Semillas con un contenido reducido de ácido fítico son reivindicadas en la patente US 5.689.054 (maíz) y en la patente US 6.111.168 (soja). La alteración de los niveles de fitato mediante manipulación de mio-inositol 1-fosfato sintasa se discute en los documentos WO 00/73473, WO 99/05298, US 6.197.561 y US 6.291.224. La alteración de los niveles de fitato mediante desplazamiento en ononitol con inositol metil transferasa se discute en WO 99/37786. La patente US 6.197.561 propone cambiar los niveles de fitato a través de la alteración de una serie de enzimas adicionales, que incluyen fosfatidilinositol-3-quinasa, mio-inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinasa, mio-inositol monofosfatasa-3, inositol polifosfato 5-fosfatasa, D-mio-inositol-3-fosfato sintasa, D-mio-inositol trifosfato 3-quinasa, transportador de mio-inositol, fitasa de maíz, proteína de transferencia de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa, fosfolipasa específica de fosfatidilinositol, mio-inositol monofosfatasa-1, fosfatidilinositol 4-quinasa, fosfatidilinositol (4,5)bis-fosfato 5-fosfatasa, fosfatidilinositol sintasa. La expresión de plantas/semillas de fitasa, una enzima capaz de degradar fitatos, también se describe en las patentes US 6.399.861, US 6.303.766, US 5.994.628, US 5.714.474 y US 5.543.576. La patente US 2003/0009011 (WO 02/059324) describe genes de inositol polifosfato quinasa y su uso para modular los niveles de fitato, y adicionalmente proporciona las secuencias de consenso para identificar otros genes de inositol polifosfato quinasa. La patente US 2003/0079247 (WO 03/027243) describe genes adicionales de inositol polifosfato quinasa descritos como la familia de genes de inositol 1,3,4-trifosfato 5/6 quinasa. El mutante *ipa2* descrito en el documento US 5.689.054 contiene una mutación en un miembro de esta familia de genes (véase también Plant Physiol. 2003 Feb; 131(2): 507-15).

El documento US2004/0034888 describe una serie de secuencias de polinucleótidos vegetales. No se especifica ninguna utilidad particular para cada una de las secuencias incluidas.

Shi et al. (Plant Physiology, 2003, 131, 507-515) indican que un mutante de maíz particular bajo en ácido fítico se obtiene a través de una mutación en un gen de inositol fosfato quinasa.

Verbsky et al (J. Biol. Chem. 2002, 27, 35, 31857-31862) describen una secuencia de ADN genómico humano que codifica inositol 1,3,4,5,6-pentakis fosfato 2-quinasa humana.

A pesar de las anteriores estrategias, todavía existe una necesidad por mejorar el contenido nutricional de plantas, particularmente maíz, a través de la reducción de los niveles de ácido fítico y del aumento de los niveles de fósforo no incluido en ácido fítico.

La enzima IPP2-K cataliza múltiples etapas que conducen a la formación de ácido fítico. Por ejemplo, cataliza las reacciones de ATP + inositol 1,4,5,6-tetrakisfosfato → ADP + inositol pentakisfosfato, y ATP + inositol 1,3,4,5,6-pentakisfosfato → ADP + inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato. Adicionalmente, esta enzima cataliza las reacciones de ATP + inositol 1,4,6-trifosfato → ADP + inositol 1,2,6-trifosfato. Una reducción de la actividad de la enzima IPP2-K en semillas vegetales en desarrollo interrumpiría la síntesis de ácido fítico, reduciendo con ello el nivel de ácido fítico en las semillas y haciendo que el fósforo estuviera más disponible metabólicamente para animales a los que se alimenta con la semilla. La presente invención aborda la necesidad de mejorar la biodisponibilidad de fosfato proporcionando secuencias de ácido nucleico que codifican toda la enzima IPP2-K, o una porción de la misma, y las

herramientas para la manipulación del mecanismo biosintético de ácido fítico en las células vegetales.

Según la presente invención, se proporciona un polinucleótido vegetal aislado que codifica para una inositol polifosfato 2-quinasa, polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2.

5 La invención también se refiere a una proteína vegetal aislada de inositol polifosfato 2-quinasa que comprende un polipéptido que tiene la secuencia establecida en la SEC ID N°: 2.

Otro aspecto adicional de la presente invención es un método para identificar un tejido vegetal que comprende una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa de la presente invención, que comprende: someter a un tejido vegetal a mutagénesis; obtener una muestra de ADN del tejido vegetal sometido a mutagénesis o de sus descendientes; y ensayar la muestra de ADN para la lesión en el gen que codifica inositol polifosfato 2-quinasa.

10 Además, la presente invención se refiere a una semilla de maíz que contiene una lesión inducida artificialmente en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa de la presente invención, donde la lesión afecta a la actividad del gen que codifica la inositol polifosfato 2-quinasa y en donde la lesión inducida artificialmente es un bloqueo de gen.

15 En otra realización adicional, la presente invención está dirigida a un método para disminuir el nivel de ácido fítico en un pienso para animales, que comprende: producir un pienso para animales a partir de plantas que contienen una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa según la presente invención, en donde el pienso para animales tiene un nivel reducido de fitato.

20 La presente invención también se refiere a un método para disminuir el nivel de fósforo en un residuo animal que comprende: proporcionar pienso para animales procedente de una planta que incluye una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa según la presente invención.

Además, la presente invención abarca una semilla mutante no letal de una especie de planta cereal que se caracteriza por un bajo contenido en ácido fítico respecto a un germoplasma parental de la especie, en donde la semilla mutante tiene una actividad alterada de una inositol polifosfato 2-quinasa según la presente invención.

25 Adicionalmente, la presente invención se refiere a un anticuerpo purificado generado usando un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2 como un inmunógeno.

30 Asimismo, la presente invención se refiere a un método para aumentar el rendimiento de semillas de una planta, comprendiendo dicho método (1) integrar en el genoma de la planta un vector para la transformación de células vegetales que comprende (a) secuencias de nucleótidos antisentido sustancialmente complementarias a (i) una porción correspondiente de una cadena de una molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa, en donde la molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa se hibrida en condiciones de baja severidad con la SEC ID N°: 1 ó (ii) una porción correspondiente de una secuencia de ARN codificada por la molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa; y (b) secuencias reguladoras ligadas operativamente a las secuencias de nucleótidos antisentido de tal modo que las secuencias de nucleótidos antisentido son expresadas en una célula vegetal en la que son transformadas; y (2) cultivar dicha planta, mediante lo cual dichas secuencias de nucleótidos antisentido son transcritas y ligadas a dicha secuencia de ARN y se inhibe la expresión de un gen de inositol polifosfato 2-quinasa.

35 Otro aspecto adicional de la presente invención es un método para generar una planta mutante que tiene un rasgo deseado proporcionado por un bloqueo de gen en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa según la presente invención, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una recolección de polen vegetal o de semillas vegetales; tratar dicha recolección de polen vegetal o semillas vegetales con irradiación seleccionada del grupo que consiste en UV, irradiación gamma, rayos X y neutrones rápidos; y seleccionando las plantas mutantes que tengan el rasgo deseado.

40 FIGURA 1A: muestra la similitud de la IPP2-K de maíz reivindicada en la presente memoria con respecto a otras inositol quinazas de maíz. Un bajo nivel de similitud sugiere que la IPP2-K de maíz es una nueva inositol fosfato quinasa.

FIGURA 1B: muestra la relación filogenética entre las secuencias de proteína IPP2-K de maíz e inositol-fosfato quinazas de maíz y otras especies. Los genes de IPP2-K putativos procedentes de un amplio rango de especies (de humano a Arabidopsis) están estrechamente relacionados. Por el contrario, otras inositol fosfato quinazas se agrupan en diferentes ramas del árbol filogenético.

50 FIGURA 2: muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos predichas de genes de IPP2-K de plantas putativas.

FIGURA 3: muestra la organización génica de IPP2-K de la línea cultivada de maíz DAS 5XH751.

FIGURA 4: muestra la actividad *in vitro* de quinasa de la IPP2-K de maíz usando sustratos ³²P-γATP, IP4 e IP5 detectada con sustratos radiomarcados y TLC. La IPP2-K convierte inositol 1,4,5,6-tetrakisfosfato en inositol

pentakisfosfato, y convierte inositol 1,3,4,5,6-pentakisfosfato en fitato (inositol hexakisfosfato).

FIGURA 5: muestra la conversión *in vitro* de inositol 1,4,6-trifosfato en inositol 1,2,6-trifosfato en presencia de la enzima IPP2-K y ATP, detectada mediante RMN de ¹H.

5 FIGURA 6: muestra el espectro de RMN de fósforo de extracto de semilla de la línea cultivada de maíz DAS5XH751, que indica la presencia de especies de inositol fosfato.

SEC ID N°: 1: es la secuencia de nucleótidos para el ADNc que codifica una IPP2-K de maíz en semillas de la línea cultivada DAS5XH751.

SEC ID N°: 2: es la secuencia de aminoácidos deducida de una IPP2-K derivada de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1.

10 SEC ID N°: 3: es la secuencia de nucleótidos para el ADN genómico que codifica IPP2-K de la línea cultivada de maíz 5XH751.

En la presente memoria se proporcionan definiciones para facilitar el entendimiento de la invención. Las unidades, prefijos y símbolos pueden denotarse en su forma SI aceptada. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos están escritos de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente. Los intervalos numéricos recitados dentro de la especificación son inclusivos de los números que definen el intervalo, e incluyen todos los números enteros dentro del intervalo definido. Los aminoácidos pueden ser referidos en la presente memoria mediante sus símbolos de tres letras conocidos comúnmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la "IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission". Igualmente, los nucleótidos pueden ser referidos por sus códigos de una letra aceptados comúnmente. A menos que se proporcione otra cosa, los términos de software, eléctricos y electrónicos, tal como se usan en la presente memoria, son como se definen en "The New IEEE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms" (5ª edición, 1993). Los términos definidos a continuación se definen en mayor plenitud en referencia a la especificación como un conjunto.

15 "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a la totalidad o a una parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana (Patente de EE.UU. N° 5.107.065, incorporada aquí a modo de referencia). La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito de gen específico, es decir, en la secuencia 5' no codificadora, en la secuencia 3' no codificadora, en intrones o en la secuencia codificadora. "ARN funcional" se refiere a ARN sentido, ARN antisentido, ARN de ribozima, ARNi u otro ARN que no pueda no estar traducido pero que aún así tenga un efecto sobre procesos celulares.

20 El término "ADN complementario" (ADNc) se refiere a una molécula de ADN de cadena sencilla que puede formarse a partir de una plantilla de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se emplea un cebador complementario a porciones de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los especialistas en la técnica también emplean el término "ADNc" para referirse a una molécula de ADN de cadena doble derivada de una molécula de ARNm.

25 El término "contig" se refiere a un montaje de secuencias de ácido nucleico solapadas para formar una secuencia de nucleótidos contigua. Por ejemplo, se pueden comparar y alinear varias secuencias de ADN para identificar regiones comunes o solapantes. Las secuencias individuales se pueden montar entonces para producir una única secuencia de nucleótidos contiguos.

30 El término "expresión" se refiere a la transcripción y a la acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la invención. Expresión también se puede referir a la traducción de ARNm en un polipéptido. "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. "Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto génico en organismos que excede los niveles de producción de organismos normales o no transformados. La "co-supresión" se refiere a la producción de transcritos de ARN sentido capaces de suprimir la expresión de genes ajenos o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente de EE.UU. N° 5.231.020, incorporada a la presente memoria a modo de referencia).

35 Se pueden diseñar proteínas de unión a ADN que usan motivos de reconocimiento de dedo de zinc (ZF) para reconocer y modificar secuencias de ADN específicas o para cambiar la expresión. Dichos dedos de zinc (ZFs) modificados genéticamente se pueden usar para alterar directamente un gen en su entorno nativo cuando están ligados operativamente a una nucleasa (ZFNs). La ruptura con nucleasa de sitio preferente, o de sitio específico, mediada a través de la unión de ZF, puede producir cambios en la expresión o la actividad. Los cambios en genes diana pueden incluir sustituciones con ADN diseñado vía recombinación homóloga, y alteraciones génicas a partir de inserciones o eliminaciones. Ejemplos de cambios en el genoma mediados por ZFN se pueden encontrar en Biol Chem. 1999 Jul-Ago; 380(7-8): 841-848; Molecular and Cellular Biology 21(1): 289-297, 2001; Genetics 161: 1169-1175, 2002. Por el contrario, los ZFs pueden modular indirectamente la expresión y la actividad cuando se diseñan para actuar como factores de transcripción que interactúan con el gen en *trans*. Dichos ZFPs pueden diseñarse

- 5 para potenciar o para reducir la transcripción (referencias). La regulación de la expresión de ZFP puede ser constitutiva, específica de tejido, específica temporalmente o inducible. Ejemplos de cambios en la expresión mediados por ZFP se pueden encontrar en Proc. Nat. Acad. Sci. 99(20): 13290-13295, 2002; Proc. Nat. Acad. Sci. 99(20): 13296-13301, 2002; Plant Cell Physiol. 43(12): 1465-1472, 2002; revisión en Curr. Opin. Plant Biol. 6: 163-168, 2003.
- 10 El término "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificadoras) y que siguen (secuencias 3' no codificadoras) a la secuencia codificadora. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que derivan de fuentes diferentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente al que se da en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Una copia o copia adicional(es) de un gen endógeno puede(n) ser reintroducida(s) en el organismo hospedante en una localización cromosómica diferente, dando lugar a diferencias contextual y de nivel de expresión. Un gen "extraño" se refiere a un gen que normalmente no se encuentra en el organismo hospedante, pero que es introducido en el organismo hospedante mediante transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación.
- 15
- 20 El término "ADN genómico" se refiere a ADN cromosómico y puede incluir intrones. Un intrón es una secuencia de intervención. Es una secuencia no codificadora de ADN dentro de un gen que es transcrito en un ARN nuclear heterólogo (ARNnh) pero que a continuación es eliminado mediante división de ARN en el núcleo, dejando un ARNm maduro que a continuación es traducido en el citoplasma. Las regiones de los extremos de un intrón típicamente son auto-complementarias, lo que permite que se forme una estructura de horquilla de forma natural en el ARNnh.
- 25 La expresión "polinucleótido de inositol polifosfato 2-quinasa" o "polinucleótido de IPP2-K" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido con al menos actividades de inositol polifosfato 2-quinasa, o un polinucleótido capaz de modular la expresión de ARNm o proteína de IPP2-K en una célula hospedante. El término también incluye fragmentos, variantes, homólogos, alelos o precursores (por ejemplo, pre-proteínas o pro-proteínas) con una cualquiera de las actividades mencionadas anteriormente.
- 30 El término "IPP2-K" se refiere a inositol polifosfato 2-quinasa con respecto a cualquier ácido nucleico o polipéptido, o a la actividad funcional asociada. Las enzimas IPP2-K de la presente invención tienen una amplia especificidad de sustrato y pueden fosforilar varias especies de fosfato de inositol que incluyen, aunque sin limitación, trifosfato de inositol, tetrakisfosfato de inositol y pentakisfosfato de inositol, usando trifosfato de adenosina (ATP) como donante de fosfato, dando como resultado productos de difosfato de adenosina (ADP) y un fosfato de inositol fosforilado.
- 35 El término "aislado" se refiere a un material, tal como un ácido nucleico o proteína, que está: (1) sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente acompañan o interactúan con el material según se encuentra en su entorno natural, o (2) si el material está en su entorno natural, el material ha sido alterado mediante una intervención humana deliberada a una composición y/o ha sido colocado en una localización celular distinta a la localización nativa del material.
- 40 El término "lesión" se refiere a cualquier alteración de un ácido nucleico respecto a los ácidos nucleicos vegetales naturales. Por ejemplo, una lesión puede ser una eliminación, una inversión, una inserción, una duplicación, una transversión, una transición o una recolocación en una secuencia de ácido nucleico.
- El término "motivo" se refiere a regiones cortas de secuencias conservadas de ácidos nucleicos o aminoácidos que comprenden parte de una secuencia más larga.
- 45 La expresión "animal no rumiante" significa un animal con un estómago simple dividido en las regiones de esófago, cardias, fundus y píloro. Un animal no rumiante adicionalmente implica una especie de animal que no tiene un rumen funcional. Un rumen es una sección del sistema digestivo en la que la comida/alimento es empapada y sometida a digestión mediante microorganismos antes de pasar a través del tracto digestivo. Este fenómeno no se produce en un animal no rumiante. El término animal no rumiante incluye, aunque sin limitación, humanos, cerdos, aves de corral, gatos y perros.
- 50 El término "ácido fítico" se refiere a ácido mio-inositol tetrafosfórico, ácido mio-inositol pentafofórico, ácido mio-inositol hexafosfórico y sus derivados tales como: 5-pirofosfato-inositol (1,3,4,6) tetrakisfosfato, 5-pirofosfato-inositol (1,2,3,4,6) pentakisfosfato y 5,6-bis-pirofosfato-inositol (1,2,3,4) tetrakisfosfato. En forma de sal con cationes, el ácido fítico es "fitato".
- 55 El término "planta" incluye plantas y partes de plantas que incluyen, aunque sin limitación, células vegetales y tejidos vegetales tales como hojas, tallos, raíces, flores, polen y semillas. Las clases de plantas que pueden usarse en la presente invención generalmente son tan amplias como las clases de plantas superiores e inferiores susceptibles de mutagénesis, incluyendo angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), gimnospermas, helechos y

algas multicelulares.

El término "polinucleótido" se refiere a cualquier ácido nucleico e incluye polímeros sencillos o multi-cadena de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Los ácidos nucleicos también pueden incluir fragmentos y nucleótidos modificados. Por lo tanto, tal como se usan en la presente memoria, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable.

El término "promotor" se refiere típicamente a una secuencia de ADN que dirige la transcripción de un gen estructural para producir ARN. Típicamente, un promotor se localiza en la región de 500 pares base por encima de un gen, próxima al sitio de inicio de la transcripción. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la velocidad de la transcripción aumenta o disminuye en respuesta a un agente inductor exógeno o endógeno. Por el contrario, la velocidad de transcripción está regulada en menor grado por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo.

Las expresiones "región reguladora de la transcripción" y "región reguladora" se refieren a la sección de ADN que regula la transcripción génica. Una región reguladora puede incluir una variedad de elementos que actúan en cis, que incluyen, aunque sin limitación, promotores, potenciadores y elementos de respuesta a hormonas. Asimismo, puesto que se sabe que los intrones y el 5' UTR influyen en la transcripción, una región reguladora de la transcripción puede incluir dichas secuencias.

La expresión "sustancialmente similar" se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que cambios en una o más bases de nucleótido dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afectan a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN.

"Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que cambios en una o más bases de nucleótidos no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico para mediar en la alteración de la expresión génica mediante tecnología antisentido o de co-supresión. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención tales como la eliminación o la inserción de uno o más nucleótidos que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante, es decir la capacidad para mediar en la alteración de la expresión génica mediante tecnología antisentido o co-supresión, o la alteración de las propiedades funcionales de la molécula de proteína resultante. Por lo tanto, debe entenderse que la invención abarca más que los ejemplos específicos de secuencias.

Por ejemplo, es bien sabido en la técnica que la supresión antisentido y co-supresión de la expresión génica puede lograrse usando fragmentos de ácido nucleico que representan menos que la región codificadora completa de un gen, y mediante fragmentos de ácido nucleico que no compartan un 100% de identidad de secuencia con el gen que va a ser suprimido. Además, las alteraciones en un gen que dan como resultado la producción de un aminoácido equivalente químicamente en una localización dada, pero que no efectúan las propiedades funcionales de la proteína codificada, son bien conocidas en la técnica. Por tanto, un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrofóbico, puede ser sustituido por un codón que codifique otro residuo menos hidrofóbico, tal como glicina, o un residuo más hidrofóbico, tal como valina, leucina o isoleucina. De forma similar, también es de esperar que los cambios que dan como resultado la sustitución de un residuo cargado negativamente por otro, tal como ácido aspártico por ácido glutámico, o un residuo cargado positivamente por otro, tal como lisina por arginina, produzcan un producto funcionalmente equivalente. Asimismo, no sería de esperar que los cambios de nucleótidos que dan como resultado la alteración de las porciones N-terminal y C-terminal de la molécula de proteína alteren la actividad de la proteína. Cada una de las modificaciones propuestas se encuentra claramente dentro de la técnica rutinaria, como lo está la retención de la actividad biológica en los productos codificados.

