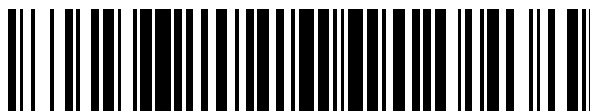


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 771**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.1999** **E 08075612 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017** **EP 1997899**

54 Título: **Método y medios de modulación de la muerte celular programada en células eucariotas**

30 Prioridad:

17.07.1998 US 118276

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

14.08.2017

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE NV (100.0%)
J.E. Mommaertsiaan 14
1831 Diegem, BE**

72 Inventor/es:

**BABIYCHUK, ELENA;
KUSHNIR, SERGEI y
DE BLOCK, MARC**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 629 771 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

Método y medios de modulación de la muerte celular programada en células eucariotas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de proteínas poli(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), particularmente proteínas PARP mutantes o partes de las mismas, y genes que codifican las mismas, para producir células de plantas y plantas, con resistencia potenciada a condiciones adversas en las que la condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico. La invención también se refiere a células de plantas y plantas que expresan tales genes.

Descripción de la técnica relacionada

10 La muerte celular programada (PCD) es un proceso fisiológico de muerte celular implicado en la eliminación de células seleccionadas tanto en animales como en plantas durante procesos del desarrollo o en respuesta a indicaciones ambientales (para una revisión véase Ellis *et al.* 1991; Pennell y Lamb, 1997). El desensamblaje de las células que sufren PCD está acompañado morfológicamente por condensación, contracción y fragmentación del citoplasma y el núcleo, frecuentemente en paquetes pequeños sellados (Cohen 1993, Wang *et al.* 1996).
15 Bioquímicamente, la PCD se caracteriza por fragmentación del ADN nuclear en fragmentos de generalmente aproximadamente 50 kb, que representan oligonucleosomas, además de la inducción de cisteína proteinasas y endonucleasas. La fragmentación del ADN puede detectarse por marcado de extremos cortados por dUTP mediado por desoxinucleotidil-transferasa (TUNEL) de grupos 3'-OH del ADN en secciones de células (Gavrieli *et al.* 1992).
20 La muerte celular por PCD es claramente distinta de la muerte celular por necrosis, implicando la última hinchamiento de la célula, lisis y fuga del contenido celular.

En los animales, la PCD participa en la eliminación o muerte de células no deseadas tales como las células de la cola del renacuajo en la metamorfosis, las células entre los dedos en desarrollo en los vertebrados, neuronas de vertebrados producidas en exceso, células durante la especialización celular tales como queratocitos, etc. Las células dañadas, que ya no son capaces de funcionar adecuadamente, también pueden ser eliminadas por PCD,
25 previniendo que las mismas se multipliquen y/o se propaguen. La PCD, o el fallo de la misma, también ha sido implicada en varias afecciones patológicas en seres humanos (SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lou Gehrig, cánceres).

En las plantas, se ha demostrado o se cree que la PCD está implicada en varios procesos de desarrollo tales como por ejemplo, la eliminación de las células suspensoras durante el desarrollo de un embrión, la eliminación de células de aleurona después de la germinación de las semillas de monocotiledóneas; la eliminación de las células de la cofia de la raíz después de la germinación de la semilla y el crecimiento de plantas de semillero; la muerte celular durante la especialización de las células como se observa en el desarrollo del elemento traqueal de xilema o tricomas, o el aborto de órganos florales en las flores unisexuales. La formación de aeroquima en las raíces en condiciones hipóxicas y la formación de lóbulos o perforaciones de hojas en algunas plantas también parecen implicar PCD. La
30 muerte celular a gran escala en las plantas se produce tras la senescencia de las hojas u otros órganos. La respuesta hipersensible en las plantas, o dicho de otro modo la muerte celular rápida que ocurre en el sitio de entrada de un patógeno avirulento que conduce a una lesión restringida, es otro ejemplo de PCD en respuesta a un estímulo ambiental.

35 Células de animales o plantas moribundas en cultivos en suspensión, particularmente en cultivos en suspensión de baja densidad de células, también demuestran las características de la PCD.