Además, fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares también se pueden caracterizar por su capacidad para hibridarse, en condiciones severas (0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C), con los fragmentos de ácido nucleico descritos en la presente memoria.

Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares de la presente invención también se pueden caracterizar a través del porcentaje de similitud de las secuencias de aminoácidos que codifican con respecto a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria, determinado mediante algoritmos empleados habitualmente por los especialistas en esta técnica. Los preferidos son los ácidos nucleicos cuyas secuencias de nucleótidos codifican secuencias de aminoácidos que son similares en un 80% respecto a las secuencias de aminoácidos presentadas en la presente memoria. Los fragmentos de ácido nucleico más preferidos codifican secuencias de aminoácidos que son similares en al menos un 90% a las secuencias de aminoácidos presentadas en la presente memoria. Aún más preferidos son los fragmentos de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que son similares en un 95% a las secuencias de aminoácidos presentadas en la presente memoria. Los alineamientos de secuencia y los cálculos de porcentaje de similitud se llevaron a cabo usando programas del paquete GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI). El alineamiento múltiple de las secuencias se llevó a cabo usando el método Clustal de alineamiento (Higgins, D. G. y Sharp, P. M. (1989) CABIOS. 5: 151-153) con los parámetros por defecto (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10) (a partir de este punto, algoritmo Clustal). Los parámetros por defecto para los alineamientos por pares usando el método Clustal fueron KTUPLE 1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 y DIAGONALS SAVED=5.

Una "porción sustancial" de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se refiere a una parte suficiente de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o de la secuencia de nucleótidos de un gen que permita una identificación putativa de dicho polipéptido o gen, tanto mediante evaluación manual de la secuencia por un especialista en la técnica, como mediante comparación de secuencia automatizada con ordenador e identificación usando algoritmos tales como el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S.F., et al., (1993) J. Mol. Biol. 215: 403-410; véase también www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). En general, se necesita una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o de treinta o más nucleótidos para identificar putativamente un polipéptido o una secuencia de ácido nucleico como homóloga de una proteína o gen conocidos. Además, con respecto a las secuencias de nucleótidos, se pueden usar sondas de oligonucleótidos específicos de gen que comprendan 20-30 nucleótidos contiguos en los métodos dependientes de secuencia de identificación génica (por ejemplo, la hibridación Southern) y de aislamiento (por ejemplo, la hibridación in situ de colonias bacterianas o plaquetas bacteriófagas). Adicionalmente, se pueden usar oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en PCR a fin de obtener un fragmento de ácido nucleico particular que comprenda los cebadores. Por consiguiente, una "porción sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende una parte suficiente de la secuencia para permitir la identificación específica y/o el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico que comprenda la secuencia. La presente especificación incluye secuencias de nucleótidos o de aminoácidos parciales o completas que codifican una o más proteínas vegetales particulares. El especialista en la técnica, a partir de las secuencias incluidas en la presente memoria, puede usar las secuencias descritas, enteras o en una parte sustancial, para los propósitos conocidos por los especialistas en esta técnica. Por consiguiente, la presente invención comprende las secuencias completas tal como se presentan en el Listado de Secuencias anexo, así como las porciones sustanciales de dichas secuencias, tal como se ha definido anteriormente.

El término "variante" se refiere a secuencias sustancialmente similares. Generalmente, las variantes de secuencia de ácido nucleico de la invención tendrán al menos un 46%, 48%, 50%, 52%, 53%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de nucleótidos nativa, en donde el % de identidad de secuencia está basado en la secuencia completa y se determina mediante análisis GAP 10 usando los parámetros por defecto. Generalmente, las variantes de secuencias de polipéptido de la invención tendrán al menos aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con respecto a la proteína nativa, en donde el % de identidad de secuencia está basado en la secuencia completa y se determina mediante análisis GAP 10 usando los parámetros por defecto. GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970) para obtener el alineamiento de dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos.

El término "variante" también se refiere a secuencias sustancialmente similares que contienen secuencias de aminoácidos altamente similares a los motivos contenidos en la invención, y opcionalmente requeridas para la función biológica de la invención. De forma general, las variantes de secuencias de polipéptidos de la invención tendrán al menos un 85%, 90% ó 95% de identidad de secuencia con respecto a los residuos de aminoácido conservados en los motivos definidos.

Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular usadas en la presente memoria son bien conocidas en la técnica y se describen más detalladamente en Sambrook, J. & Russell, D.W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY 2001 (a partir de ahora "Sambrook").

Las variantes incluidas en la invención pueden contener sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales a las secuencias de ácido nucleico o polipéptido que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos de la secuencia codificada. Una "variante modificada conservativamente" es una alteración que da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Cuando el ácido nucleico se prepara o se altera sintéticamente, se pueden aprovechar las preferencias conocidas de codones del hospedante pretendido.

Los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para aislar ADN y genes que codifican proteínas homólogas de la misma u otras especies vegetales. El aislamiento de genes homólogos usando protocolos dependientes de secuencia es bien conocido en la técnica. Los ejemplos de protocolos dependientes de secuencia incluyen, aunque sin limitación, métodos de hibridación de ácido nucleico y métodos de amplificación de ADN y ARN como se demuestra a través de los diversos usos de tecnologías amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa, reacción en cadena de ligasa).

Por ejemplo, los genes que codifican otras inositol trifosfato quinasas, inositol tetrakisfosfato quinasas, inositol pentakisfosfato quinasas o inositol polifosfat 2-quinasas, tanto como ADNc como ADN genómico, podrían aislarse directamente usando los presentes fragmentos de ácido nucleico, en su totalidad o una porción, como sondas de hibridación de ADN para escrutar bibliotecas de cualquier planta deseada empleando la metodología bien conocida por los especialistas en la técnica. Se pueden diseñar y sintetizar sondas de oligonucleótidos específicas basadas en las presentes secuencias de ácido nucleico empleando métodos conocidos en la técnica (Sambrook). Además, las secuencias completas pueden usarse directamente para sintetizar sondas de ADN empleando métodos

conocidos por el especialista en la técnica tales como el marcado de ADN con cebador, la traducción de defectos o técnicas de marcado en los extremos, o sondas de ARN usando sistemas de transcripción in vitro disponibles.

Adicionalmente, se pueden diseñar y usar cebadores específicos para amplificar las secuencias de la presente, tanto en parte como en su totalidad. Los productos de amplificación resultantes se pueden marcar directamente durante las reacciones de amplificación o se pueden marcar después de las reacciones de amplificación, y se pueden usar como sondas para aislar ADNc de longitud completa o fragmentos genómicos en condiciones de severidad apropiada.

Adicionalmente, se pueden usar dos segmentos cortos de los presentes fragmentos de ácido nucleico en protocolos de reacción en cadena de polimerasa para amplificar fragmentos de ácido nucleico más largos que codifican genes homólogos de ADN o ARN. También se puede llevar a cabo la reacción en cadena de polimerasa en una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico clonado en donde la secuencia de un cebador se deriva de los presentes fragmentos de ácido nucleico, y la secuencia de otro cebador aprovecha la presencia de los rasgos de ácido poliadenílico hasta el extremo 3' del precursor de ARNm que codifica genes vegetales. Alternativamente, la secuencia del segundo cebador se puede basar en secuencias derivadas del vector de clonación. Por ejemplo, el especialista en la técnica puede seguir el protocolo RACE (Frohman et al., (1988) PNAS USA 85: 8998) para generar ADNc usando PCR para amplificar copias de la región entre un único punto del transcrito en el extremo 3' ó el 5'. Los cebadores orientados en las direcciones 3' y 5' se pueden diseñar a partir de las presentes secuencias. Usando sistemas 3' RACE ó 5' RACE disponibles comercialmente (Invitrogen, Carlsbad, CA), se pueden aislar fragmentos de ADNc 3' ó 5' específicos (Ohara et al., (1989) PNAS USA 86: 5673; Loh et al., (1989) Science 243: 217). Los productos generados mediante los procedimientos 3' y 5' RACE se pueden combinar para generar ADNc de longitud completa (Frohman, M. A. y Martin, G. R., (1989) Techniques 1: 165).

La disponibilidad del presente nucleótido y secuencias de aminoácido deducidas facilita el escrutinio inmunológico de bibliotecas de expresión de ADNc. Se pueden sintetizar péptidos sintéticos que representen porciones de las secuencias de aminoácidos de la presente. Dichos péptidos se pueden usar para inmunizar animales para producir anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidad para péptidos o proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos. Dichos anticuerpos pueden usarse a continuación para escrutar bibliotecas de expresión de ADNc para aislar clones de ADNc de longitud completa de interés (Lerner, R. A. (1984) Adv. Immunol. 36: 1; Sambrook).

Los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención se pueden usar para crear plantas transgénicas en las que la enzima de inositol polifosfato 2-quinasa descrita esté presente en niveles inferiores a lo normal.

La reducción o la eliminación de la expresión de genes que codifican inositol polifosfato 2-quinasa en plantas son deseables para algunas aplicaciones. Para lograrlo, se puede construir un gen quimérico diseñado para la co-supresión de la presente enzima biosintética de ácido fítico uniendo un gen o fragmento de gen que codifique una inositol polifosfato 2-quinasa a secuencias promotoras de la planta. Alternativamente, se puede construir un gen quimérico diseñado para expresar ARN antisentido para el total o una parte del fragmento de ácido nucleico de la presente ligando operativamente el gen o fragmento génico en orientación inversa a las secuencias promotoras de la planta. Tanto la co-supresión como los genes quiméricos antisentido podrían introducirse en plantas mediante una transformación en la que se reduzca o elimine la expresión de los correspondientes genes endógenos.

Una metodología alternativa para lograr el bloqueo génico implica el uso de interferencia de ARN (iARN) y silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) [Fraser et al. (2000), Nature, 408, 325-330; Gonczy et al. (2000), Nature, 408 (331-336)]. La introducción de ARN de cadena doble (ARNds) en las células de estos organismos conduce a la degradación específica de secuencia de transcritos de genes homólogos. Las moléculas de ARN de cadena doble larga son reducidas a ARNs interferentes pequeños de 21-23 nucleótidos (ARNsi) mediante la acción de una ribonucleasa endógena, Dicer. (Bernstein et al. (2001), Nature, 409, 363-366; Grishok et al. (2000), Science, 287 (5462), 2494-7; Zamore et al. (2000), Cell, 101(1), 25-33; Knight, S. W. y B. L. Bass. (2001), Science, 293 (5538), 2269-2271).

La presente inositol polifosfato 2-quinasa (o porciones de la misma) puede producirse en células hospedantes heterólogas, particularmente en las células de hospedantes microbianos, y puede usarse para preparar anticuerpos para dichas proteínas mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Los anticuerpos son útiles para detectar inositol polifosfato 2-quinasa in situ en células o in vitro en extractos celulares. Las células hospedantes heterólogas preferidas para la producción de la presente inositol polifosfato 2-quinasa son los hospedantes microbianos. Los sistemas de expresión y los vectores de expresión microbianos que contienen secuencias reguladoras que dirigen un elevado nivel de expresión de proteínas extrañas son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Se podría usar cualquiera de ellos para construir un gen quimérico para la producción de la presente inositol polifosfato 2-quinasa. Dicho gen quimérico podría entonces introducirse en microorganismos apropiados mediante transformación para proporcionar un elevado nivel de expresión de la enzima biosintética de ácido fítico codificada.

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden prepararse usando (a) métodos recombinantes estándares, (b) técnicas sintéticas, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de

la presente invención se pueden clonar, amplificar o, en su caso, construir a partir de una monocotiledónea o una dicotiledónea. Los ejemplos típicos de monocotiledóneas son maíz, sorgo, cebada, trigo, mijo, arroz o césped. Las dicotiledóneas típicas incluyen soja, alazor, girasol, canola, alfalfa, patata o tapioca.

- 5 Los fragmentos funcionales incluidos en la invención pueden obtenerse usando cebadores que se hibriden selectivamente en condiciones de severidad. Generalmente, los cebadores tienen una longitud de al menos 12 bases y pueden llegar a tener hasta 200 bases, pero generalmente tienen entre 15 y 75 bases, o más probablemente entre 15 y 50 bases. Se pueden identificar fragmentos funcionales usando una variedad de técnicas tales como análisis de restricción, análisis Southern, análisis de extensión de cebador, PCR y análisis de secuencia de ADN.
- 10 La presente invención incluye una pluralidad de polinucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos idéntica. La degeneración del código genético permite tales "variaciones silenciosas" que pueden usarse, por ejemplo, para hibridar y detectar selectivamente variantes alélicas de polinucleótidos de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención incluye ácidos nucleicos aislados que comprenden variantes alélicas. El término "alelo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un ácido nucleico relacionado del mismo gen.
- 15 Las variantes de ácidos nucleicos incluidas en la invención se pueden obtener, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a oligonucleótido, mutagénesis de barrido de ligando, mutagénesis que emplea reacción en cadena de polimerasa, y otras similares. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Brent et al., Eds., Wiley and Sons, Nueva York (2003) (a partir de este punto denominado Brent). También, véase de forma general McPherson (ed.), DIRECTED MUTAGENESIS: A Practical Approach, (IRL Press, 1991). Por tanto, la presente
- 20 invención también abarca moléculas de ADN que comprenden secuencias de nucleótido que tienen una similitud de secuencia sustancial con las secuencias de la invención.

Con respecto a las secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas conservativamente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican variantes idénticas o modificadas conservativamente de las

25 secuencias de aminoácidos. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que la alanina esté especificada por un codón, el codón se puede alterar por cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas" y representan una especie de

30 variación modificada conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido también describe, en referencia al código genético, cualquier posible variación silenciosa del ácido nucleico. El especialista en la técnica reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto el AUG, que ordinariamente es el único codón para la metionina; y el UGG, que ordinariamente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención está implícita en cada secuencia

35 de polipéptido descrita y queda dentro del alcance de la invención reivindicada.

Como en las secuencias de aminoácidos, el especialista en la técnica reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales realizadas en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añadan o eliminen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia

40 codificada es una "variante modificada conservativamente" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Por tanto, de este modo se pueden alterar cualquier número de residuos de aminoácido seleccionado del grupo de números enteros que va de 1 a 50. De este modo, por ejemplo, se pueden realizar 1, 2, 3, 14, 25, 37, 45 ó 50 alteraciones. Las variantes modificadas conservativamente típicamente proporcionan una actividad biológica similar a la de la secuencia de polipéptido no modificada a partir de la cual se derivan. Por ejemplo, la especificidad de sustrato, la actividad enzimática o la unión a ligando/receptor

45 generalmente es al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% de la proteína nativa para su sustrato nativo. En la técnica son bien conocidas las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares.

Por ejemplo, los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre ellos:

- 50 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 55 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Véase también Creighton (1984) *Proteins* W. H. Freeman and Company. También se pueden usar otros modelos de sustitución conservativa aceptables conocidos en la técnica, tales como las matrices de puntuación de programas de comparación de secuencias como el paquete GCG, BLAST o CLUSTAL, por ejemplo.

5 La invención reivindicada también incluye “barajados” producidos mediante barajado de secuencia de los polinucleótidos de la invención para obtener una característica deseada. El barajado de secuencias se describe en la publicación PCT N° 96/19256. Véase también, Zhang, J. H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504-4509 (1997).

10 La presente invención también incluye el uso de regiones 5' UTR y/o 3' UTR para la modulación de la transcripción o la traducción de secuencias codificadoras heterólogas. Los motivos de secuencia positivos incluyen secuencias de consenso de inicio transcripcional (Kozak, *Nucleic Acids Res.* 15: 8125 (1987)) y la estructura de tapón de 7-metilguanosa (Drummond et al., *Nucleic Acids Res.* 13: 7375 (1985)). Los elementos negativos incluyen estructuras tallo-lazo 5' UTR intramoleculares estables (Muesing et al., *Cell* 48: 691 (1987)) y secuencias AUG o marcos de lectura abiertos cortos precedidos de un AUG apropiado en el 5' UTR (Kozak, ver anterior, Rao et al., *Mol. Cell. Biol.* 8: 284 (1988)).

15 Además, los segmentos que codifican polipéptidos de los polinucleótidos de la presente invención pueden modificarse para alterar el uso de codones. El uso de codones alterados se puede emplear para alterar la eficacia traduccional. El uso de codones en las regiones codificadoras de los polinucleótidos de la presente invención se puede analizar estadísticamente usando paquetes de software disponibles comercialmente tales como “Codon Preference” disponible en GCG, el Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin (véase Devereaux et al., *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395 (1984)).

20 Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la invención o sus contrapartidas antisentido se pueden optimizar para obtener una expresión mejorada en plantas de interés. Véase, por ejemplo, Perlak et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328; y Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477-498, cuyas descripciones se incorporan aquí a modo de referencia. De esta manera, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando codones preferidos para plantas.

25 La presente invención proporciona subsecuencias que comprenden ácidos nucleicos aislados que contienen al menos 20 bases contiguas de las secuencias reivindicadas. Por ejemplo, el ácido nucleico aislado incluye aquellos que comprenden al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 ó 30 2000 nucleótidos contiguos de las secuencias reivindicadas. Las subsecuencias del ácido nucleico aislado se pueden usar para modular o detectar la expresión génica introduciendo en las subsecuencias compuestos que se unen, se intercalan, rompen y/o se reticulan con los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos de la invención reivindicada pueden comprender de forma conveniente un sitio de multi-clonación que comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasa insertados en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. Asimismo, se pueden insertar secuencias traducibles para ayudar al 35 aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexahistidina, o una secuencia de fusión GST, proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la invención reivindicada.

Un polinucleótido de la invención reivindicada se puede unir a un vector, adaptador, promotor, péptido transit o ligando para la clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente invención. Se pueden añadir secuencias a dichas secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar 40 en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y ligandos es bien conocido y está descrito extensivamente en la técnica. Para una descripción de dichos ácidos nucleicos véase, por ejemplo, Stratagene Cloning Systems, Catálogos 2004 (La Jolla, California); y Amersham BioSciences, Inc., Catálogo 2004 (Piscataway, NJ).

45 Las composiciones de ácido nucleico aislado de esta invención, tal como ARN, ADNc, ADN genómico o un híbrido de los mismos, se pueden obtener a partir de fuentes biológicas vegetales usando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por los especialistas en la técnica. En algunas realizaciones, se usan sondas de oligonucleótidos que se hibridan selectivamente, en condiciones severas, a los polinucleótidos de la presente invención para identificar la secuencia deseada en un ADNc o en una biblioteca de ADN genómico.

50 Los ejemplos de protocolos de aislamiento de ARN total y de ARNm se describen en *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark, Ed., Springer-Verlag, Berlín (1997); y Brent. Existen disponibles comercialmente kits de aislamiento de ARN total y ARNm de comercializadores tales como Stratagene (La Jolla, California), Clontech (Palo Alto, California), Amersham Biosciences (Piscataway, N.J.) y 5'-3' (Paoli, Pa). Véase también las Patentes de EE.UU. N° 5.614.391 y 5.459.253.

55 Los protocolos de síntesis de ADNc típicos son bien conocidos por el especialista en la técnica y se describen en referencias estándar tales como: *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark, Ed., Springer-Verlag, Berlín (1997); y Brent. Existen kits de síntesis de ADNc disponibles en una serie de comercializadores tales como Stratagene o Pharmacia.

Un ejemplo de método para construir una biblioteca de ADNc de longitud completa pura de más del 95% se describe en Caminci et al., *Genomics* 37: 327-336 (1996). En la técnica se conocen bien otros métodos para producir bibliotecas de longitud completa. Véase, por ejemplo, Ebery et al., *Mol. Cell Biol.* 15(6): 3363-3371 (1995); y la Solicitud de Patente PCT WO 96/34981.

- 5 A menudo es conveniente normalizar una biblioteca de ADNc para crear una biblioteca en la que cada clon está representado más igualmente. En la técnica se conocen una serie de estrategias para normalizar bibliotecas de ADNc. La construcción de bibliotecas normalizadas se describe en Lo, *Nucl. Acids. Res.* 18(19): 5705-5711 (1990); Patanjali et al., *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 88: 1943-1947 (1991); Patentes de EE.UU. N° 5.482.685 y 5.637.685; y Soares et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9228-9232 (1994).
- 10 Las bibliotecas de ADNc sustraídas son otro medio para incrementar la proporción de las especies de ADNc menos abundantes. Véase Foote et al. en *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark, Ed. Springer-Verlag, Berlín (1997); Kho y Zarbl, *Technique* 3(2): 58-63 (1991); Sive y St. John, *Nucl. Acids Res.* 16(22): 10937 (1988); Brent; y Swaroop et al., *Nucl. Acids Res.* 19(8): 1954 (1991). Existen kits de sustracción de ADNc disponibles comercialmente. Véase, por ejemplo, PCR-Select (Clontech).
- 15 Para construir bibliotecas genómicas, se generan grandes segmentos de ADN genómico mediante fragmentación aleatoria. Los ejemplos de técnicas de biología molecular apropiadas y de instrucciones se encuentran en Sambrook y en *Methods in Enzymology*, Vol. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Berger y Kimmel, Eds., San Diego: Academic Press, Inc. (1987), Brent; *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark, Ed., Springer-Verlag, Berlín (1997). También existen disponibles comercialmente kits para la construcción de bibliotecas genómicas.
- 20 El ADNc o la biblioteca genómica se pueden escrutar usando PCR directamente con métodos conocidos por los especialistas en la técnica, o usando una sonda basada en la secuencia de un ácido nucleico de la presente invención tal como las descritas en la presente memoria. Las sondas se pueden usar para hibridarse con ADN genómico o con secuencias de ADNc para aislar polinucleótidos homólogos en la misma o diferente especie vegetal. Los especialistas en la técnica apreciarán que se pueden emplear diversos grados de severidad de hibridación en el
- 25 ensayo; y que tanto la hibridación como el medio de lavado pueden ser severos. El grado de severidad se puede controlar mediante la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturalizante tal como formamida.
- Típicamente, las condiciones de hibridación severas serán aquellas en las que la concentración salina sea inferior a aproximadamente 1,5 M de iones de Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones
- 30 de Na (o de otras sales) a pH entre 7,0 y 8,3, y la temperatura es al menos de aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos de aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, de más de 50 nucleótidos). Las condiciones severas también se pueden alcanzar mediante la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.
- Los ejemplos de condiciones de baja severidad incluyen la hibridación con una disolución tampón de 30 a 35% de
- 35 formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS (dodecilsulfato sódico) a 37°C, y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC=3,0 M NaCl/0,3 M citrato trisódico) a 50°C. Los ejemplos de condiciones de severidad moderada incluyen la hibridación en 40 a 45% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0,5X a 1X SSC a 55°C. Los ejemplos de condiciones de alta severidad incluyen la hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0,1X SSC a 60°C. Típicamente el tiempo de hibridación va de 4 a 16 horas.
- 40 Se puede encontrar una guía intensiva para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte 1, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y. (1993); y en Brent. A menudo, las bibliotecas de ADNc estarán normalizadas para aumentar la representación de ADNc relativamente raros.
- 45 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden amplificar a partir de muestras de ácido nucleico, tales como muestras de ácido nucleico vegetal, usando técnicas de amplificación. Por ejemplo, se puede usar tecnología de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y polinucleótidos relacionados directamente a partir de bibliotecas de ADN, bibliotecas de ADNc o una biblioteca
- 50 construida generalmente a partir de transcritos nucleares en cualquier etapa del procesado con intrones. Las bibliotecas se pueden preparar a partir de una variedad de tejidos vegetales tales como espigas, hojas, tallos, raíces, polen o semillas. También puede ser útil la PCR y otros métodos de amplificación in vitro, por ejemplo para clonar secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas que se van a expresar, para preparar ácidos nucleicos para su uso como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en las muestras, para secuenciamiento de ácido nucleico, o para otros propósitos.
- 55 Ejemplos de técnicas útiles para los métodos de amplificación in vitro se pueden encontrar en Berger, Sambrook y Brent, así como en Mullis et al., Patente de EE.UU. N° 4.683.202 (1987); y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., Eds., Academic Press Inc., San Diego, California (1990). En la técnica se conocen kits disponibles comercialmente para la amplificación PCR. Véase, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit

(Clontech). La proteína 32 de gen T4 (Boehringer Mannheim) se puede usar para mejorar el rendimiento de productos de PCR largos. También se han descrito métodos de escrutinio basados en PCR. Wilfinger et al. describen un método basado en PCR en el que el ADNc de mayor longitud se identifica en la primera etapa, de tal modo que se pueden eliminar los clones incompletos del estudio. *BioTechniques*, 22(3): 481-486 (1997).

5 Alternativamente, las secuencias de la invención se pueden usar para aislar las secuencias correspondientes en otros organismos, particularmente en otras plantas, más particularmente, otras monocotiledóneas. De esta manera, métodos tales como PCR, hibridación y similares, se pueden usar para identificar las secuencias que tengan una similitud de secuencia sustancial con respecto a las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook e
10 Innis et al. (1990), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nueva York). La presente invención abarca las secuencias codificadoras aisladas en base a su identidad de secuencia con respecto a las secuencias codificadoras de la invención presentadas en la presente memoria, o con respecto a fragmentos de las mismas.

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también se pueden preparar mediante síntesis química directa empleando métodos tales como el método de fosfodiéster de Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68: 90-99 (1979);
15 el método de fosfodiéster de Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68: 109-151 (1979); el método de dietilfosforamida de Beaucage et al., *Tetra. Lett.* 22: 1859-1862 (1981); el método de triéster de fosforamida en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetra. Lett.* 22(20): 1859-1862 (1981), por ejemplo usando un sintetizador automatizado, por ejemplo como se describe en Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.* 12: 6159-6168 (1984); y el método de soporte sólido de la Patente de EE.UU. N° 4.458.066. La síntesis química generalmente produce un
20 oligonucleótido de cadena sencilla. Éste puede convertirse en ADN de cadena doble mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como plantilla. El especialista reconocerá que aunque la síntesis química de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias de mayor tamaño mediante ligación de secuencias más cortas.

25 La totalidad o una porción sustancial de los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención también se pueden usar como sondas para el mapeado genético o físico de genes de los cuales forman parte, y como marcadores para rasgos ligados a dichos genes. Dicha información puede ser útil en el cultivo de plantas con el fin de desarrollar líneas con fenotipos deseados. Por ejemplo, los fragmentos de ácido nucleico de la presente se pueden usar como marcadores de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). El análisis de tinción
30 Southern (Sambrook) de ADN genómico vegetal digerido por restricción puede evaluarse con los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención. Los modelos de bandas resultantes se pueden someter entonces a análisis genético usando programas de ordenador tales como MapMaker (Lander et al., (1987) *Genomics* 1: 174-181) para construir un mapa genético. Adicionalmente, los fragmentos de ácido nucleico de la presente invención se pueden usar como sonda en análisis de tinción Southern que contengan ADNs genómicos tratados con endonucleasa de
35 restricción procedentes de un grupo de individuos que representen la línea parental y la progenie de un cruce genético definido. Se anota la segregación de los polimorfismos de ADN y se usa para calcular la posición de la secuencia de ácido nucleico de la invención en el mapa genético obtenido previamente usando esta población (Botstein, D. et al., (1980) *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331).

40 La producción y uso de sondas derivadas de genes vegetales para uso en mapeado genético se describe en R. Bematzky, R. y Tanksley, S.D. (1986) *Plant Mol. Biol. Reporter* 4(1): 37-41. Numerosas publicaciones describen el mapeado genético de clones de ADNc específicos que usan la metodología descrita anteriormente o variaciones de la misma. Por ejemplo, para el mapeado se pueden usar poblaciones inter cruzadas F2, poblaciones de retrocruzado, poblaciones emparejadas aleatoriamente, líneas isogénicas próximas y otros conjuntos de individuos. Dichas metodologías son bien conocidas por los especialistas en la técnica.

45 Las sondas de ácido nucleico de las secuencias de ácido nucleico de la presente también pueden usarse para el mapeado físico (es decir, la colocación de secuencias sobre mapas físicos; véase Hoheisel, J. D. et al., en: *Nonmammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*, Academic Press 1996, páginas 319-346, y las referencias citadas ahí).

50 En otra realización, las sondas de ácido nucleico derivadas de las secuencias de ácido nucleico de la presente se pueden usar en un mapeado de hibridación in situ de fluorescencia directa (FISH) (Trask, B. J. (1991) *Trends Genet.* 7: 149-154). Aunque los métodos actuales de mapeado FISH favorecen el uso de clones grandes (de varios a varios centenares de KB; véase Laan, M. et al. (1995) *Genome Research* 5: 13-20), las mejoras en la sensibilidad pueden permitir la realización del mapeado FISH usando sondas más cortas.

55 Usando las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden llevar a cabo una serie de métodos basados en amplificación de ácido nucleico para el mapeado genético y físico. Los ejemplos incluyen la amplificación específica de alelo (Kazazian, H. H. (1989) *J. Lab. Clin. Med.* 114(2): 95-96), el polimorfismo de fragmentos amplificados mediante PCR (CAPS; Sheffield, V. C. et al. (1993) *Genomics* 16: 325-332), la ligación específica de alelo (Landegren, U. et al. (1988) *Science* 241: 1077-1080), las reacciones de extensión de nucleótido (Sokolov, B. P. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18: 3671), el Mapeado Híbrido de Radiación (Walter, M. A. et al. (1997) *Nature Genetics* 7: 22-28) y el Mapeado Feliz (Dear, P. H. y Cook, P. R. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 6795-6807).
60

Para estos métodos, la secuencia de un fragmento de ácido nucleico se usa para diseñar y producir pares de cebador para su uso en la reacción de amplificación o en reacciones de extensión de cebador. El diseño de dichos cebadores es bien conocido por los especialistas en la técnica. En los métodos que emplean el mapeado genético basado en PCR, puede ser necesario identificar diferencias en la secuencia de ADN entre los originales del cruce de mapeado en la región correspondiente a la secuencia de ácido nucleico de la presente. Sin embargo, generalmente esto no es necesario para los métodos de mapeado.

La pérdida de fenotipos mutantes de función puede identificarse para los clones de ADNc de la presente invención mediante protocolos de alteración de genes diana o mediante la identificación de mutantes específicos para dichos genes contenidos en poblaciones que portan mutaciones en todos los genes posibles (Ballinger y Benzer, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9402; Koes et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8149; Bensen et al., (1995) Plant Cell 7: 75). Esta última estrategia puede llevarse a cabo de varias formas. En primer lugar, se pueden usar los segmentos cortos de los fragmentos de ácido nucleico de la presente en protocolos de reacción en cadena de polimerasa en conjunción con un cebador de secuencia de marcado de mutación sobre ADNs preparados a partir de una población de plantas en las que se han introducido transposones Mutator o algún otro elemento de ADN que provoca mutación (véase Bensen, ver anterior). La amplificación de un fragmento de ADN específico con estos cebadores indica la inserción del elemento de marca de mutación en un gen vegetal, o cerca de él, que codifica la inositol polifosfato 2-quinasa. Alternativamente, el fragmento de ácido nucleico de la presente puede usarse como sonda de hibridación frente a productos de amplificación de PCR generados a partir de la población de mutación usando el cebador de secuencia de marca de mutación en conjunción con un cebador de sitio genómico arbitrario, tal como para un sitio de enzima de restricción-adaptador sintético anclado. En tercer lugar, las mutaciones pueden mapearse dentro de genes específicos usando endonucleasas de cadena sencilla capaces de romper en las zonas de falta de coincidencia (Till et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32: 2632-41), un método conocido como TILLING. Finalmente, se pueden identificar las eliminaciones usando métodos de PCR conocidos por los especialistas en la técnica, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. 20050053975 y como se indica en los ejemplos de la presente memoria. Con cada método, se puede identificar y obtener una planta que contiene una mutación en el gen endógeno que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa. Esta planta mutante a continuación puede usarse para determinar o confirmar la función natural del producto génico.

Las proteínas de la presente invención incluyen proteínas que tienen las secuencias descritas, así como proteínas codificadas por los polinucleótidos descritos. Adicionalmente, las proteínas de la presente invención incluyen proteínas derivadas de la proteína nativa por eliminación, adición o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, polimorfismo genético o manipulación humana. Los métodos para dichas manipulaciones son conocidos de forma general en la técnica.

Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácido del polipéptido se pueden preparar mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica la proteína nativa de interés. Los métodos para la mutagénesis y alteraciones de secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol. 154: 367-382; Sambrook; Patente de EE.UU. N° 4.873.192; y las referencias citadas ahí; incorporadas a la presente memoria a modo de referencia. Los especialistas en la técnica comprenderán fácilmente las guías sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés. Pueden ser preferibles las sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido por otro que tenga propiedades similares.

A la hora construir variantes de las proteínas de interés, las modificaciones de las secuencias de nucleótidos que codifican las variantes se pueden realizar de forma general de tal modo que las variantes continúen poseyendo la actividad deseada. Las proteínas aisladas de la presente invención incluyen un polipéptido que comprende al menos 25 aminoácidos contiguos codificados por uno cualquiera de los ácidos nucleicos de la presente invención, o polipéptidos que son variantes modificadas conservativamente de los mismos. Las proteínas de la presente invención, o las variantes de las mismas, pueden comprender cualquier número de residuos de aminoácido contiguos procedentes de un polipéptido de la presente invención, en donde dicho número se selecciona del grupo de números enteros que consiste en entre 25 y el número de residuos de un polipéptido de longitud completa de la presente invención. Opcionalmente, esta subsecuencia de aminoácidos contiguos tiene una longitud de al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 aminoácidos.

La presente invención incluye polipéptidos catalíticamente activos (es decir, enzimas). Los polipéptidos catalíticamente activos generalmente tendrán una actividad específica de al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la del polipéptido endógeno nativo (no sintético). Además, la especificidad de sustrato (K_{cat}/K_m) puede ser opcionalmente sustancialmente similar a la del polipéptido endógeno nativo (no sintético) para cada actividad. Típicamente, la K_m será al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la del polipéptido endógeno nativo (no sintético) para cualquier sustrato dado. Los métodos para determinar y cuantificar las medidas de la actividad enzimática y la especificidad de sustrato (K_{cat}/K_m) son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Segel, Biochemical Calculations, 2ª edición, John Wiley and Sons, Nueva York (1976).

La presente invención incluye modificaciones que pueden realizarse en una proteína de la invención. En particular,

puede ser deseable disminuir la actividad del gen. Se pueden realizar otras modificaciones para facilitar la clonación, expresión o la incorporación de la molécula dirigida en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos o péptidos adicionales (por ejemplo, poli His, GST, etc.) colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción ubicados convenientemente o codones de terminación o de purificación.

Una proteína de la presente invención, una vez expresada, puede aislarse a partir de células lisando las células y aplicando técnicas estándar de aislamiento de proteínas a los lisatos. La monitorización del proceso de purificación se puede lograr usando técnicas de tinción Western o técnicas de radioinmunoensayo u otras técnicas de inmunoensayo estándares. También se dispone de casetes de expresión disponibles que dirigen la proteína expresada para ser secretada desde la célula al medio. En estos casos, la proteína expresada puede purificarse a partir del medio de cultivo celular usando técnicas de purificación de proteínas estándares.

Las proteínas de la presente invención también pueden construirse usando métodos sintéticos no celulares. La síntesis en fase sólida de proteínas de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud puede conseguirse mediante la unión al aminoácido C-terminal de la secuencia de un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los restantes aminoácidos de la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis, páginas 3-284 en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Parte A; Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156 (1963), y Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Las proteínas de mayor longitud se pueden sintetizar mediante condensación de los extremos amino y carboxi de los fragmentos más cortos. Los métodos para formar enlaces peptídicos por activación de un extremo carboxiterminal (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diclohexilcarbodiimida) son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Las proteínas de esta invención, recombinantes o sintéticas, pueden purificarse hasta obtener una pureza sustancial mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica, que incluyen la solubilización con detergentes, la precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato amónico, la cromatografía en columna, los métodos de inmunoprecipitación, y otros. Véase, por ejemplo, R. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag: Nueva York (1982); Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press (1990). Por ejemplo, se pueden activar anticuerpos contra las proteínas descritas en la presente memoria. La purificación a partir de *E. coli* se puede lograr siguiendo los procedimientos descritos en la Patente de EE.UU. Nº 4.511.503.

Los medios para detectar las proteínas de la presente invención no son aspectos críticos de la presente invención. Las proteínas se pueden detectar y/o cuantificar usando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 4.366.241, 4.376.110 y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase también Methods in Cell Biology, Vol. 37: Antibodies in Cell Biology, Asai, Ed., Academic Press, Inc. Nueva York (1993); Basic and Clinical Immunology 7th Edition, Stites & Terr, Eds. (1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención se pueden llevar a cabo en cualquiera de varias configuraciones, por ejemplo, las revisadas en Enzyme Immunoassay, Maggio, Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); Tijan, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1985); Harlow y Lane, ver anterior; Immunoassay: A Practical Guide, Chan, Ed., Academic Press, Orlando, Florida (1987); Principles and Practice of Immunoassays, Price and Newman Eds, Stockton Press, NY (1991); y Non-isotopic Immunoassays, Ngo, Ed., Plenum Press, NY (1988).

Los métodos típicos incluyen el análisis de tinción Western (inmunotinción), métodos bioquímicos analíticos tales como la electroforesis, la electroforesis capilar, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de hiperdifusión (sencilla o doble), la inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIAs), ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISAs), ensayos inmunofluorescentes, y otros similares

A menudo se unen marcas no radiactivas por medios indirectos. Generalmente, se une a la molécula covalentemente una molécula de ligando (por ejemplo, una biotina). A continuación, el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que es inherentemente detectable o que está ligada covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Se puede usar una serie de ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, se puede usar en conjunción con los anti-ligandos naturales marcados. Alternativamente, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas también pueden conjugarse directamente para señalar compuestos generados, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esteratasas y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidatasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansyl, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes luciferina y 0.2,3-dihidroftalazinadionas, por ejemplo luminol.

Para una revisión de los diversos sistemas productores de señalización que pueden usarse véase la Patente de EE.UU. Nº 4.391.904, que se incorpora a la presente memoria a modo de referencia.

5 Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, las partículas recubiertas de antígeno son aglutinadas por muestras que contienen los anticuerpos diana. En este formato, ninguno de los componentes necesita ser marcado y la presencia del anticuerpo diana es detectada mediante simple inspección visual.

10 Las proteínas de la presente invención se pueden usar para identificar compuestos que se unan (por ejemplo, sustratos), y/o para aumentar o disminuir (es decir, modular) la actividad enzimática de los polipéptidos catalíticamente activos de la presente invención. El método comprende poner en contacto un polipéptido de la presente invención con un compuesto cuya capacidad para unirse o para modular la actividad enzimática va a ser determinada. El polipéptido empleado tendrá al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95% de la actividad específica del polipéptido nativo de longitud completa de la presente invención (por ejemplo, enzima). Los métodos para medir la cinética enzimática son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Segel, *Biochemical Calculations*, 2ª edición, John Wiley and Sons, Nueva York (1976).

15 Se pueden activar anticuerpos para una proteína de la presente invención, que incluyen variantes individuales, alélicas, de cepa o de especie, y fragmentos de las mismas, tanto en su forma natural (de longitud completa) como en formas recombinantes o sintéticas. Adicionalmente, se activan anticuerpos para estas proteínas en sus configuraciones nativas o en sus configuraciones no nativas. También se pueden generar anticuerpos anti-idiotípicos. Los especialistas en la técnica conocen múltiples métodos para preparar anticuerpos.

20 En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos hospedantes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales se puede encontrar en, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 4ª edición, Stites et al., Eds., Lange Medical Publications, Los Altos, California, y las referencias citadas ahí; Harlow y Lane, ver anterior; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., Academic Press, Nueva York, N.Y. (1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975).

25 Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science* 246: 1275-1281 (1989); y Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989); y Vaughan et al., *Nature Biotechnology* 14: 309-314 (1996)). Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos de alta avidéz a partir de ratones transgénicos que comprenden fragmentos de las localizaciones Ig de cadena pesada y ligera humanas no organizadas (es decir, minilocalizaciones de ratones transgénicos). Fishwild et al., *Nature Biotech.* 14: 845-851 (1996). También, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes. Véase, Cabilly, Patente de EE.UU. Nº 4.816.567; y Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033 (1989).