Una enzima que ha sido implicada por su intervención en la PCD o la apoptosis es la poli(ADP-ribosa) polimerasa. La poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), también conocida como poli(ADP-ribosa) transferasa (ADPRT) (EC 2.4.2.30), es una enzima nuclear encontrada en la mayoría de los eucariotas, que incluyen vertebrados, artrópodos, moluscos, mohos del fango, dinoflagelados, hongos y otros eucariotas inferiores, con la excepción de levadura. La actividad enzimática también se ha demostrado en varias plantas (Payne *et al.*, 1976; Willmitzer y Wagner, 1982, Chen *et al.*, 1994; O'Farrell, 1995).
45

PARP cataliza la transferencia de un resto de ADP-ribosa derivado de NAD⁺, principalmente al grupo carboxilo de un resto de ácido glutámico en la proteína diana, y posterior polimerización de la ADP-ribosa. La proteína diana principal es PARP propiamente dicha, pero se ha mostrado que también están sujetas a esta modificación histonas, proteínas cromosómicas del grupo de movilidad alta, una topoisomerasa, endonucleasas y ADN polimerasas.
50

La proteína PARP de los animales es una proteína nuclear de 113-120 kDa, abundante en la mayoría de los tipos de células, que consiste en tres dominios funcionales principales: un dominio de unión de ADN del extremo amino que contiene dos dominios de dedos de Zn, un dominio catalítico del extremo carboxi y un dominio interno que está automodificado (de Murcia y Ménissier, 1994; Kameshita *et al.*, 1984; Lindahl *et al.*, 1995). La actividad enzimática *in vitro* aumenta enormemente tras la unión a rupturas de una sola cadena en el ADN. La actividad *in vivo* se induce por condiciones que dan eventualmente como resultado rupturas del ADN (Alvarez-Gonzalez y Althaus, 1989;
55

Ikejima *et al.*, 1990). La automodificación del dominio central sirve aparentemente como regulación negativa de la retroalimentación de PARP.

La actividad de PARP en las células de plantas se demostró por primera vez examinando la incorporación de ^3H a partir de NAD^+ marcada en los núcleos de las células del ápice de la raíz (Payne *et al.*, 1976; Willmitzer y Wagner, 1982). La actividad enzimática también se purificó parcialmente a partir de plantas de semillero de maíz y se encontró que está asociada a una proteína de una masa molecular aparente de 113 kDa, lo que sugiere que la PARP de la planta podría ser similar a la enzima de los animales (Chen *et al.*, 1994; O'Farrell, 1995).

ADNc correspondientes a proteínas PARP han sido aislados de varias especies que incluyen mamíferos, pollos, *Xenopus*, insectos y *Caenorhabditis elegans*.

Chen *et al.* (1994) han informado actividad de PARP en núcleos de maíz y han asociado esta actividad enzimática a la presencia de una proteína de aproximadamente 114 kDa presente en un extracto de núcleos de maíz. O'Farrell (1995) informó que la amplificación por RT-PCR de ARN aislado de maíz (usando cebadores degenerados basados en las secuencias más altamente conservadas) produjo un fragmento de 300 pb que mostraba el 60 % de identidad al nivel de aminoácidos con la proteína PARP humana. Lepiniec *et al.* (1995) han aislado y clonado un ADNc de longitud completa de *Arabidopsis thaliana* que codifica una proteína de 72 kDa con alta similitud con el dominio catalítico de la PARP de vertebrado. El dominio del extremo N de la proteína no revela ninguna similitud de secuencia con el dominio correspondiente de la PARP de vertebrado, pero está compuesto de cuatro tramos de aminoácidos (designados A1, A2, B y C) que muestran similitud con el extremo N de varias proteínas nucleares y de unión de ADN. La estructura secundaria predicha de A1 y A2 era una estructura hélice-bucle-hélice.

La base de datos Genbank contiene las secuencias de dos ADNc de *Zea mays* para las cuales la secuencia de aminoácidos de los productos de traducción tiene homología o bien con las proteínas PARP convencionales (AJ222589) o con las proteínas PARP no convencionales, como se identifica en *Arabidopsis* (AJ222588).