35 Los anticuerpos de esta invención se pueden usar para cromatografía de afinidad en el aislamiento de proteínas de la presente invención, para el escrutinio de bibliotecas de expresión para productos de expresión particulares tales como proteínas normales o anormales o para activar anticuerpos anti-idiotípicos que son útiles para detectar o diagnosticar varias condiciones patológicas relacionadas con la presencia de los respectivos antígenos.

40 Frecuentemente, las proteínas y anticuerpos de la presente invención pueden ser marcados mediante la unión, covalente o no covalente, de una sustancia que proporcione una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación y están descritas extensivamente en la bibliografía tanto científica como de patentes. Las marcas adecuadas incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y otros similares.

45 La presente invención además proporciona un método para modular (es decir, disminuir) la concentración o la composición de los polipéptidos de la invención reivindicada en una planta o parte de la misma. La modulación se puede efectuar aumentando o disminuyendo la concentración y/o la composición (es decir, la proporción de los polipéptidos de la invención reivindicada) en una planta.

50 El método comprende transformar una célula vegetal con una casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido sustancialmente complementaria a (1) una porción correspondiente de una cadena de una molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa, donde la molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa se hibrida en condiciones de baja severidad con la SEC ID Nº: ó (2) una porción correspondiente de una secuencia de ARN codificada por la molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa; y (b) secuencias reguladoras ligadas operativamente a las secuencias de nucleótidos antisentido de tal modo que las secuencias de nucleótidos antisentido son expresadas en una célula vegetal en la que son transformadas.

55 En algunas realizaciones, el contenido y/o la composición de polipéptidos de la presente invención en una planta puede disminuirse alterando, in vivo o in vitro, el promotor de un gen no aislado de la presente invención para regular a la baja la expresión génica. En algunas realizaciones, las regiones codificadoras de genes nativos de la

presente invención pueden alterarse mediante sustitución, adición, inserción o eliminación para disminuir la actividad de la enzima codificada. Véase, por ejemplo, Kmiec, Patente de EE.UU. N° 5.565.350; Zarlring et al., PCT/US93/03868. Un método para la regulación a la baja de la proteína implica el uso de secuencias PEST que proporcionan una diana para la degradación de la proteína.

5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado (por ejemplo, un vector) que comprende una secuencia promotora es transfectado en una célula vegetal. Posteriormente, una célula vegetal que comprende el promotor ligado operativamente a un polinucleótido de la presente invención se selecciona con medios conocidos por el especialista en la técnica tales como, aunque sin limitación, tinción Southern, secuenciamiento de ADN o análisis PCR usando cebadores específicos para el promotor y el gen, y detectando los productos de amplificación
10 producidos a partir de los mismos. Una planta, o una parte de una planta, alterada o modificada mediante las anteriores realizaciones es cultivada en condiciones de formación de planta durante un tiempo suficiente para disminuir la concentración y/o la composición de los polipéptidos de la presente invención en la planta. Las condiciones de formación de plantas son bien conocidas en la técnica.

15 En general, el contenido de los polipéptidos aumenta o disminuye mediante en al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% respecto a la planta de control nativa, parte de planta, o célula que carece de la anterior casete de expresión. La modulación en la presente invención se puede producir durante y/o posteriormente al crecimiento de la planta de la etapa de desarrollo deseada. La modulación de la expresión de ácido nucleico de manera temporal y/o en tejidos particulares se puede controlar empleando el promotor apropiado ligado operativamente a un polinucleótido de la presente invención en, por ejemplo, orientación antisentido como se ha
20 descrito antes con más detalle. La inducción de la expresión de un polinucleótido de la presente invención también puede controlarse mediante la administración exógena de una cantidad efectiva de compuesto inductor. Los promotores inducibles y los compuestos inductores que activan la expresión a partir de estos promotores son bien conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención son modulados en monocotiledóneas o dicotiledóneas, por ejemplo maíz, soja, girasol, alazor, sorgo, canola, trigo, alfalfa, arroz,
25 cebada y mijo.

El método de transformación no es crítico para la presente invención; actualmente se dispone de varios métodos de transformación. Según se van obteniendo nuevos métodos para transformar cultivos y otras células hospedantes, se pueden aplicar directamente. Por consiguiente, se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para insertar una secuencia de ADN en el genoma de una célula hospedante para obtener la transcripción y/o la traducción de la
30 secuencia para efectuar cambios fenotípicos en el organismo. Así, se puede emplear cualquier método que proporcione una transformación/transfección eficiente.

Una secuencia de ADN que codifica para el polinucleótido deseado de la presente invención, por ejemplo un ADNc o una secuencia genómica que codifica una proteína de longitud completa, se puede usar para construir una casete de expresión que puede ser introducida en la planta deseada. Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden introducir en plantas de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica. Generalmente, se preparan las casetes de expresión tal como han sido descritas anteriormente y adecuadas para la transformación de células
35 vegetales.

Las técnicas para transformar una amplia variedad de especies de plantas superiores son bien conocidas y están descritas en la bibliografía técnica, científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22: 421-477 (1988). Por ejemplo, la construcción de ADN se puede introducir directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como la electroporación, la poración de PEG, el bombardeo de partículas, la administración de fibra de silicio o la microinyección de protoplastos o callos embrionarios de células vegetales. Véase, por ejemplo, Tomes et al., Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. pág.197-213 en Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods, Eds. O. L. Gamborg y G. C. Phillips, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg Nueva York, 1995. Alternativamente, las construcciones de ADN se pueden
40 combinar con regiones flanqueantes de ADN-T e introducirse en un vector hospedante convencional de *Agrobacterium tumefaciens*. Las funciones de virulencia del hospedante de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula es infectada por las bacterias. Véase la Patente de EE.UU. N° 5.591.616.

50 La introducción de construcciones de ADN usando la precipitación de polietilén glicol se describe en Paszkowski et al., Embo J. 3: 2717-2722 (1984). Las técnicas de electroporación se describen en Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 5824 (1985). Las técnicas de transformación balística se describen en Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987).

Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* están bien descritas en la bibliografía científica. Véase, por ejemplo, Horsch et al., Science 233: 496-498 (1984), y Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 4803 (1983). Por ejemplo, la transformación con *Agrobacterium* del maíz se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.981.840. La transformación con *Agrobacterium* de la soja se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.563.055.

Otros métodos de transformación incluyen (1) transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* (véase, por ejemplo, Lichtenstein y Fuller en: Genetic Engineering, Vol. 6, P. W. J. Rigby, Ed., Londres, Academic Press, 1987; y

Lichtenstein, C. P. y Draper, J. en: DNA Cloning, Vol. 11, D. M. Glover, Ed., Oxford, IRI Press, 1985), Solicitud PCT/US87/02512 (WO 88/02405 publicada el 7 de abril de 1988) describe el uso de la cepa A4 de *A. rhizogenes* y su plásmido Ri junto con los vectores pARC8 ó pARC16 de *A. tumefaciens*, (2) captación de ADN mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Freeman et al., Plant Cell Physiol. 25: 1353 (1984)), y (3) el método de vórtice (véase, por ejemplo, Kindle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1228 (1990)).

El ADN también se puede introducir en plantas mediante transferencia directa de ADN en polen, tal como se describe en Zhou et al., Methods in Enzymology 101: 433 (1983); D. Hess, Intern. Rev. Cytol., 107: 367 (1987); Luo et al., Plant Mol. Biol. Reporter 6: 165 (1988). La expresión de polinucleótidos que codifican polipéptido se puede obtener mediante inyección del ADN en los órganos reproductores de una planta, como se describe en Pena et al., Nature 325: 274 (1987). El ADN también se puede inyectar directamente en las células de embriones inmaduros y la rehidratación de embriones desecados como se describe en Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. 75: 30 (1987); y Benbrook et al., en Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, Mass, pág. 27-54 (1986).

Las células hospedantes de animales y eucariontes inferiores (por ejemplo, levaduras) son competentes o se hacen competentes para la transformación por varios medios. Existen varios métodos bien conocidos para introducir ADN en células animales. Éstos incluyen: precipitación de fosfato cálcico, fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, tratamiento de las células receptoras con liposomas que contienen el ADN, dextrano DEAE, electroporación, biolística y micro-inyección del ADN directamente en las células. Las células transfectadas se cultivan con medios bien conocidos en la técnica. Kuchler, R. J., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977).

Las células vegetales transformadas que son derivadas mediante cualquiera de las anteriores técnicas de transformación se pueden cultivar para regenerar una planta completa que posea el genotipo transformado. Dichas técnicas de regeneración a menudo se basan en la manipulación de determinadas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejido, típicamente en base a un marcador biocida y/o herbicida que ha sido introducido junto con un polinucleótido de la presente invención. Para la transformación y regeneración de maíz véase Gordon-Kamm et al., The Plant Cell 2: 603-618 (1990).

Las células vegetales transformadas con un vector de expresión vegetal se pueden regenerar, por ejemplo, a partir de células individuales, tejido calloso o discos de hoja según las técnicas de cultivo de tejido vegetal estándares. Es bien conocido en la técnica que se puede cultivar de forma exitosa varias células, tejidos y órganos procedentes de casi cualquier planta para regenerar una planta completa. La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, Macmillan Publishing Company, Nueva York, pág. 124-176 (1983); y Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, CRC Press, Boca Raton, pág. 21-73 (1985).

La regeneración de plantas que contienen el gen extraño introducido por *Agrobacterium* puede lograrse como se describe en Horsch et al., Science, 227: 1229-1231 (1985) y Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4803 (1983). Este procedimiento habitualmente produce brotes en un plazo de entre dos y cuatro semanas, y dichos brotes transformantes son transferidos a continuación a un medio inductor de raíces apropiado que contenga el agente selectivo y un antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano. Las plantas transgénicas de la presente invención pueden ser fértiles o estériles.

La regeneración también se puede obtener a partir de callos, explantes y órganos vegetales, o partes de los mismos. Dichas técnicas de regeneración se describen de forma general en KJee et al., Ann. Rev. Plant Phys. 38: 467-486 (1987). La regeneración de plantas a partir de protoplastos vegetales individuales o de varios explantes es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Methods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach y H. Weissbach, eds., Academic Press, Inc., San Diego, California (1988). Para el cultivo celular y la regeneración de maíz véase de forma general, The Maize Handbook, Freeling y Walbot, Eds., Springer, Nueva York (1994); Corn and Corn Improvement, 3ª edición, Sprague y Dudley Eds., American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin (1988).

El especialista en la técnica reconocerá que después de que la casete de expresión haya sido incorporada de manera estable en plantas transgénicas y se haya confirmado que es operativa, se puede introducir en otras plantas mediante reproducción sexual. Se puede usar cualquiera de una serie de técnicas de cultivo estándares, dependiendo de la especie que vaya a reproducirse.

En los cultivos propagados vegetativamente, las plantas transgénicas maduras pueden propagarse extrayendo esquejes, mediante producción de semillas apomícticas, o mediante técnicas de cultivo de tejidos para producir múltiples plantas idénticas. Se realiza la selección de la técnica transgénica deseable y se obtienen nuevas variedades y se propagan vegetativamente para su uso comercial. En los cultivos propagados mediante semillas, las plantas transgénicas maduras pueden auto-reproducirse para producir una planta homocigota. La planta generada así produce semillas que contienen el recién introducido ácido nucleico heterólogo. Dichas semillas pueden cultivarse para producir plantas que producirían el fenotipo seleccionado.

Las partes obtenidas de la planta regenerada, tal como flores, semillas, hojas, ramas, frutos, y similares, están incluidas en la invención, siempre que dichas partes comprendan células que comprenden el ácido nucleico aislado

de la presente invención. La progenie y las variantes, y los mutantes de las plantas regeneradas también están incluidos dentro del alcance de la invención, siempre que dichas partes comprendan las secuencias de ácido nucleico introducidas.

5 Las plantas transgénicas que expresan un marcador seleccionable pueden ser escrutadas para determinar la transmisión del ácido nucleico de la presente invención mediante, por ejemplo, técnicas de detección de ADN y de inmunotinción estándares. Las líneas transgénicas también son evaluadas típicamente para determinar los niveles de expresión del ácido nucleico heterólogo. La expresión a nivel de ARN se puede determinar inicialmente para identificar y cuantificar las plantas de expresión positiva. Se pueden emplear técnicas estándar para el análisis de ARN, e incluyen ensayos de amplificación de PCR usando cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar
10 solamente las plantillas de ARN heterólogo y ensayos de hibridación de disolución usando sondas específicas de ácido nucleico heterólogo. A continuación, las plantas positivas en ARN pueden ser analizadas para determinar la expresión de proteínas mediante análisis de inmunotinción Western usando los anticuerpos específicamente reactivos de la presente invención. Adicionalmente, se puede realizar la hibridación in situ y una inmunocitoquímica según los protocolos estándar usando sondas de polinucleótidos y anticuerpos específicos de ácido nucleico heterólogo, respectivamente, para localizar los sitios de expresión dentro del tejido transgénico. Generalmente, se
15 escruta una serie de líneas transgénicas para determinar el ácido nucleico incorporado a fin de identificar y seleccionar las plantas con los perfiles de expresión más apropiados.

Las plantas transgénicas de la presente invención pueden ser homocigotas para el ácido nucleico heterólogo añadido; es decir, una planta transgénica que contiene dos secuencias de ácido nucleico añadidas, un gen en la
20 misma localización de cada cromosoma de un par de cromosomas. Una planta transgénica homocigota se puede obtener mediante emparejamiento sexual con una planta transgénica heterocigota que contenga un único ácido nucleico heterólogo añadido, germinando alguna de las semillas producidas y analizando las plantas resultantes producidas para determinar una expresión alterada de un polinucleótido de la presente invención respecto a una planta de control (es decir, nativa, no transgénica). También se contemplan el retrocruzado con una planta parental y cruzado externo con una planta no transgénica. Alternativamente, la propagación de plantas transgénicas heterocigotas podría conseguirse mediante apomixis.
25

La presente invención proporciona un método para obtener el genotipo de una planta que comprende un polinucleótido de la presente invención. El genotipado proporciona un medio para distinguir homólogos de un par de cromosomas y se puede usar para diferenciar segregantes en una población de plantas. Se pueden usar métodos de marcadores moleculares para estudios filogenéticos, caracterizando relaciones genéticas entre variedades de cultivo, identificando cruces o híbridos somáticos, localizando segmentos cromosómicos que afecten a rasgos monogénicos, clonación basada en mapa, y el estudio de la herencia cuantitativa. Véase, por ejemplo, *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Capítulo 7, Clark, Ed., Springer-Verlag, Berlín (1997). Para métodos de marcador molecular, véase de forma general *The DNA Revolution* de Andrew H. Paterson 1996 (Capítulo 2) en: *Genome Mapping in Plants* (ed. Andrew H. Paterson) de Academic Press/R. G. Landis Company, Austin, Texas, páginas 7-21.
30

El método particular de genotipado de la presente invención puede emplear cualquier número de técnicas analíticas de marcador molecular tales como, aunque sin limitación, polimorfismos de longitud de fragmento de amplificación (AFLPs). Los AFLPs son el producto de diferencias alélicas entre fragmentos de amplificación de PCR de ADN provocadas por la variabilidad de la secuencia de nucleótidos. Por tanto, la presente invención además proporciona un medio para seguir la segregación de un gen o ácido nucleico de la presente invención, así como las secuencias cromosómicas ligadas genéticamente a dichos genes o ácidos nucleicos usando técnicas tales como el análisis AFLP.
40

Las plantas que pueden usarse en el método de la invención incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las plantas preferidas incluyen maíz, trigo, arroz, cebada, avena, sorgo, mijo, centeno, soja, girasol, alazor, alfalfa, canola Brassica napus, algodón o hierba.
45

Las semillas derivadas de plantas regeneradas a partir de células vegetales, partes de plantas o tejidos de plantas transformadas, o la progenie derivada de las plantas transformadas regeneradas, pueden usarse directamente como pienso o alimento, o se puede realizar un procesado adicional.

50 La presente invención se describirá adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos detallados.

EJEMPLOS

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que todas las partes y porcentajes están en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique lo contrario. Debería entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración.
55

Ejemplo 1. Identificación de genes IPP2-K candidatos

Las secuencias de ADN para los genes predichos de inositol pentakisfosfato-quinasa (In5-K) de humano y levadura

fueron descritas en Verbsky, J. W. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 31857-31862 (a partir de aquí "Verbsky"). Se identificaron fragmentos de secuencias de gen IPP2-K de maíz putativas similares en bases de datos que incluyen GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los fragmentos de secuencia de maíz fueron alineados con secuencias humanas y de levadura, y también se usaron para la búsqueda en la base de datos NCBI según los algoritmos BLAST (Altschul, S.F. et al. (1991) J. Mol. Biol. 215: 403-10). Se identificaron varias secuencias de *Arabidopsis thaliana* (AT5g42810, AT1g22100, AT1g58936) y otras especies en el dominio público que incluyen, aunque sin limitación, BM520171, BE556094, BG882429 (*Glycine max*); C73039, AA750614, AL606608.3, AAAA01003483, AP008210, AK102842, XM 474214 (*Oryza sativa*); BH647760, BH724856 (*Brassica oleracea*); TC238218 (TIGR contig que comprende los ESTs CA732984, BQ579364, BE430881, CD876080, BE498028, CA714664, BE498127, BJ233635, BE496998, CA604588, BJ212905, BJ220381, BE445478, CA700172, CA613702 de *Triticum aestivum*), TC97085 (TIGR contig que comprende CD233879, BG054179, BE594569, CD207152 de *Sorghum bicolor*), BN45053K04, BN25068E01, Brassica_napustuc04-02-05_2912, TC1941(TIGR contig que comprende CD832483, CD827663, CD837809 y CD832284 de *Brassica napus*).

Además, se identificaron secuencias que tienen bajos niveles de similitud de secuencia y que se ha predicho que son funcionalmente distintas en bases de datos públicas y en solicitudes de patente publicadas (Shi, J. et al. WO2003027243). Estas secuencias pueden diferenciarse de aquellas similares a la IPP2-K reivindicada en la presente memoria en base al grado de similitud. Los porcentajes de similitud y las relaciones filogenéticas entre estas secuencias se muestran en las Figura 1A y 1B.

Adicionalmente, se usaron solicitudes de Alineamiento de Secuencia Múltiple de Vector NTI para crear el alineamiento de las secuencias de aminoácido predichas de genes IPP2-K putativos de maíz, Arabidopsis y arroz. En base a la identidad de secuencia de aminoácidos, los resultados de esos alineamientos definieron regiones conservadas que están diseñadas como secuencias de consenso según se ha representado en la Figura 2. Se determinó que cinco secuencias de consenso definen motivos que son característicos de genes IPP2-K. Usando estos motivos para buscar en bases de datos (por ejemplo, GeneBank), un especialista en la técnica puede identificar genes IPP2-K putativos adicionales a partir de una variedad de especies vegetales:

1: DAXDWXYXXEGXXNLXLXYXGSSP

2: VEIKXKCGFLXXSXXIXXXNXXKXXXRXXMXQXCKXXXXXISXXSE YXPLDLFSGSKXXXXXAIKXXXXT-PQNXXXXXXXXGSLXXGG

3: ISXXSEYXPLDLFSGSK

4: LXXLLXXQKLDXXIEGXIHXY

5: LIXXTAXDCSXMISF

Ejemplo 2: Aislamiento de secuencias de ADNc de longitud completa

Las búsquedas en la base de datos públicas de secuencias de maíz (www.maizegdb.org) identificaron las etiquetas de secuencia expresadas (EST, del inglés "Expressed Sequence Tag") BG842305, AW066374 y BE639260 como fragmentos de la secuencia contigua (contig) ZMtuc02-12-23.4536. Este contig tiene una longitud de 1,7 kb. La secuencia de proteína traducida de este contig contiene secuencias que son altamente similares a las cajas conservadas A, B, C y D identificadas en el gen humano de inositol pentakisfosfato quinasa (In5-K) tal como describe Verbsky. Se usó una estrategia de RT-PCR para obtener clones de ADNc de IPP2-K de maíz tal como se describe en este ejemplo.

Se aisló ARNm marcado con Poli(A)⁺ de semillas de maíz (DAS 5XH751) a los 9 días de la polinización (DAP, "days after pollination") usando una combinación de reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y un kit MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa sobre este ARNm para generar ADNc usando un cebador específico de gen derivado de ZMtuc02-12-03.4536 (5'-TCG GAA ATT ACT GTG ACA AGC-3') y enzima Superescriptasa II (Invitrogen), siguiendo la sugerencia del fabricante. La amplificación de un ADNc de IPP2-K se llevó a cabo usando diferentes cebadores específicos de gen derivados de ZMtuc02-12-23.4536 (5'-GAA TCG GCA CGA GGC AGC AGC GGC AGC-3' y 5'-TGA CAA GCC ACG GTG TAT GCA-3'). El ADNc amplificado se clonó en plásmido vector pCR2.1 usando un kit de clonación TA siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Este clon de ADNc de IPP2-K de maíz (de 1,6 kb de longitud) se designó zmIP5K-1.

Para obtener secuencias correspondientes a las regiones no traducidas (UTR, del inglés "untranslated regions") 5' y 3' del ADNc de IPP2-K, se llevaron a cabo experimentos de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, del inglés "Rapid Amplification of cDNA Ends") usando el kit GeneRacerTM de Invitrogen. Para el 5'-RACE, se trató ARNm de semillas de 9 DAP con fosfatasa intestinal de carnero y pirofosfatasa ácida de tabaco, tal como describe el fabricante. Se ligó un oligonucleótido de ARN (ancla de ARN) suministrado con el kit al ARNm descrito anteriormente siguiendo las instrucciones del kit. La transcripción inversa fue dirigida por otro cebador específico de gen de IPP2-K (5'-GCA ATA GCA AAT TGA GAT ACA TTC ATA C-3'). El extremo 5' del ADNc de quinasa de IPP2-K de maíz putativo fue amplificado seguidamente usando un cebador derivado de la secuencia de la ancla de ARN y un

cebador específico de gen diferente (5'-TTC CAG GCG TTA AGG GTC GAG CCT-3'). El producto de amplificación resultante fue clonado en el vector plásmido pCR2.1 y secuenciado.

5 Para obtener las secuencias 3'-UTR, la transcripción inversa de ARNm de una semilla de 9 DAP fue dirigida con un cebador oligo-d(T) y un cebador derivado del ARN ancla del extremo 3', como para el kit GeneRacer™. Los extremos 3' de transcritos de IPP2-K putativos fueron amplificados a continuación con cebadores específicos de gen derivados de zmlP5K-1 (5'-CGT GTT TCT AGG GAT TTT CTG GAG CTT-3') y de la secuencia ancla de ARN-3' que flanquea al cebador oligo-d(T). Los productos de PCR fueron clonados en pCR2.1 y secuenciados. Posteriormente, los datos de secuencia de clones derivados de ambos experimentos 5' y 3'-RACE se usaron para diseñar cebadores de PCR específicos de IPP2-K correspondientes a las UTRs (5'-CTT CAG TCC CTT TCC CCG GGC T-3' y 5'-TTT TTT TTT GGA GGA TGA AAG TTT CAC CAA ACA TTT CT-3'). Usando dichos cebadores, la amplificación RT-PCR de ARNm a partir de semillas de 9 DAP fue llevada a cabo usando el sistema Platinum DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) para producir ADNcs de IPP2-K de longitud completa putativos. Los productos de PCR resultantes fueron clonados a continuación en pCR2.1 y se secuenciaron cuatro clones independientes. La secuencia de nucleótidos del clon que representa el ADNc de IPP2-K de longitud completa se designa SEC ID N°: 1 y la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína codificada por dicho ADNc se designa SEC ID N°: 2.

Ejemplo 3: Identificación de secuencias de ADN genómico

Usando la secuencia del ADNc de IPP2-K de maíz putativo aislado como elemento de búsqueda, se analizó la base de datos genómica de maíz (www.maizegdb.org) según el algoritmo BLAST y se identificaron fragmentos de secuencia similares, solapantes, de función desconocida. Estas secuencias fueron ensambladas en contigs/singletes que incluyen ZMGSSstuc28403.1, ZMGSSstuc 03-04-29.4761.

Se llevaron a cabo tinciones Southern genómicas usando protocolos estándar (Sambrook). Se analizó ADN genómico de maíz (DAS 5SH751) tanto sin digerir como digerido de forma sencilla con enzimas *BamH* I, *EcoR* I, *Hind* III y *Not* I. Los fragmentos de ADNg se separaron mediante electroforesis en agarosa al 0,8%, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron en condiciones severas (0,2X SSC, 60°C) con 25 ng de sonda de ADNc de IPP2-K de 1,6 kb de maíz (zmlP5K-1) marcada con ³²P-dCTP (kit de marcado Prime-It II, Stratagene, La Jolla, CA). Las bandas correspondientes a 2 ó 3 genes fueron identificadas como posibles candidatos de IPP2-K, lo que indica que el gen está presente como una familia pequeña de genes.

Ejemplo 4. Aislamiento de clones genómicos de IPP2-K a partir de una biblioteca de fagos lambda.

Se aisló ADN genómico de maíz (DAS5XH751) a partir de tejido de hojas de 3 semanas de edad que había sido molido hasta obtener un polvo fino en nitrógeno líquido. Se extrajo el ADNg usando métodos basados en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como se describe en Sambrook en un tampón que consiste en Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, CTAB al 1%, β-mercaptoetanol al 1%. El ADN resultante se digirió con enzima de restricción *BamH* I y los extremos fueron sometidos a una reacción de relleno usando enzima Klenow (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de las reacciones de llenado, se extrajo el ADN, se precipitó y se ligó en un vector bacteriófago lambda (Lambda FixII, Stratagene) que fue predigerido con *Xho* I según el protocolo descrito por el fabricante, excepto en que el tampón de ligación y la enzima ligasa fueron suministrados por Promega (Madison, WI). Usando el kit Gigapack de Stratagene, la mezcla de ligación se añadió a extracto de empaquetamiento Gigapack III XL según las recomendaciones del fabricante y la biblioteca empaquetada llevada a placa sobre medio LB usando los métodos estándar descritos por Sambrook. La biblioteca genómica de maíz resultante tenía un título de fagos de 3,6 X 10⁶ PFUs. Siguiendo la amplificación rutinaria, el título final de la biblioteca fue de 3,6 X 10¹⁰ PFU/mL.

Los métodos para el escrutinio de biblioteca lambda fueron derivados de Sambrook. La biblioteca genómica de maíz DAS5XH751 se llevó a placa con una elevada densidad y se transfirió a membranas de nylon. Las membranas fueron hibridadas en condiciones severas (2 lavados 1 X SSC, 2 lavados 0,2 X SSC a 65°C) con una sonda que consiste en un fragmento de clon de ADNc de IPP2-K de 1,6 kb (zmlPSK-1) marcado como se ha descrito anteriormente. Las placas positivas fueron aisladas y sometidas a 2 rondas adicionales de escrutinio, dando como resultado varios clones lambda positivos putativos. El secuenciamiento de ADN de los fragmentos clonados confirmó la identidad de dichas secuencias derivadas del gen de IPP2-K genómica. Estas secuencias junto con los clones BAC descritos más adelante fueron usadas para generar la secuencia genómica contigua designada como SEC ID N°: 3.

Ejemplo 5: Aislamiento y caracterización de un clon BAC que contiene el gen IPP2-K

Se preparó una biblioteca de cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés "bacterial artificial chromosome") de ADN genómico procedente de maíz (DAS cultivo 5XH751) siguiendo los métodos descritos por Zhang (2002).

Se recolectó tejido de hoja de tejidos cultivados de dos semanas de edad y se congeló en nitrógeno líquido. El tejido congelado se molió hasta obtener un polvo fino en nitrógeno líquido, se transfirió a 1XHB (10X reserva: base Trizma 0,1 M, KCl 0,8 M, EDTA 0,1 M, espermidina 10 mM, espermina 10 mM, pH 9,4-9,5) más un 0,15% de β-mercaptoetanol y un 0,5% de Triton X-100, agitado durante 10 minutos en hielo y se filtró a través de dos capas de cheesecloth y una capa de Miracloth. El homogenato se peletizó y se lavó con tampón de lavado enriado en hielo

(base Trizma 0,01 M, KCl 0,08 M, EDTA 0,01 M, espermidina 1 mM, espermina 1 mM, un 2% de Triton X-100, un 0,015% de β -mercaptoetanol, pH 9,4-9,5). La partícula de núcleos fue resuspendida en tampón de lavado y repeletizada mediante centrifugación a 1.800Xg, 4°C durante 15 minutos 3 veces. Los núcleos peletizados fueron resuspendidos en 1 mL de 1XHB y se contabilizaron. La concentración de núcleos se ajustó a 5×10^7 núcleos/mL con 1 XHB. Los núcleos intactos fueron embebidos en tapones de agarosa como se describe en Zhang (2002), se lavaron en EDTA 0,5 M, pH 9,0-9,3 durante una hora a 50°C, se lavaron en EDTA de 0,05 M, pH 8,0 durante una hora en hielo, y se almacenaron en EDTA 0,05 M, pH 8,0 a 4°C. Se llevó a cabo una purificación adicional de ADN megabase en los tapones mediante lavado de los tapones con núcleos tres veces durante una hora en 10-20 volúmenes de TE enfriado en hielo (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0) más fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) 0,1 mM. El ADN se lavó adicionalmente tres veces durante una hora en 10-20 volúmenes de TE enfriado en hielo.

El ADN genómico de los núcleos embebidos fue digerido con enzima de restricción *EcoRI* directamente en los tapones de agarosa, como se describe en Zhang (2002). Después de la digestión, las reacciones fueron detenidas con 1/10 volumen de EDTA 0,5 M, pH 8,0. Con el ADN digerido se llevó a cabo una electroforesis de gel de campo pulsado seguida de una selección por tamaño en tapones de agarosa antes de la ligación en vectores BAC según Zhang (2002).

Tal como se describe en Zhang (2002), el ADN de vector BAC pECBAC1 fue digerido con enzima de restricción *EcoRI*. El ADN vector linealizado se desfosforiló con enzima CIAP (Invitrogen) y la reacción de 400 μ L se detuvo con 4 μ L de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 20 μ L de SDS al 14% y 40 μ L de 1 mg/mL de proteinasa K en TE fría. El ADN fue precipitado añadiendo 1/10 volumen de NaAC 3 M, pH 7,0 y 2 volúmenes de etanol al 100%, incubando a -80°C durante 10 minutos seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. Tras lavar y resuspender, la concentración de ADN fue ajustada a 10 ng/ μ L y el vector se almacenó a -20°C.

La ligación de ADN genómico de megabase en el vector BAC pECBAC1 se llevó a cabo como se indica a continuación: el ADN genómico eluido del tapón de agarosa fue dializado 2X contra un litro de 0,5 x TE enfriada en hielo, durante 1 hora. La concentración de ADN recolectado se estimó en un 1% del gel de agarosa. Se llevaron a cabo reacciones de ligación con una relación de pesos moleculares vector:ADN de 1:4 con la enzima T4 ADN ligasa según los procedimientos estándar descritos en Zhang (2002). Las reacciones de ligación fueron incubadas a 16°C durante 8-12 horas.

La transformación de mezclas de ligación en células *E. coli* competentes (DHB10B, Invitrogen) se llevó a cabo mediante electroporación usando un Cell Porator System con un Voltage Booster y cubetas Cell Porator de 0,15 cm de hueco (Labrepco, Horsham PA). Los parámetros de electroporación fueron 330 μ F de capacitancia, 4 K ohmios de resistencia. Después de la electroporación, las células fueron recuperadas a 37°C con agitación en ~ 1 mL de medio SOC, fueron peletizadas con centrifugación y almacenadas en medio de congelación (caldo LB granulado a 2,5 p/v, KH_2PO_4 13 mM, K_2HPO_4 36 mM, citrato sódico 1,7 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,8 mM, 4,4% p/v de glicerol) antes de llevarse a placa. Los cultivos se llevaron a placa en medio LB más 1,5% de bactoagar, 90 μ g/mL de X-gal, 90 μ g/mL de IPTG y 12,5 μ g/mL de cloranfenicol con una densidad que dio como resultado colonias bacterianas discretas. Se tomaron colonias individuales usando un robot Q-bot (Genetix, Boston, MA) con una rutina de selección y se dispusieron en 300 placas de 384 pocillos. La evaluación de título de esta biblioteca de BAC de maíz derivada del cultivo de la variedad DAS 5XH751 indicó que la biblioteca contenía aproximadamente 115.000 clones con fragmentos genómicos de un tamaño de inserto medio de 130 kb.

La biblioteca de BAC de maíz 5XH751 en array fue distribuida en membranas de nylon de 22 cm^2 en rejillas 4x4 usando una rutina de distribución con robot Q-blot (Genetix, Boston MA). Los filtros se cultivaron en agarosa LB a 37°C durante la noche, a continuación se desnaturalizaron, se fijaron y se secaron como se indica en el Sambrook con la excepción de que se añadió una etapa adicional de lisis, antes de la hibridación. Los filtros fueron hibridados en condiciones severas (2 lavados 1X SSC 0,1% SDS, 2 lavados 0,2X SSC, 0,1% SDS a 65°C) con una sonda que consistía en un fragmento de IPP2-K de 916 pb (zmIP5K-1) generada mediante PCR de un clon de ADNc (zmIP5K-1) usando cebadores específicos de IPP2-K (IP5K-PF3: 5'-AGTCCCTTCCCGGGCTGTGGTAC-3' e IP5K-PR 1: 5'-TTAAGTTGTTCTGAGGAGTTGAGAAAAGGGA-3'). La sonda fue radiomarcada con γ - ^{32}P dCTP usando un kit de marcado de cebador aleatorio de Invitrogen. La visualización de los clones positivos se llevó a cabo mediante fosforimagen con una exposición de 16 horas con pantallas de almacenamiento de fósforo seguido del uso de un análisis con Storm phosphorimager (Molecular Dynamics, Mountain View, CA) usando el software High Density Filter Reader de Incogen (Williamsburg, VA). Los cultivos con clones positivos fueron retirados de la placa de la biblioteca y cultivados durante una noche a 37°C en medio LB. Se extrajo el ADN de BAC de clones aislados usando un kit Large Construct de Qiagen (Valencia, CA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los cebadores de PCR específicos para regiones codificadoras de IPP2-K (IP5-IPF: 5'-CGCGGATGCCAAGGACTGGGTTTACAAGGG-3' e IP5-IPR: 5'-TTACAACAGCAGCACCAAGCAGCAGGAAC-3') fueron usados para amplificar clones putativos positivos y confirmar la presencia del gen de IPP2-K sobre el BAC. Los clones de BAC que contienen los genes de IPP2-K fueron restringidos con NotI, sometidos a electroforesis de gel de campo pulsado y analizados. El tamaño de inserto se estimó en aproximadamente 180 kb de longitud, que corresponde a la región genómica de los cromosomas de maíz que contienen el gen de IPP2-K. El secuenciamiento del clon de BAC que contiene IPP2-K se llevó a cabo mediante secuenciamiento directo del ADN de BAC o mediante subclonación de escopeta del BAC seguido de secuenciamiento de plásmido y ensamblaje de contig (Lark Technologies, Houston, TX). Se generaron

múltiples ejecuciones de secuencia BAC y se alinearon con secuencias clónicas de fagos lambda descritas anteriormente para derivar la secuencia genómica contigua designada como SEC ID N°: 3. La estructura de las localizaciones genómicas que contenían el gen de IPP2-K procedente de maíz DAS 5XH75 se muestra en la Figura 3.

5 Ejemplo 6: Caracterización de la actividad de IPP2-K *in vitro*

Un fragmento del clon de ADNc de IPP2-K de maíz que corresponde al marco de lectura abierto (ORF, del inglés "open reading frame") predicho de 1,32 kb se clonó en el vector de expresión de plásmido pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y células *E. coli* expresadas (BL21(DE3) pLysS) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este vector se diseñó para generar una fusión *in-frame* de péptido GST (glutathion-S-transferasa) sobre el extremo N de la proteína expresada.

Las proteínas totales fueron extraídas de las células de *E. coli* en un tampón de lisis de extracción estándar (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, lisozima 1 mg/mL seguido de la adición de Triton X-100 al 0,4%). El lisado de *E. coli* resultante fue sometido a ultrasonidos en hielo usando un Branson Sonifier 450 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury CT) durante cuatro ciclos de 30 segundos cada uno con un 20% de potencia y un 50% de intensidad. La proteína expresada en bacteria fue pasada sobre una columna de glutathion-agarosa, lavada 3X con tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y Triton X-100 al 0,4%), 3X con tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y eluida con glutathion 10 mM en Tris-HCl 50 mM. Se agruparon fracciones de 0,5 mL que contenían las proteínas, determinadas mediante reactivo de ensayo de proteína Bio-Rad (Hercules, CA), y se analizaron mediante SDS-PAGE (Sambrook). Se confirmó que la identidad de la proteína purificada expresada heterológamente era IPP2-K de maíz usando métodos de huella digital de fragmento de péptido tales como los descritos por Shevchenko, A. et al. (1996) *Anal. Chem.* 68: 850-858.

La capacidad de la proteína IPP2-K de maíz expresada heterológamente para fosforilar múltiples especies de inositol-fosfato, incluyendo el inositol tetrakisfosfato (IP4) y el inositol pentakisfosfato (IP5), fue confirmada mediante autorradiografía después de que los inositol fosfatos marcados con ³²P fueran separados mediante cromatografía de capa fina (TLC) convencional (Figura 4). Los ensayos de actividad de IPP2-K de maíz de la proteína purificada fueron llevados a cabo en un tampón de reacción que contenía HEPES 20 mM (pH 7,5), MgCl₂ 6 mM, LiCl 10 mM, DTT 1 mM, 40 ng/μL de sustratos de inositol fosfato, ATP 40 μM y 5 μCi de ATP marcado con γ-³²P (3000 Ci/mmol). Las mezclas de reacción fueron distribuidas sobre una placa de TLC de celulosa PEI y se desarrollaron en HCl 1,0 N. Los resultados de estos ensayos de actividad de quinasa indicaron que la enzima IPP2-K de maíz era capaz de catalizar la conversión de inositol 1,3,4,5,6-pentakisfosfato (IP5) para generar inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato (ácido fítico) a través de la reacción de fosforilación en la posición 2 del anillo de inositol (Figura 4). Adicionalmente, esta enzima de maíz fue capaz de fosforilar inositol 1,4,5,6-tetrakisfosfato (IP4) para producir IP5. Una actividad adicional observada en la enzima incluyó la capacidad de convertir inositol 1,4,6-trifosfato (IP3) en un producto IP3 marcado radiactivamente. En base a estos resultados, la enzima de maíz es una inositol polifosfato quinasa.

Para caracterizar con mayor profundidad la especificidad isomérica de la actividad de inositol 1,4,6-trifosfato quinasa de la IPP2-K observada en el ensayo de TLC descrito anteriormente, se utilizó una estrategia basada en RMN para examinar la conversión de sustrato. En este ejemplo, se colocó una disolución que contenía 600 μL, Tris DCl 50 mM, pH 7,5, LiCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, inositol 1,4,6-trifosfato inositol y ATP 1 mM en D₂O en un tubo de RMN de 5 mm y se analizó mediante RMN de protón en un equipo Bruker DRX-600 NMR. Los datos fueron adquiridos usando una secuencia de pulsos RECUR-TOCSY con el fin de eliminar el gran pico de agua residual a 4,8 ppm pero manteniendo los picos de sustrato que quedaban subyacentes según el método de Liu et al. (2001). Tras la caracterización de los materiales de partida, se añadieron 45 μg de enzima de IPP2-K de maíz expresada heterológamente purificada a un tubo y la reacción se monitorizó como se ha indicado anteriormente usando RMN de protón. Todos los espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente con una frecuencia de resonancia de protón de 600 MHz. Se usaron un total de 128 escaneos con puntos de datos de 32 K, una anchura de pulso de 30 grados y un tiempo de relajación de 2 segundos. La adquisición de datos y el procesado se llevó a cabo usando el software estándar de Bruker XWIN-NMR. En la Figura 5 se muestran los espectros que representan los tiempos 0 y 120 minutos de incubación a 37°C en presencia de la enzima. La comparación de los espectros entre el punto de inicio y el punto final indica que en presencia de la enzima IPP2-K, el inositol 1,4,6-trifosfato es convertido en inositol 1,2,6-trifosfato (Figura 5). Este resultado demuestra claramente que la IPP2-K puede catalizar tanto la desfosforilación como la fosforilación de inositol 1,4,6-trifosfato, tal como se observa en los ensayos de TLC; además, la actividad de quinasa de IPP2-K es específica para la fosforilación en la posición de inositol-2, lo que confirma que la enzima codificada por el gen IPP2-K es una inositol polifosfato-2 quinasa.