La(s) función (funciones) de PARP y la ribosilación poli-ADP en células eucariotas no está(n) totalmente claras. PARP participa o se cree que participa bien directa o indirectamente en varios procesos celulares tales como reparación, replicación y recombinación de ADN, en la división celular y la diferenciación de las células o en las vías de señalización que detectan alteraciones en la integridad del genoma. Dado que la actividad de PARP puede reducir significativamente la agrupación celular de NAD^+ , también se ha sugerido que la enzima puede desempeñar una función crítica en la muerte celular programada (Heller *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Además, se ha sugerido que la nicotinamida resultante de la hidrólisis de NAD^+ o los productos de renovación de poli-ADP-ribosa por poli-ADP-ribosa glucohidrolasa pueden ser señales de respuesta al estrés en los eucariotas.

La información disponible actualmente sobre la función biológica de la PARP en las plantas se ha obtenido de experimentos que implican inhibidores de PARP que sugieren una función *in vivo* en la prevención de la recombinación homóloga en sitios de daño de ADN a medida que aumentan las velocidades de recombinación intracromosómica homóloga en el tabaco después de la aplicación de 3-aminobenzamida (3ABA) (Puchta, *et al.*, 1995). Además, se ha mostrado que la aplicación de inhibidores de PARP, tales como 3ABA, nicotinamida y 6 (5H)-fenastridinona, a las células en diferenciación de *Zinnia* o de *Helianthus tuberosum* previene el desarrollo de elementos traqueales (Hawkins y Phillips, 1983; Phillips y Hawking, 1985; Shoji *et al.*, 1997; Sugiyama *et al.*, 1995), que se considera que es un ejemplo de muerte celular programada en las plantas.

La solicitud PCT WO97/06267 describe el uso de inhibidores de la PARP que mejoran la transformación (cualitativa o cuantitativamente) de células eucariotas, particularmente células de plantas.

Lazebnik *et al.* (1994) identificaron una proteasa con propiedades similares a la enzima convertidora de la interleucina 1- β capaz de escindir PARP, cual es un evento inicial en la apoptosis de células animales.

Kuepper *et al.* (1990) y Molinette *et al.* (1993) han descrito la producción en exceso del dominio de unión de ADN de PARP humana de 46 kDa y diversas formas mutantes del mismo, en células de mono CV-1 transfectadas o fibroblastos humanos y han demostrado la inhibición trans-dominante de la actividad de PARP residente y el consiguiente bloqueo de la reparación del ADN con escisión de bases en estas células.

Ding *et al.* (1992) y Smulson *et al.* (1995) han descrito el agotamiento de PARP por expresión de ARN antisentido en células de mamífero y han observado un retardo en la reunión de las rupturas de cadenas de ADN, e inhibición de la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1.

Ménissier de Murcia *et al.*, (1997) y Wang *et al.* (1995, 1997) han generado ratones transgénicos "silenciados" mutados en el gen PARP, lo que indica que PARP no es una proteína esencial. Las células de los ratones deficientes en PARP son, sin embargo, más sensibles al daño del ADN y se diferencian de las células normales de los animales en algunos aspectos de la muerte celular inducida (Heller *et al.*, 1995).

Sumario y objetos de la invención.

La invención proporciona un método de producción de una planta con resistencia potenciada a condiciones adversas, comprendiendo el método introducir un gen quimérico en la célula de planta o planta por transformación, en el que el gen quimérico comprende las siguientes regiones de ADN operativamente unidas:

- 5 (a) un promotor expresable en plantas; tal como un promotor específico de tejido, un promotor inducible, un promotor sensible a hongos, un promotor sensible a nematodos, un promotor selectivo de anteras, un promotor selectivo de estigmas, un promotor selectivo de la zona de dehiscencia o un promotor constitutivo;
- 10 (b) una región de ADN, que cuando se transcribe da una molécula de ARN, en la que la molécula de ARN cuando está siendo traducida en un péptido o proteína inhibe PARP de clase NAP o ZAP o ambas en células de la planta, en la que la molécula de ARN codifica un mutante de PARP negativo dominante que cuando se expresa en células de la planta reduce la actividad aparente de la proteína PARP codificada por un gen de PARP endógeno, en la que el mutante de PARP negativo dominante comprende o consiste en un dominio de unión de ADN funcional sin un dominio catalítico o sin un dominio catalítico funcional, en la que el mutante de PARP negativo dominante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4 del aminoácido 1 a 159, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6 del aminoácido 1 a 138, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido 1 a 98, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, en la que la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 a 88 está sustituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 98, o en el que el mutante de PARP negativo dominante está mutado en la lisina conservada de posición 850 de SEQ ID No. 2, posición 532 de SEQ ID No. 4 o posición 517 de SEQ ID No. 6; y
- 15 (c) una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación,

en el que la condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico.

25 La actividad de PARP aparente total en células de la planta puede reducirse a aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 90 % de la actividad de PARP aparente normal en las células de la planta. La planta puede seleccionarse del grupo que consiste en maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verduras crucíferas, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavel, rosa, crisantemo y tulipán.

30 La invención proporciona además genes quiméricos para producir una planta con resistencia potenciada a condiciones adversas, en la que la condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico, comprendiendo el gen quimérico las siguientes regiones de ADN operativamente unidas

- a. un promotor expresable en plantas; tal como un promotor específico de tejido, un promotor inducible, un promotor sensible a hongos, un promotor sensible a nematodos, un promotor selectivo de anteras, un promotor selectivo de estigmas, un promotor selectivo de la zona de dehiscencia o un promotor constitutivo;
- 35 b. una región de ADN, que cuando se transcribe da una molécula de ARN, en la que la molécula de ARN cuando está siendo traducida en un péptido o proteína inhibe PARP de clase NAP o ZAP o ambas en células de la planta, en la que la molécula de ARN codifica un mutante de PARP negativo dominante que cuando se expresa en células de la planta reduce la actividad aparente de la proteína PARP codificada por un gen PARP endógeno, en la que el mutante de PARP negativo dominante comprende o consiste en un dominio de unión de ADN funcional sin un dominio catalítico o sin un dominio catalítico funcional, en la que el mutante de PARP negativo dominante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4 del aminoácido 1 a 159, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6 del aminoácido 1 a 138, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido 1 a 98, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, en la que la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 a 88 está sustituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 98, o en la que el mutante de PARP negativo dominante está mutado en la lisina conservada de posición 850 de SEQ ID No. 2, posición 532 de SEQ ID No. 4 o posición 517 de SEQ ID No. 6; y
- 40 c. una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación.
- 45
- 50

55 La invención también proporciona células de plantas con resistencia potenciada a condiciones adversas en la que la condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico, comprendiendo las células de plantas los genes quiméricos anteriormente descritos y plantas con resistencia potenciada a condiciones adversas en la que la condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico que comprende tales células de plantas, además de semillas de las mismas, que comprenden los genes quiméricos anteriormente descritos. La planta puede seleccionarse del grupo que consiste en maíz, colza

oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verduras crucíferas, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavel, rosa, crisantemo y tulipán.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Las secuencias de aminoácidos del extremo N deducidas de poli(ADP-ribosa) polimerasa de planta.

5 (A) Alineamiento de las secuencias en la dirección 5' del dominio de unión de NAD⁺ encontrado en APP de *Arabidopsis thaliana* (*A.th.* APP; número de acceso a EMBL Z48243; SEQ ID No 6) y el homólogo de maíz NAP (*Z.m.* NAP; número de acceso a EMBL AJ2221588; SEQ ID No 4). La división de dominios mostrada es como se ha propuesto previamente (Lepiniec *et al.*, 1995). La señal de localización nuclear (NLS) localizada en el dominio B se indica por el corchete. La secuencia del dominio B no está muy bien conservada entre plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. El dominio C es probablemente comparable en función al dominio de automodificación de la PARP de animales. Las repeticiones imperfectas, A1 y A2 también están presentes en NAP de maíz. Para ilustrar la simetría doble internamente imperfecta dentro de la secuencia de repetición, las propiedades de los restos de aminoácidos se resaltan debajo de las secuencias como sigue: círculos llenos, resto hidrófobo; círculo vacío, glicina; (+), resto positivamente cargado; (-), resto negativamente cargado; o línea ondulada, cualquier resto. El eje de simetría está indicado por la punta de flecha vertical y las líneas con punta de flecha marcan las regiones con la repetición invertida de las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos.