Ejemplo 7. Caracterización de la actividad de IPP2-K *in vivo*

La funcionalidad de la proteína codificada por el ADNc de IPP2-K aislado de maíz DAS 5XH751 se puede evaluar mediante experimentos de complementación genética. En un ejemplo, los mutantes de la planta dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* que contienen alteraciones en el gen IPP2-K pueden presentar un fenotipo de acumulación de ácido fítico reducida. Por ejemplo, se pueden identificar líneas de *Arabidopsis* disponibles públicamente que se ha descrito que contienen inserciones de ADN T en el gen de IPP2-K predicho buscando en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org) usando la secuencia de ADNc de IPP2-K como elemento de consulta. Las líneas que

contienen dichas inserciones de ADN T pueden exhibir una expresión disminuida o bloqueada del gen IPP2-K interrumpido, que da como resultado una disminución o una pérdida de actividad enzimática. Las semillas de la progenie auto-polinizada de dichas líneas pueden ser sometidas a un análisis del contenido de fitato usando un ensayo de quelación descrito por Raboy en la Patente de Estados Unidos número 006111168A. Se predice que la alteración del gen IPP2-K de *Arabidopsis*, que es homólogo al gen IPP2-K de maíz, y que resulta en la eliminación de la actividad de IPP2-K, puede conducir a una reducción de la acumulación de fitato. Se predice que cuando dichas plantas son modificadas mediante transformación genética como se describe en Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) para expresar un gen IPP2-K de maíz funcional, dichas líneas mutantes pueden recuperar niveles normales, casi normales o incrementados de acumulación de ácido fítico.

En otro ejemplo similar a los experimentos con *Arabidopsis* descritos anteriormente, el especialista en la técnica puede identificar mutantes de maíz en colecciones genéticas disponibles públicamente tales como (<http://www.uniformmu.org>; o <http://w3.aces.uiuc.edu/maize-coop/>) que son alteradas en el gen IPP2-K. Por ejemplo, algunos mutantes de maíz puede ser alterados en el gen IPP2-K debido a la presencia de un elemento Mu trasponible insertado en el gen. Se predice que dichos mutantes pueden exhibir niveles reducidos de acumulación de ácido fítico. Dichos mutantes pueden complementarse expresando el gen de maíz funcional a través de transformación genética. Cuando dichas plantas son modificadas mediante transformación genética para expresar el gen IPP2-K de maíz, se predice que dichas líneas mutantes recuperaran los niveles normales, o casi normales, de acumulación de ácido fítico.

En los ejemplos citados anteriormente, el especialista en la técnica puede utilizar el análisis de RMN para determinar la cantidad específica y el tipo de metabolitos de inositol fosfato presentes en las plantas alteradas genéticamente. Se predice que las plantas que presentan una reducción en la acumulación de ácido fítico debido a la alteración de la expresión del gen IPP2-K también presentan cantidades alteradas y/o tipos alterados de precursores de fitato tales como IP5, IP4, etc. Por ejemplo, se pueden analizar los extractos de plantas de dichos mutantes usando RMN de fósforo para determinar el efecto de la reducción de fitato sobre la acumulación de precursores de fitato. Para ilustrar este ejemplo, se llevó a cabo una determinación de las moléculas de inositol fosfato presentes en semillas de maíz maduras procedentes de la línea cultivada DAS 5XH751. En este ejemplo, se extrajeron 10 g de harina de maíz a partir de semillas de maíz maduras secadas en HCl 0,5 N, se filtraron, se concentraron hasta sequedad y se lavaron con metanol al 80%. La suspensión en metanol se concentró hasta obtener un alquitrán negro que se disolvió en una disolución de D₂O que contenía 30 mg/mL de EDTA. Se ajustó el pH de la disolución a > 12 con NaOH. A continuación se llevó a cabo el análisis de RMN de fósforo, sin filtración. Se obtuvieron los espectros de RMN de fósforo a 400,13 MHz en un espectrómetro de RMN Bruker DRX-400 con una sonda de 5 mm de 1H/13C/19F/31P. Todos los espectros fueron adquiridos con desacoplamiento de protón a temperatura ambiente. Se adquirieron un total de 23K acumulaciones usando puntos de datos de 64K, una anchura de pulso de 30 grados y un tiempo de relajación de 2,0 segundos, dando como resultado un tiempo de adquisición total de 16 horas. Los datos no tratados fueron rellenados con ceros hasta espectros de 32K puntos y procesados usando una función de ponderación exponencial de 1,0 Hz. El espectro resultante se muestra en la Figura 6. En el maíz no mutado, se predice que el inositol hexakisfosfato (fitato) es la especie de inositol fosfato predominante, habiendo presentes pequeñas cantidades de inositol penta- y tetra-kisfosfato, tal como se observa en la Figura 6.

Ejemplo 8: Mutagénesis de semillas de maíz usando irradiación de neutrones rápidos (FN, del inglés "fast neutron")

Las metodologías y las consecuencias genéticas generales del bombardeo FN de células está bien descrito por Harten (1998), y dicho método ha sido utilizado con éxito en plantas de *Arabidopsis*, tal como describen Li, X. et al. (2001) *Plant J.* 27: 235-242. Típicamente, se puede esperar que los FN produzcan eliminaciones en el intervalo de tamaño aproximado de unos pocos cientos de pares base a varios miles de pares base o más. La eficacia de la irradiación FN depende del tipo y la calidad del material biológico sometido a tratamiento. En este ejemplo, la irradiación se llevó a cabo usando una fuente de haz de neutrones rápidos en el Atomic Energy Research Institute de Budapest, Hungría. En un experimento para mutagenizar una muestra de semilla de maíz, se evaluaron semillas en bruto que habían sido secadas hasta aproximadamente un 40% de humedad tras la recolección para determinar el contenido en agua antes de la irradiación midiendo la masa antes y después de un tratamiento durante 14h a 80°C en un horno de secado de laboratorio. En base al % p/p en agua de la muestra, se ajustó el tiempo de exposición al haz real calculado según la calibración de haz del instrumento. Para estas muestras, se aplicó una geometría de irradiación a BIF de BRR de geometría de rotación 2Y/Cd. Las exposiciones fueron monitorizadas mediante cámaras de fisión de U-235 y Th-232 y un contador GM. Las exposiciones de irradiación se llevaron a cabo sobre paquetes individuales de semillas durante 1145 segundos cada uno para producir una tasa de dosis kerma promedio para 2Y/Cd de 12,71 mGy/s +3%. Se trataron múltiples muestras de semillas de maíz con un intervalo de dosis de consigna de 11-20 Gy (11, 13, 15, 17, 20 Gy) de neutrones rápidos. Las semillas M1 resultantes fueron plantadas y cultivadas en condiciones de campo del medio oeste estándares, se polinizaron y cada espiga M1 fue cosechada individualmente para producir una familia M2. Las espigas maduras individuales fueron recolectadas, secadas, empaquetadas en sobres individuales marcados con identificadores específicos de la familia M2.

Ejemplo 9: Aislamiento de ADN Genómico procedente de semillas mutagenizadas.

Se aisló ADN genómico procedente de semillas de maíz enteras secadas en un formato de 96 pocillos usando el método Charge-Switch Technology (CST) de Invitrogen (Carlsbad, CA) con las siguientes modificaciones. Las muestras de semillas de cada familia M2 fueron eliminadas individualmente de los sobres para la extracción de ADN genómico. En cada pocillo de una placa de pocillo profundo de 24 pocillos (CoStar Scientific, Cambridge, MA) se colocaron 6 semillas de cada familia (1 familia por pocillo), embebidas en agua durante una noche y posteriormente liofilizadas en una cámara de secado por congelación (Virtis, Gardiner, NY) a vacío durante un mínimo de 48 horas. Las semillas secas fueron molidas hasta obtener un polvo usando un Genogrinder (Spex Certiprep, Metuchen, NJ) a sus máximas prestaciones, en combinación con bolas de carburo de wolframio (Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL) y se resuspendieron en tampón acuoso que consistía en SDS al 0,25%, EDTA 10 mM, pH 8,0, Tris 50 mM pH 8,0. Después de una centrifugación, el sobrenadante del extracto fue transferido a una nueva placa y agrupado en una combinación de 6 muestras (familias M2) por pocillo. Las proteínas fueron precipitadas de la disolución mediante adición de NaCl hasta una concentración final de 750 mM y KOAc hasta una concentración final de 1,2 M en hielo seguido de una breve centrifugación. Se añadió PEG8000 al sobrenadante hasta una concentración final de 8%, se mezcló y se centrifugó para formar una partícula de ADNg. Las partículas fueron resuspendidas en una mezcla de digestión CST (Invitrogen) y el ADNg fue extraído siguiendo el protocolo del fabricante usando un sistema de manejo de líquidos robotizado Biomek FX (Beckman-Couter, Inc., Fullerton, CA). Después de la elución, se obtuvieron alícuotas de las muestras de ADN y se llevaron a múltiples placas selladas y se almacenaron a -80°C o a 4°C en un recipiente con humedad.

Ejemplo 10: escrutinio de mutantes de eliminación basado en PCR.

Para realizar el escrutinio de eliminaciones en un gen diana, se puede aplicar un método basado en PCR. En la solicitud de Patente de EE.UU. 20050053975 se describen ejemplos de varios de dichos métodos. Por ejemplo, se pueden diseñar cebadores de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia genómica que flanquea el gen de interés en base a los datos de secuencia correspondientes a la localización. Las muestras de ADN se pueden someter a amplificación de PCR usando métodos y enzimas disponibles comercialmente (LA-Taq) optimizados para una PCR larga según las recomendaciones del fabricante (Takara-Bio, Inc., Shiga, Japón). La detección de eliminaciones se puede llevar a cabo mediante electroforesis de gel de agarosa rutinaria (Sambrook) para visualizar las bandas de productos de PCR. Para ilustrar la utilidad de este método, los cebadores de oligonucleótidos que corresponden a la secuencia de ADN genómico que flanquea una localización Adh-1 de maíz fueron diseñados en base a información publicada. Dichos cebadores fueron usados para amplificar ADN genómico de maíz en las siguientes condiciones: se añadieron mezclas de reacción que contienen 1X Tampón LA-Taq, dNTPs 1,6mM, MgCl₂ 0,5 mM, DMSO al 2% y enzima LA-Taq, a la plantilla de ADNg (1-30 ng) y a cebadores de oligonucleótido 0,4 μM (cebador Adh 16s: 5'-GTCTGACAACGCCTGAGATTGAATCGAAGACC-3', cebador Adh21a: 5'-CAGCTACCACTTGCGCTTGAGGGATTTGAA-3'). La reacción PCR se amplificó bajo el siguiente régimen de temperatura en un termociclador automático (MJ Research, Waltham, MA):

Etapa 1: 94°C durante 1 minuto; Etapa 2: 98°C durante 10 segundos; Etapa 3: 70°C durante 15 minutos; Etapa 4: repetir las etapas 2 y 3 durante otros 31 ciclos adicionales; Etapa 5: 72°C durante 10 minutos; y Etapa 6: mantener a 4°C para almacenamiento.

Los productos de PCR resultantes fueron analizados usando electroforesis de gel de agarosa convencional. El producto de amplificación así generado abarcaba el gen Adh-1 completo más varias kb de secuencia flanqueante, para un total de 12,3 kb de secuencia de ADN. En el caso de que el ADNg plantilla utilizado en dicha reacción contenga una eliminación dentro de la dicha envergadura de 12,3 kb, se puede detectar un producto de PCR más pequeño, lo que indica una mutación en el germoplasma fuente. Nosotros hemos aplicado este método a varios otros genes de interés. Tal como se muestra en estos ejemplos, un especialista en la técnica puede detectar reacciones PCR que producen productos de amplificación de tamaño reducido respecto a los controles. La fuente de la semilla de la plantilla de ADN usada en estas reacciones puede diseñarse como un mutante de eliminación putativo y someterse a un análisis repetido. Una vez que la eliminación es confirmada, el maíz mutante procedente de dicha familia puede ser cultivado y auto-polinizado para generar germoplasma homocigoto. Los niveles de fitato en semillas procedentes de dicho germoplasma pueden medirse en 10-20 semillas M3 usando ensayos convencionales para la detección de ácido fítico, tal como describe Raboy, ver anterior. Las semillas que contienen un nivel reducido de fitatos pueden ser recultivadas y evaluadas para determinar el valor nutricional potenciado en ensayos de alimentación con animales o en otros usos.

Referencias:

- Altschul, S.F. et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.
- Guthrie, C. y Fink, G. (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Meth. Enzymol. v194. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Ives, E.B. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 36575-36583.
- Li, X. et al. (2001) *Plant J.* 27: 235-242.
- Liu, M. et al. (2001) *J. Magn. Reson.* 153,133-137.

Raboy, V. (2000) Low Phytic Acid Mutants and Selection Thereof. Patente de EE.UU. Nº US006111168 a nombre de: Los Estados Unidos de América representados por la Secretaría de Agricultura, Washington, DC.

Sambrook, J. y Sambrook, D.W. (2001) Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

5 Shevchenko, A. et al. (1996) Anal. Chem. 68: 850-858.

Shi. J., et al. (2003) Phytate Polynucleotides and Methods of Use. Solicitud de Patente Internacional Nº WO2003027243. Solicitante: Pioneer Hi-Bred International, Inc., EE.UU.

van Harten, A.M. (1998) en Mutation Breeding Theory and Practical Applications. Cambridge University Press, Cambridge, R.U.

10 Verbsky, J.W. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 31857-31862

Weigel, D. y Glazebrook, J. (2002) Arabidopsis A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Zhang, H.-B. (2002) Construction and Manipulation of Large-Insert Bacterial Clone Libraries Manual. Department of Soil and Crop Sciences y Crop Biotechnology Center, Texas A&M University. disponible online:
15 <http://hbz7.tamu.edu/index.html>.

SEC ID N°: 1

1 cttcagtcce tttccccggg ctgtggtacc agtactagta ccagcatctc ttcaggctcc
61 accaagcgca gacaccgcag cagcggcagc ggcacgatct ggtgaccccc cgccgcgtca
121 agcctgctec tccgggtgac gccggactgg cggggtagga accagcggag cgcagccccg
181 ctccttccgc tgcagaagat cctcgatgga gatggatggg gttctgcaag ccgaggatgc
241 caaggactgg gtttacaagg ggggaaggcg cgcaaatctc atcctcagct acaccggctc
301 gtcgcccccc atgcttgcca aggtactgcy gctcaagaag attctaaaaa acaagtcgca
361 gcgggcaccg agttgtattg tattctcaag tcatgagcaa ctctgtggg gccatatccc
421 agaactggtt gagtcggtca aacaagattg cttggtctca gcctatgcag tgcattgtat
481 gagcaaacac ctgggtgcca atcatgtcga tgggtgggtc cgtgtacgtg tttctagggg
541 ttttctggag ctgtgcgaaa agaattgtct tagcagccgt cctgctggga gagtaaatgc
601 aagttcaatt gataacactg ctgatgccc tcttctaata gcagaccact ctttatttcc
661 tggcaatcct aagggtagca gctgcatagc tgtagagata aaggccaaat gttggtttct
721 gccatcatca gaatatatat cagaagataa tactatcaag aaactagtaa cgagatataa
781 gatgcatcag cactcaaat tttatcaggg tgagatatcg aagactagtg agtacaatcc
841 tcttgatcta ttttctgggt caaaagagag aatatgcatg gccatcaagt ccttttctc
901 aactcctcag aacaacttaa ggattttgt caatggatct ttagcttttg gtggcatggg
961 aggtggtgca gatagtgttc atcctgtcga cactcttaag tgtcttgaag atctcagcaa
1021 gattagtggc ctaaaactcc ctgacttcac tgagctcctg tcagagacaa tttttaggtc
1081 tgaggatta ggcaacctgt tggccactca aaagctggat gatcatgaca ttgaaggggt
1141 aattcatctg tactacaaca taatttctca gccttgttta gtctgcaaaa acctaaactga
1201 tgtagagcta ttgcggaagt aactttctt gcattctctt ccgttggaca aaagcctgaa
1261 gatcgtagg gacttctca tttctgtac cgcaaggac ttagcctga tgcagcctt
1321 tcggccaaga gagaatggta gtacagattc tgagtatgat tcagtgttcc ttgaatcagc
1381 gaagcgcaacc tatgagtaca aggcataatt ccttgatctg gatgtgaaac ctctggataa
1441 gatggagcat tattttaaac tggatcagag gatagtcaat ttctacacaa gaaatggggg
1501 aggtcttgc atctccaaag ggcagtaata ccaaagacac ttcgaggatt cagctccaag
1561 aacggggagc ctctcttct gtatacatct ggagaagggt gcatcagggg gtgttgggtg
1621 ttgtctctgc tgcttgggtc tgctgttcta acttcatgag tacagtcca aggttgggag
1681 gctcgacct taacgcctgg aaagggcaca gggagctgtg ttgtccgtca gtcgctgtg
1741 taactaagta gtgcatacac cgtggttgt cacagtaatt tccgaagatg tccaacgtta
1801 gttgagacaa ctgaacttct taccgtggca atcactcatt gtaacatcaa gttgaaaatg
1861 agggctgaag tttccctcac aggtaccat atgtgagata tgccttctt ttgtaccact
1921 aagtggccct gtgtcatgta tgaatgtat tcaatttgct attgcagaaa tgtttgggta
1981 aactttcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

SEC ID N°: 2

memdgvlaadadwvykgegaanlilsytgsspsmlgkvlrkkilknksqrapscivfssheqlwghipel
vesvkqgclaqayavhvmsqhlghanhvdggvrvrsvrdflveknvssrpagravnassidntadaalliadhs
lfsgnpgssciaveikakcgflpsseyisedntikklvtrykmhqhlkfyqgeisktseynpldfsgskericma
ikslfstpqnnlrfvngslafggmggadsvhpadtlkclcdlskisglkpldfellsetifrvlgnllatqklddh
diegvihlyniisqpclvcknltvdellrkytflhslpldkslkivrdflisatakdcslmisfrprensstdseydsvf
lesakrtyeykayfldldvklpdkmehyfkldqrvnfytrmgglaiskgq

SEC ID N°: 3

1 tcccttggtgta gacgaggcct tgacctgaac cgtgttcac c agtctttgcg atttggctg
 61 agagtgcctta ccagccgtgt ttatgagtggt tggagggtacc actaattacg gtacccgaca
 121 agaaatatca aaataaatag taattctggc atatatctag aagtgataaa taataaacaa
 181 tcaacttatg taacttggct aggtgcatcg caatgtccct atccccctacc agaaaaataa
 241 tcaaacacat catctacagt cctacaccat caccatcctc atcctcctcg agacgatcca
 301 catcctggaa cctattatgc catgcacggt cccgacgatc accacataag tacatatttt
 361 ctatattttt aattaaactt tttaaaataa tttcagaaaa aaacgataat tttgttttgt
 421 tttatgatgg agctaggaga gactgaattt cctcctgcaa ttttgggagt tttggacgga
 481 gcgagagcca gaattcgacg ctggcggcgg cgcgtcgcca atacgcagcg cggatgtgga
 541 gccacatgca aacgtgtgtc cgcgccgctg gcgtccactc tccctccacg tttcggcgtc
 601 ctcgtcgcct tcctgggaaa tctccagcta ctgcccactg ccccttccct tcagtcctt
 661 tccccgggct gtggtaccag tactagtacc agcatctctt caggctccac caagegcaga
 721 caccgcagca gcggcagcgg cacgatctgg tgaccccccg ccgcgtcaag cctgctcctc
 781 cggatgatgc cggactggcg gggtaggaac cagcggagcg cagccccctt ccttccgctg
 841 gtaagaccgt aagagtgacg cccgcccgtt cctccctccg ctcgcttctt tgctctcccg
 901 attctggcgt accagtctca ccgcggttg gggattggat acggagctag ttaaccagca
 961 gagctagata gcagatgcag attgcttgct tctctggttt gatttttggg gtcaccattt
 1021 ctgtttggtt cgtgtgcctc ggtgtctgac agcagaagat cctcgtatgga gatggatggg
 1081 gttctgcaag ccgcggtatg caaggactgg gtttacaagg ggggaaggcg cggaatctc
 1141 atcctcagct acaccggctc gtcgccctcc atggttaagcg ctgagtaggt tcttactgag
 1201 cgtgcacgca tcgatcactt gactttaggg gctcaatgtg tgattcacgg gtgccgcggc
 1261 gccattcgag ctccagatcc agtaccgctc gagcaagtga taaaacatgg agcagggacg
 1321 atcacgtggg cacttgaaaa ttacgtgagg tccggggcga cgatgtacgg cgcggcgaac
 1381 tctcaaacac tcacacaacc aaaaccgctt cgtgttcgtc tttgttccaa gcgactgtgt
 1441 gagtgtttga gagttcgcca gcgcgacatc gcccgatctg acaaatgaag ctttctgtgc
 1501 ttttccatga ttgtgcattt tgtgagcatg cactgaatac tatgatggat atgtttggag
 1561 gaagcattat tccaatttga tgataagggt gttatttaca cttgttttca gcttggcaag
 1621 gtaactgcggc tcaagaagat tctaaaaaac aagtcgcagc gggcaccgag ttgtatttga
 1681 ttctcaagtc atgagcaact cctgtggggc catatcccag aactggttga gtcgggtcaa
 1741 caagattgct tggctcaagc ctatgcagtg catgttatga gccaacacct gggtgccaat
 1801 catgtcgatg gtgggtatg gttcagattc agttcattta tgcctgttga ttgtgatttt
 1861 gatttgtaac atattgacaa cctcgacact tgggatcaga ttcagttcac ttatggaaga
 1921 aattggagaa ttgttataat ttatctataa tcaccctac tgaaatagaa ataacatggc
 1981 atcaatgtgc atgctattgg attttgacac gaatatgctt tattctatca tatgttggta
 2041 attccagcag gcagcaggca ctactctttg gatccacgtg acttgacaaa gaaatcatgc
 2101 catctttcca caatgcaggt ccgtgtacgt gtttctaggg attttctgga gcttgtcgaa
 2161 aagaatgttc ttagcagccg tctgtctggg agagtaaatg caagttcaat tgataacact
 2221 gctgatgccc ctcttcta at agcagaccac tctttatttt ctggtacgta ctctatccct
 2281 cttcttacca taatctgaat ctgtttaaagg tttaaaatat atgattgatt aagtaaaatc
 2341 cagagctcta ttcatatctc atgcactgat gttttgatga aacacttga gcaagcggg
 2401 tgccctgttat ttctatttgc attagacgaa cagtcacctt tgtttataaa ggtctttgaa

2461 ttgagcttc ttataagttt aagtttgcaa ctgtcactta caacagccca atgggtagca
 2521 tcaagattgt ttttttcagt gattcataac tcaactcttg gttaaaccgc tagaacattg
 2581 ttggtgtcctt aaaatgcaac tggctctgag gccgtaacct gaaatcattg tacttttctc
 2641 tcattttctt agatatttcc aaaactctac attagatgat ttatgtttgc tcaacttagtc
 2701 tttcttaatc tcaggcaatc ctaagggtag cagctgcata gctgtagaga taaaggtagt
 2761 ttgcaagctt cctcttttat tcttattttt catttcttat gtatatttct cctcaacct
 2821 ttgacttctt ttcggcatgc tctaccttgc aggccaaatg tgggtttctg ccatcatcag
 2881 aatatataatc agaagataat. actatcaaga aactagtaac gagatataag atgcatcagc
 2941 acctcaaatt ttatcagggt gaggtgtgta gattggaatg cttgatgcct tgatccaaga
 3001 taaaattcca ctctcttttg cgcacttaaa aaacatccat cgatgatata aacttgatca
 3061 aaatacctta aggcttgta tttacggcac tggttgtaata ttataccgtc tcttgctttt
 3121 tgacatcagg ttgattccca atacattctt gcacacattt cagatatacg agactagtga
 3181 gtacaatcct cttgatctat tttctgggtc aaaagagaga atatgcatgg ccatcaagtc
 3241 ccttttctca actcctcaga acaacttaag gatthttgtc aatggatcct tagcttttgg
 3301 tggcatggga ggtggtgcag atagtgttca tcttctgac actcttaagt gtcttgaaga
 3361 tctcagcaag attagtggcc taaaactccc tgacttcaat gagctcctgt cagagacaat
 3421 ttttaggtct gaggtattag gcaacctggt ggccactcaa aagctggatg atcatgacat
 3481 tgaaggggta attcatctgt actacaacat aatttctcag ccttgttttag tctgcaaaaa
 3541 cctaactgat gtagagctat tgcggaagta cactttcttg cattctcttc cgttggacaa
 3601 aagcctgaag atcgttaggg acttctctcat ttctgctacc gcaaaggact gtacacctgat
 3661 gatcagcttt cggccaagag agaatggtag taccagattct gagtatgat cagtgtttct
 3721 tgaatcagcg aagcgaacct atgagtacaa ggtatactac tgtgaaatat ggtgtcgttt
 3781 tacctttatc ttctaategt ccagcactct agccacaaaa ctagcaatat agttcacaag
 3841 tgagtttgcc tgtggattta tttctttctt tatttttcgg cataaatggt gctaagttga
 3901 ccattcattt gcaggcatat ttccttgatc tggatgtgaa acctctggat aagatggagc
 3961 attattttta actggatcag aggatagtca atttctacac aagaaatggg ggaggcttg
 4021 ccatctccaa agggcagtaa taccaaagac acttcgagga ttcagctcca agaatgggga
 4081 gcctctcttc ctgtatacat ctggagaagg gtgcatcagg gagtgttggg tgttgttctt
 4141 gctgcttggg gctgctgttg taacttcatg agtacagtcc caaggttggg aggctcgacc
 4201 cttaacgcct ggaaagggca cagggagctg tgttgtccgt cagtcgctgt tgaactaag
 4261 tagtgcatac accgtggctt gtcacagtaa tttccgaaga tgtccaacgt tagttgagac
 4321 aactgaactt cttaccgtgg caatcactca ttgtaacatc aagttgaaaa tgagggtga
 4381 agtttccctc acaggctacc atatgtgaga tatgtccttc ctttgtacca ctaagtgcc
 4441 ctgtgtcatg tatgaatgta tctcaatttg ctattgcaga aatgtttggg gaaactttca
 4501 tcttccatg ctttgagcaa agctaacta acttctttga atctgttggg cttattctag
 4561 caaatcctgg ctgacggatg gacctgcgat gctgtctgct ttggctgtga tggctacagc
 4621 ctgagcctac gggcacaagc gccagtcggc tgtcgcctc cagccactgt tcttgtctca
 4681 tgattctgct atgtctgaag aactaggtaa ccggaaggca ccaagtgtga agtgtctcta
 4741 gtaactgctt cttatattgt tgttatttat ttgatcaaga actcacgtag cctttgatc
 4801 ggcaacaccg tccggcgaaa gttggccgtt tgcagagcta gtcaggggtg ttcagcttcc
 4861 agcctctaga cagagacaaa tgtgcttctg gtttaaacag ttaggaattg cagctaagt
 4921 ggtgttttgt ttctatagac taattttagt ctcttcatta ttatatttta gtttctaact
 4981 taccaaatac gaaagctaaa actctatttt aatttctgta tctaataatt taagaactag
 5041 aatggaataa aacagagaga ctaagaatta gtccctagaa accaaacaat ttctaacta

5101 ttttttcaat aaagagtgtt tattaactc aagatttagc atcacgccga tacaacta
 5161 aagagttcac gccagcctc tgcacaacta tgcacaacta aggtgcacac aacctacaac
 5221 tatgcacaac taagggtgat acaacctggt aacacaaaac atgaaaaaca acaccaagcc
 5281 aaatataact aaaataacga atggctgatc cgtagactag actgtcatcc atgtcagggg
 5341 aaattgtccc tcgtcacacc cacacgctcc aactgtgtac acaactacac accttcaaaa
 5401 acagctctct gccgaacgct gaagaggctc cctactactg tgtatttctg tagggatca
 5461 ggaccacgca cgtcaaagct gtggttttct gtcaccagcc gaaattcttg aacatcgcac
 5521 aagaggtgaa acggatgctg caatgtagtc gctgagcaac gcaagttaga aagagaccga
 5581 gagctggtgc tagcaattgt tattatgatg gccaatgcaa aggacagagt gaggcacgac
 5641 ttttctctc acccttaccat tgtttataga atagaatcta aatacgagta tgaggatgga
 5701 taaacggtag atagccttat aagttaatca ctcatcggct ttactctcga attggactat
 5761 acttcagcag gaggagaact tgaagagggt ggggtcggag ggacggttgc tcttggtgtg
 5821 ggcagctacg aacctttttt ttttttttg gtcacatgga tagtacagcg gtctagtctt
 5881 cggattaaag gctactgctg tgtttgtctt aaattttgct tatgttgctg gttgtgtgtt
 5941 ctaaacagaa gctagaagaa cgtattgttt tttatatcta taaaatgctt cttttctttt
 6001 atcgaaaaaa ggggacaaag cgaggcagcg agcgattgga cttctccatg caggggttga
 6061 gctacceaat ttgtcgtctc aaccacctga aaactaacia agaatatatg cggcagggga
 6121 gctagcaaca cacctgccgg cggcacttg ccactgtttc atgcaaggcc agagaaatta
 6181 aagcggcggc gaagcaaagg gacccgggcg gccggcgctc atgtcgaagg tgacgggtct
 6241 caaggtggac acctcctcgc ccaaatgcaa gcgcaaggtc ctgcaggccg tcaccggcct
 6301 ccatggtacg tacacggtat acacgtcgga gctagctatc ccgcttcttc tcttctttg
 6361 ttcggccatg catgcacagc acgcgcgac catagattcc gttcccggca ataatgtaa
 6421 gatcgttttg gctgggacgc tgggtgatgt gcggtgcgcg cgcaggtgtt gacaagatcg
 6481 aggtggactc ggagaagagc acgatgacgg tgactggcac cgtggaccgg gtggacgtga
 6541 tcgtgcaggc gaggaaggcc gggaaagcgc cgtccgtgct caccatcggc cctccggcgc
 6601 cgccaagcc ggccgaggag aagaagccc ctgagcagga taagaagaag gtggaggaga
 6661 agaagacggc ggtggcgacg gcggcgggtg cggagaagaa ggcgcccag acgccggcca
 6721 cgggtgtcgt ccaccacgtc ccgctggtgc ctccgtgccc caggtaccag gagagagtag
 6781 tgtacgagca ggacccccg ccttgtctca tcatgtaatg taactatata cggatttgac
 6841 caggagtata catgttcggt tggaaactag aacgcaagaa ctttgaaga tcttgtctt
 6901 ttgtattcta taaacttata gatgtgccag tgtcatggtc tgcggacc gggacagaca
 6961 cgcacgacgt gccacatggc atggatcgag ccaggcttca tgactgaccg actgttgaca
 7021 tagctcatcg aatcactttt catgccaggt ttgtctaaaa aaataggccc tacgaaacct
 7081 atgagactag cccgatcgag gcccgctgt taggaagaga gagagagtca ccgcttctg
 7141 gctcggctc gtcaatggct caatgcacgg cgtgtactca acgcaatgga tcgatgaata
 7201 aaatttgatg ttgatataat agcacatcaa tcctttttat attagacatg ttgtctttat
 7261 ttttagaca aaaggtagta ccagtgcagc tgacaaacac aaagacgaaa atttatggga
 7321 ggacatgaag actgcatgac aaaattatga ccataaatgt ccatataat caagttttat
 7381 atcaatacac gatacaactt taaataaaga agttatatga ataaaagaag caaacatacc
 7441 gttaaathtt tgttgacaga gacaattgca tccttcttgt tttgagatgt cgaaatcacc
 7501 gaataatgaa tttgaagatc tctttgagta taacaaacca ttaaacggt ccaattatct
 7561 tcaatcttgt tacgcagttc tctcttaatt agctgaaaaa gttctcccaa cacttgcct
 7621 tgacacatgt aataacatgg ccaactcaat tagctttag agtaaaggaa aggcaacata
 7681 tgttttccgg ttgaaccgct ttaatagaaa tagatgcaat atctttacaa aactaaaag

7741 cagcatgtct tctcacatga aagaatata gtctcgagag ttactctctt aactctgcac
7801 gttcacacaa ctgtgaaatc ttgatcatat aactaactaa gattatctag attaagttaa
7861 catataaaag gattttttgg atcaaagcaa gaaaaaccaa ctatcggctc acttgaagct
7921 tcaactaaacc gatgacataa ctctgtattg attttatcaa aaataacaaa gaatatctcg
7981 atgtggtagt ggtaaagttg taaaggtttg tgactatgaa tccatctcgc ctctcataac
8041 ttctgcatct acgtggatta agatccataa tctaattttt ttgcaagcca ttaaattcac
8101 ctctcatatt cgatgaaccg tcatattcct attctccaat cttggatata gataagccct
8161 gatgatccag aataaaaaaca ctagatatca aatccaaggt gtgtgtatag tagtatatct
8221 tgtcgaatgt caatcttgtt gaagggcgtc gaagcgtcgg gatgggggca tgaatagggg
8281 aaaaattgct gcaatccggc tgcaaacctag aatgtttata gaccctcaca aaaataagta
8341 tagacctcac ctgcaggtac atcagataac gtttttagtta cgcgggctgc catgcatgaa
8401 cgcacgcgct aaaactttga aagacacagg cggctaataga tacttgactc tactgctagc
8461 tactgaaaac gtgcggtgag cacctttcgt ttctctcctt tatccctgtc ccgagcattg
8521 gtttgcggtt gtccctccaat tcaatttgat ctgggatcct gcgggacat gcacgctcc
8581 tccccatct tcttccctt ctctctctt aacagggctt ctattactc tctttgggc
8641 acgtgagatt ttgagttttg aaagacctg ttgtttgtgc acgagagttt tcgttatgat
8701 gattttttta gaactgttgt tgtttgatga aacttttacg tgccacatc aatgcatgac
8761 ccgttgccta gatgctatcg ttgctaattt gctattctca actgcggcat ttctgcatc
8821 atgatttaa actgtggctg cttgacatgt accgtagttt gctgaatcat gtgtctgcag
8881 caagcattta cacctgtcat ttgtacgtct gtggatcgtt gtggcggcca tggaaacgct
8941 tgagctcata taccagccgt gccagctcac cggaaagacga gccaccctcc gccacggcgg
9001 cgcgcgccgc ggccccgagc tcccagatc tggtttcct cgcgcgtaac acctcctct
9061 cctgctggtc atcacceatg agcctccca cggcgcgcac caccgatca gccggacca
9121 cagcctccaa gtccgactcg cgtaccgca cggccacgcg gagcacctcc acgaggaaca
9181 gctcgttcag gaactgctcc gcgcggagcg gccacgtcgc gagcggcact ccggcggaca
9241 cggcctccag caccgagttc cagccgcagt gggtagcga gcctcccacc gcgcggtgct
9301 ccaggatctc cgcctgtggc gccaccgcc cggccaccac catgccgttg ctggacgcgc
9361 gcgcctccc ctccgcgcag ccgccgtccc cgcggggcgt cgtcgagacc acccagacga
9421 acggccggcc cgacgcgcgc agcccgggtg ccagctcacg aagctgggtc tccccagcg
9481 agcacgtgct cccgaagcac acgtaaacca acgaaccctc gtccgggccc gcgagccact
9541 gcaaaatcgg gtcccgttc gtaccgccgc tggcgacggg caaatgaaaa tggaaaaacc
9601 gtggggccca acaagaaaat ttccttggcc tccccggaa ctggcctacg taataccccg
9661 ccaaatcgg cgtccaacgc a

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido vegetal aislado que codifica para una inositol polifosfato 2-quinasa, polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2.
- 5 2.- Un polinucleótido vegetal aislado como el reivindicado en la reivindicación 1, donde el polinucleótido comprende la SEC ID N°: 1 ó la SEC ID N°: 3.
- 3.- El polinucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el polinucleótido codifica para una inositol polifosfato 2-quinasa de maíz.
- 4.- El polinucleótido de cualquier reivindicación precedente, donde el polinucleótido es ADN.
- 5.- El polinucleótido de cualquier reivindicación precedente, donde el polinucleótido es ARN.
- 10 6.- Una proteína vegetal aislada de inositol polifosfato 2-quinasa que comprende un polipéptido que tiene la secuencia fijada en la SEC ID N°: 2.
- 7.- Un método para identificar un tejido vegetal que comprende una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6, que comprende:
- (a) someter a un tejido vegetal a mutagénesis;
- 15 (b) obtener una muestra de ADN del tejido vegetal sometido a mutagénesis o de sus descendientes;
- (c) evaluar el ADN de la muestra para determinar la lesión en el gen que codifica inositol polifosfato 2-quinasa.
- 8.- El método de la reivindicación 7, donde la mutagénesis es mutagénesis por neutrones rápidos y el tejido vegetal es tejido de maíz.
- 9.- Una semilla de maíz que contiene una lesión inducida artificialmente en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6, donde la lesión afecta a la actividad del gen que codifica la inositol polifosfato 2-quinasa y donde la lesión inducida artificialmente es un bloqueo génico.
- 20 10.-Una planta de maíz producida mediante el cultivo de la semilla de la reivindicación 9.
- 11.-La planta de maíz de la reivindicación 10, donde dicha planta ha sido despanojada.
- 12.-Un cultivo de tejido de células regenerables que contienen la lesión inducida artificialmente en un gen que codifica inositol polifosfato 2-quinasa producida por la planta de la reivindicación 10.
- 25 13.-El cultivo de tejido de la reivindicación 12, donde las células del cultivo de tejido proceden de un tejido seleccionado del grupo que consiste en hojas, polen, embriones, raíces, puntas de raíz, anteras, pelos, flores, granos, espigas, mazorcas, vainas y tallos.
- 14.-Un método para disminuir el nivel de ácido fítico en un pienso para animales, que comprende: producir un pienso para animales a partir de una planta que contiene una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6, donde el pienso para animales tiene un nivel reducido de fitato.
- 30 15.-Un método para disminuir el nivel de fósforo en los desechos de animales que comprende: proporcionar un pienso para animales procedente de una planta que incluye una lesión en un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6.
- 35 16.-Una semilla mutante no letal de una especie de planta de cereal **que se caracteriza por** un bajo contenido de ácido fítico respecto al germoplasma parental de la especie, donde la semilla mutante tiene una actividad alterada de una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6.
- 17.-Un pienso para animales que comprende la semilla de la reivindicación 16.
- 18.-Un anticuerpo purificado generado usando un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2 como inmunógeno.
- 40 19.-Un kit de inmunodetección que comprende, en un medio contenedor adecuado, el anticuerpo según la reivindicación 18, y un reactivo de inmunodetección.
- 20.-El anticuerpo purificado de la reivindicación 18, unido operativamente a una marca detectable.
- 21.-Un método para aumentar el rendimiento de semilla de una planta, método que comprende:
- (1) integrar en el genoma de la planta un vector para la transformación de células vegetales que comprende:
- 45 (a) secuencias de nucleótidos antisentido sustancialmente complementarias a (i) una porción correspondiente

de una cadena de una molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa, donde la molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa se hibrida en condiciones de severidad baja o moderada con la SEC ID N°: 1, ó (ii) una porción correspondiente de una secuencia de ARN codificada por dicha molécula de ADN que codifica inositol polifosfato 2-quinasa; y

5 (b) secuencias reguladoras ligadas operativamente a las secuencias de nucleótidos antisentido de tal modo que las secuencias de nucleótidos antisentido son expresadas en una célula vegetal en la cual es transformada; y

(2) cultivar dicha planta, donde dichas secuencias de nucleótidos antisentido son transcritas y unidas a dicha secuencia de ARN y se inhibe la expresión de un gen de inositol polifosfato 2-quinasa.

10 **22.**-Un método para generar una planta mutante que tiene un rasgo deseado proporcionado por un bloqueo génico de un gen que codifica una inositol polifosfato 2-quinasa como la reivindicada en la reivindicación 6, método que comprende:

(a) proporcionar una colección de polen de planta o de semillas de planta;

15 (b) tratar dicha colección de polen de planta o de semillas de planta con irradiación seleccionada del grupo que consiste en UV, irradiación gamma, rayos X y neutrones rápidos; y

(c) seleccionar las plantas mutantes que tengan el rasgo deseado.