10

15

(B) Alineamiento de los dominios de unión de ADN y autocatalíticos de PARP de ratón y ZAP de maíz. ZAP1 y ZAP2 de maíz que contienen dedos de Zn (ADNc parcial encontrado por el análisis 5'RACE-PCR) se indican como *Z.m.* ZAP (número de acceso a EMBL AJ222589; SEQ ID No 2) y *Z.m.* ZAP (variedad) (SEQ ID No 11 del aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 98), respectivamente, y PARP de ratón, *M.m.* ADPRT (número de acceso a Swissprot P11103). Los dedos de Zn y la NLS bipartita de la enzima de ratón se indican por corchetes, el sitio de escisión de la caspasa 3 por el asterisco, y la NLS supuesta en la proteína ZAP por el corchete en negrita debajo de la secuencia de maíz. Los restos de aminoácidos que están conservados en todas las secuencias están recuadrados; los restos de aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares están sombreados con la secuencia superior como referencia.

20

25

Figura 2. Comparación del dominio de unión de NAD⁺ de las proteínas PARP de ratón y PARP de planta. El intervalo de la "firma PARP" se indica sobre las secuencias. Los nombres y el alineamiento de las secuencias son como en la Figura 1.

30

Figura 3. Estimación del número de copias del gen y tamaño del transcrito para los genes *nap* y *zap*.

(A) y (B) ADN genómico de maíz de la variedad LG2080 digerido con las endonucleasas de restricción indicadas, resuelto por electroforesis en gel de agarosa, transferido e hibridado con sondas de ADN marcadas radiactivamente preparadas a partir de los dominios 5' del ADNc de *nap* y *zap*, que no codifican el dominio de unión de NAD⁺. El patrón de hibridación obtenido con la sonda *nap* (A) es simple e indica un solo gen *nap* en el genoma del maíz. Como puede apreciarse del patrón de hibridación (B), deberían existir al menos dos genes *zap*. Para determinar el tamaño de los transcritos codificados por los genes *zap* y *nap*, se resolvió aproximadamente 1 µg de ARN poli (A)⁺ extraído de raíces (carril 1) y brotes (carril 2) de plantas de semillero de 6 días de edad, en un gel de agarosa después de la desnaturalización con glioxal, se transfirió y se hibridó con ADNc de *nap* (C) y *zap* (D) marcado con ³²P. Se utilizaron fragmentos de λADN *Bst*EII marcados en el extremo 5' con ³³P como marcadores de peso molecular en ambos experimentos de transferencia en gel de ADN y ARN; sus posiciones se indican en kb a la izquierda de cada panel.

35

40

Figura 4. Análisis de la expresión de APP en levadura.

(A) Dibujo esquemático del casete de expresión en pV8SPA. La expresión del ADNc de *app* viene dada por un promotor de levadura quimérico, que consiste en la región promotora mínima que contiene al caja TATA del gen *cyc1* (CYC1) y una región promotora de activación en la dirección 5' del gen *gal10* (GAL10), proporcionando el último activación del promotor por galactosa. Las secuencias reguladoras en la dirección 3' se derivan del gen que codifica la fosfoglicerol cinasa (3PGK) (Kuge y Jones, 1994). La región codificante de *app* está dibujada con una división en dominios supuestos como se ha propuesto anteriormente (Lepiniec *et al.*, 1995): A1 y A2 corresponden con repeticiones imperfectas de 27 aminoácidos, entre los cuales existe una secuencia (dominio B) rica en aminoácidos positivamente cargados y que se asemeja a los dominios de unión de ADN de varias proteínas de unión de ADN. La secuencia de aminoácidos del dominio B se muestra debajo del mapa, y el tramo de restos de arginina y lisina, que pueden funcionar como una NLS, está dibujado en negrita. Los restos metionina (M¹, M⁷²), que pueden funcionar como codones de iniciación de la traducción, se indican encima del mapa. El dominio C es rico en restos de ácido glutámico, asemejándose en su composición, pero no en su secuencia, al dominio de automodificación de PARP de los animales.