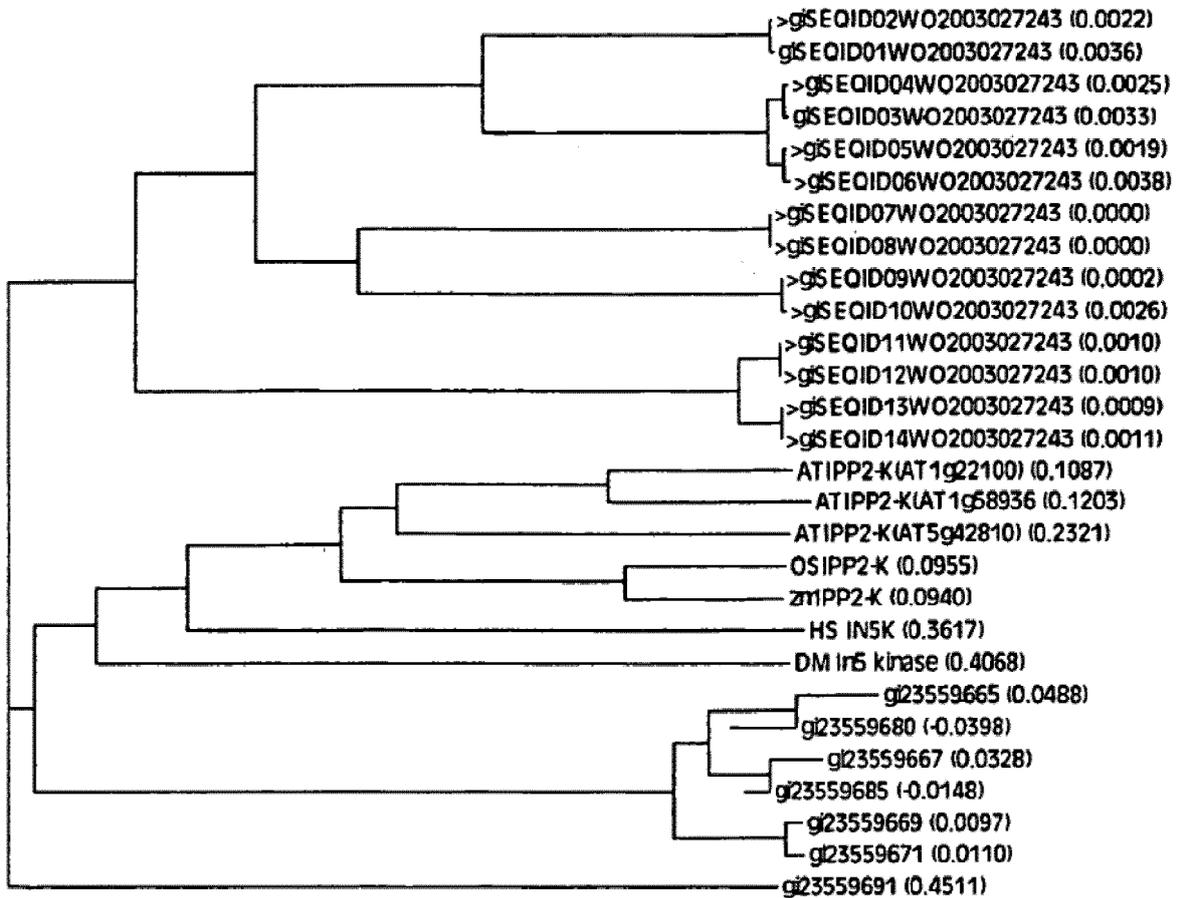
23.-El método de la reivindicación 22, donde la colección de semillas de planta es una colección de granos de maíz o de semillas de canola.

20 **24.**-El método de la reivindicación 23, donde la irradiación es con neutrones rápidos y donde el polen irradiado se usa como fuente de la mutación.

FIG. 1A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
gi23559665 (1)	100	78	85	50	44	44	43	44	41	18	19	30	76	76	78
gi23559680 (2)		100	80	49	42	43	42	43	39	17	18	28	70	70	100
gi23559667 (3)			100	50	44	44	44	46	42	19	20	31	82	82	80
gi23559691 (4)				100	42	44	43	44	40	22	22	31	41	41	49
WO2003027243-1 (5)					100	76	77	61	56	28	28	31	36	36	42
WO2003027243-2 (6)						100	98	60	53	27	28	31	35	35	43
WO2003027243-3 (7)							100	60	53	27	28	31	35	35	42
WO2003027243-4 (8)								100	65	27	27	32	39	39	43
WO2003027243-5 (9)									100	22	22	28	39	39	39
WO2003027243-6 (10)										100	95	8	11	12	17
WO2003027243-7 (11)											100	9	12	12	18
zmlPP2-K (12)												100	27	27	29
gi23559669 (13)													100	99	70
gi23559671 (14)														100	70
gi23559685 (15)															100

FIG. 1B



Algoritmo de Alineamiento Múltiple

El alineamiento se crea usando el algoritmo Clustal W (Nucleic Acid Research, 22 (22): 4673-4680, 1994). Resumidamente, se calcula una similitud bruta entre todos los pares de secuencias, denominada "alineamiento de paridades". Estas puntuaciones se usan a continuación para calcular un "árbol guía" o dendrograma, que indica a la etapa de alineamiento múltiple el orden en que alinear las secuencias para el alineamiento múltiple final. Habiendo calculado el dendrograma, las secuencias son alineadas en grupos más y más grandes hasta que todas las secuencias se habían incorporado en el alineamiento final.

FIG. 2

Comparación de secuencia de aminoácidos predicha a partir de genes IPP2-K vegetales putativos

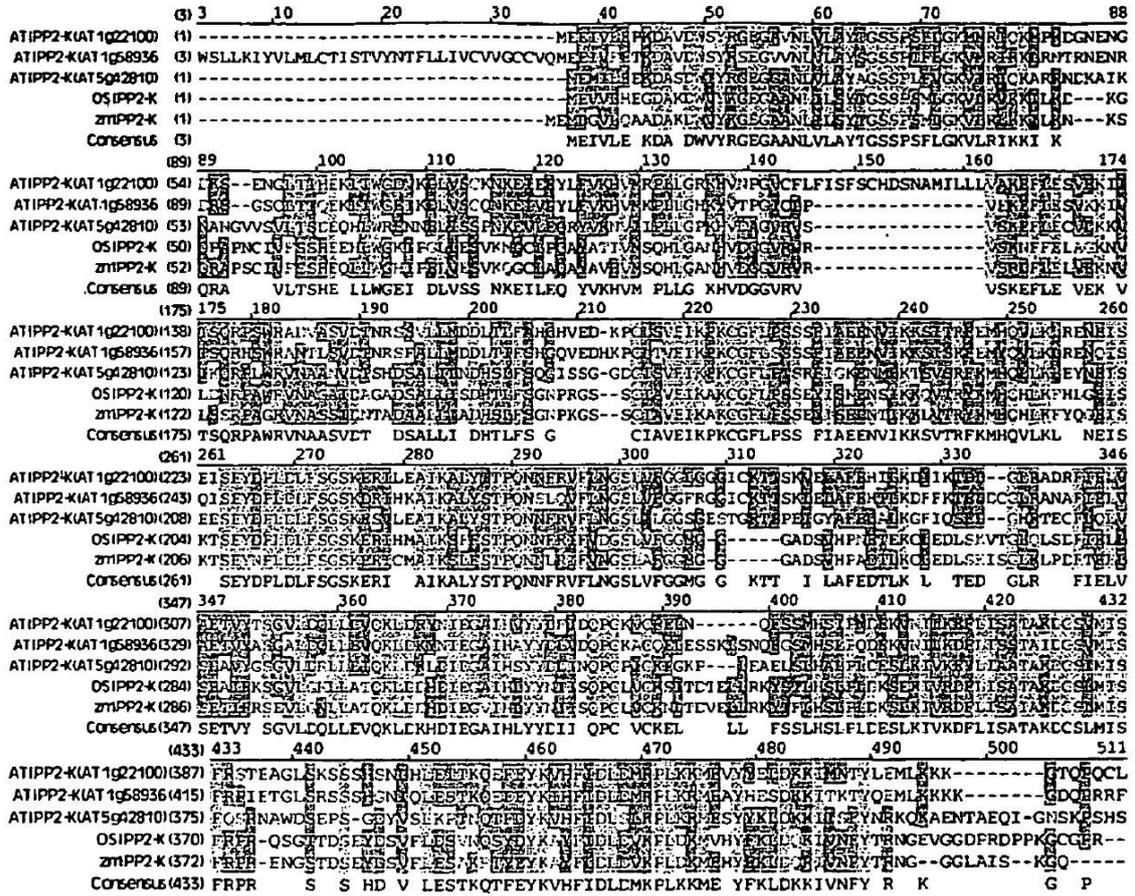
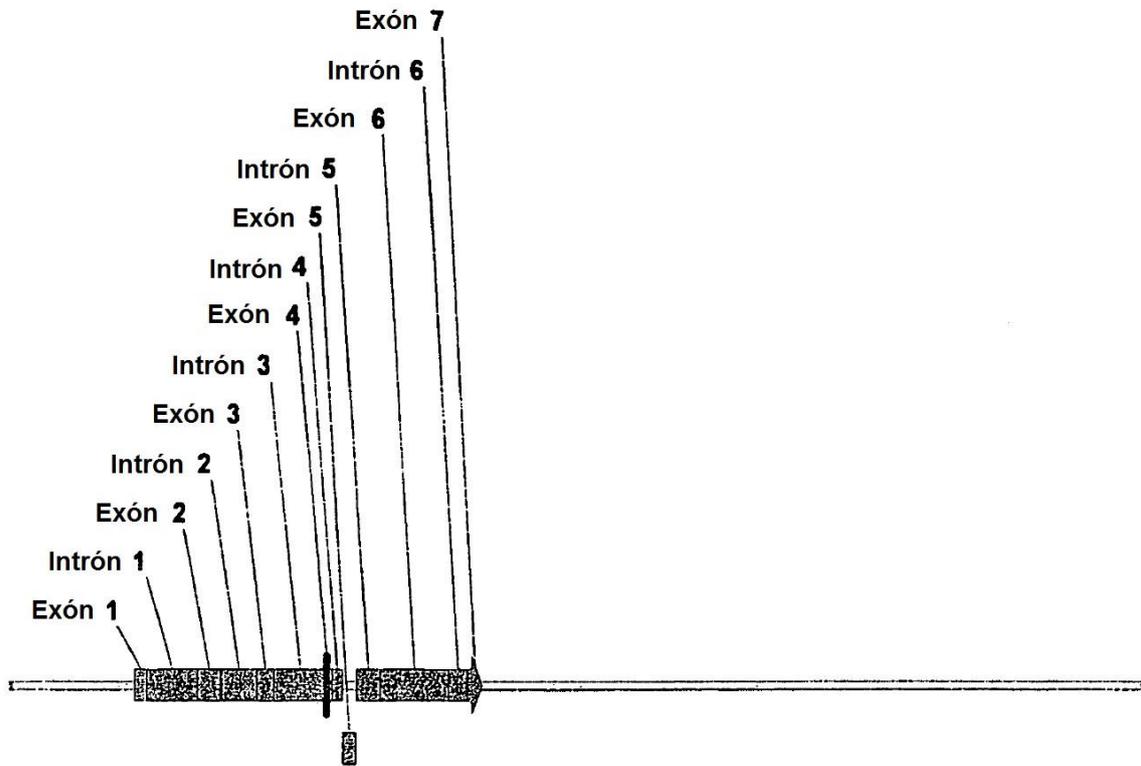


FIG. 3

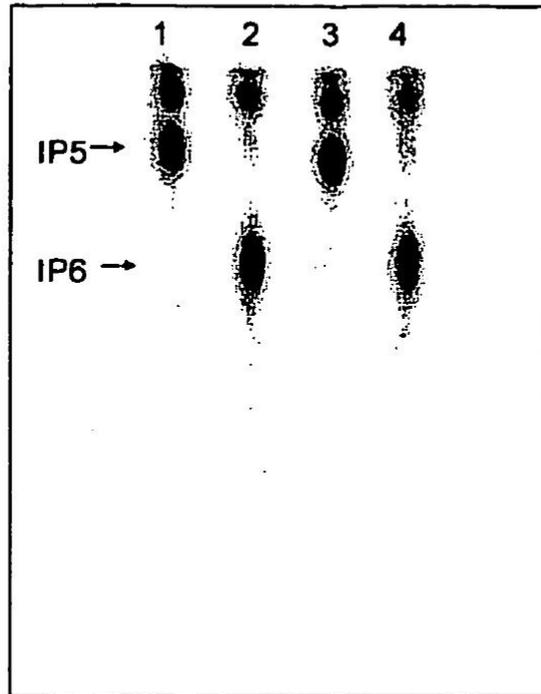


Estructura Genómica de IPP2-K

9681 pb

FIG. 4

Actividad in vitro de enzima IPP2-K sobre sustratos IP4 e IP5.



Banda 1: IPP2-K más sustrato de inositol 1,4,5,6 tetrakisfosfato
Banda 2: IPP2-K más sustrato de inositol 1,3,4,5,6 pentakisfosfato
Banda 3: IPP2-K más sustrato de inositol 1,4,5,6 tetrakisfosfato
Banda 4: IPP2-K más sustrato de inositol 1,3,4,5,6 pentakisfosfato

FIG. 5

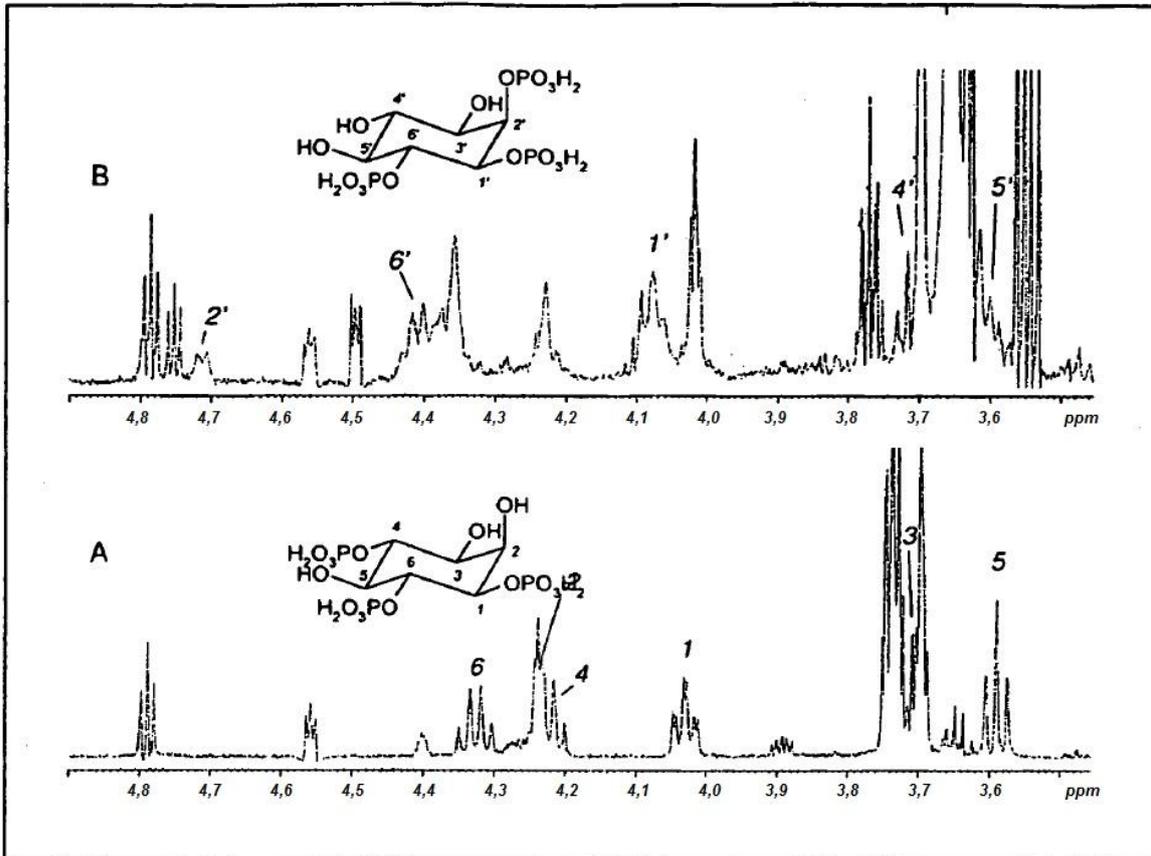


Figura 5. Espectros de RMN de ¹H de 600 MHz de disolución de inositol 1,4,6-trifosfato en D₂O que contiene ATP y DTT. (A) Inmediatamente antes de la adición de enzima IPP2-K. (B) Dos horas después de la adición de la enzima IPP2-K. Se indican los picos correspondientes a inositol 1,4,6-trifosfato e inositol 1,2,6-trifosfato. Los picos no marcados en la región de 3,5-3,8 ppm corresponden a DTT, mientras que los de 3,8-4,8 ppm surgen de ATP y ADP. El protón 3' del inositol 1,2,6-trifosfato está por debajo de los picos de DTT a 3,67 ppm.

FIG. 6

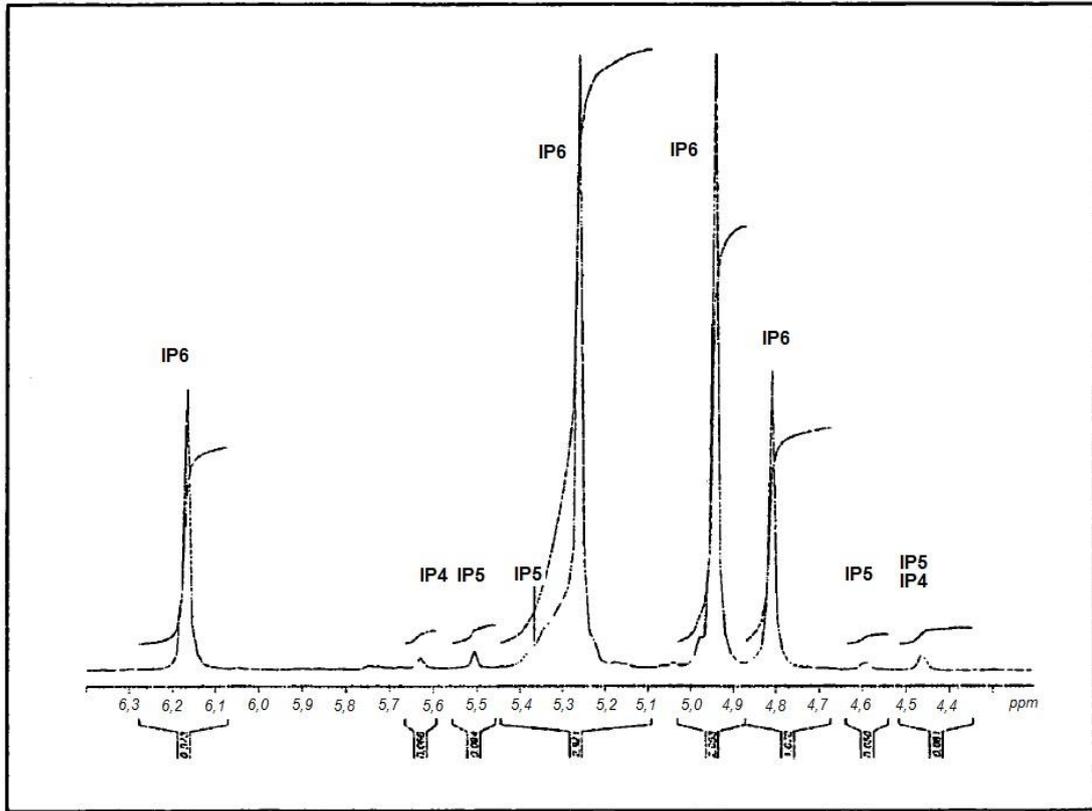


Figura 6. Espectros de RMN de fósforo de extracto de semilla procedente de la línea de maíz cultivada DAS 5XH751. Los espectros fueron obtenidos a 400,13 MHz en un espectrómetro de RMN Bruker DRX-400 con una sonda de 5 mm para $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}$. Los picos están marcados para indicar las especies de inositol fosfato que dan lugar a la señal. IP6: fitato (inositol hexakisfosfato); IP5: inositol pentakisfosfato; IP4: inositol tetrakisfosfato.