45

50

55

(B) Análisis por inmunotransferencia (transferencia Western) y transferencia Northern de las cepas DY (pYeDP1/8-2) y DY (pV8SPA), indicadas como (vector) y (app), respectivamente. Las cepas se cultivaron en medio SDC complementado con glucosa (GLU), galactosa (GAL), galactosa y 3 mM de 3ABA (GAL+3ABA), o galactosa y nicotinamida 5 mM (GAL+NIC). El ARN total o la proteína total se extrajeron de los mismos cultivos. Se fraccionaron diez microgramos de proteína total por electroforesis en SDS-PAGE al 10 %, se sometieron a electrotransferencia y se sondaron con antisueros anti-APP. Se resolvieron cinco microgramos de ARN total por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, se transfirieron a membranas de nailon y se hibridaron con fragmentos de ADN marcados con ³²P derivados del ADNc de app. Las posiciones de las bandas de marcador de peso molecular se indican a la izquierda en kilobases (kb) y kilodaltons (kDa).

Figura 5. Actividad de poli(ADP-ribosa) polimerasa de la proteína APP.

(A) Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de DY (pYeDP1/8-2) cultivado en SDC con 2 % de galactosa (vector GAL) y DY (pV8SPA) cultivado en SDC con 2 % de glucosa (app GLU), en SDC con 2 % de galactosa (app GAL), o en SDC con 2 % de galactosa y 3ABA 3 mM (app GAL+3ABA). Para detectar la síntesis de la poli(ADP-ribosa) en estos extractos, se incubaron muestras con ³²P-NAD⁺ durante 40 min a la temperatura ambiente. Se realizaron dos reacciones de control: se incubaron 100 ng de la PARP humana purificada tanto en un tampón de reacción solo (PARP) (carril 5), como con extracto de proteína producido a partir de cultivo DY (pYeDP1/8-2) cultivado en glucosa (vector GLU+PARP) (carril 6). Se muestra la autorradiografía obtenida después de la exposición del gel secado a película Kodak X-Omat. ORI corresponde con el comienzo del gel de secuenciación.

(B) Estimulación de la síntesis de poli(ADP-ribosa) por ADN en extractos de proteínas de DY (pV8SPA). Se indican las cantidades de ADN de esperma de salmón sonicado añadidas a los extractos de levadura empobrecidos en ácido nucleico en $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. La síntesis de la poli(ADP-ribosa) se bloquea por 3ABA, que se añadió en una de las reacciones a una concentración de 3 mM (carril 5). Para garantizar la máxima recuperación de la poli(ADP-ribosa), se incluyeron 20 μg de glucógeno como vehículo durante las etapas de precipitación; esto, como puede apreciarse, sin embargo, produjo un alto arrastre de la marca no incorporada.

Figura 6. Representación esquemática de los vectores de T-ADN que comprenden los genes quiméricos moduladores de la PCD de la invención. P35S: promotor CaMV35S; L: conductor Cab 22; ZAP: región codificante de un gen PARP de la clase ZAP; 5'ZAP: parte del extremo N de la región codificante de un gen PARP de la clase ZAP en orientación invertida; 3' 35S: señal de terminación de la transcripción del extremo 3' de CaMV35S y señal de poliadenilación; pACT2: región promotora del gen actina; pNOS: promotor del gen nopalina sintasa; gal: gentamicina acetil transferasa; bar: fosfinotricina acetil transferasa; 3'NOS: señal de terminación de la transcripción del extremo 3' y señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa; APP: región codificante de un gen PARP de la clase NAP; 5'APP: parte del extremo N de la región codificante de un gen PARP de la clase NAP en orientación invertida; LB: borde izquierdo del T-ADN; RB: borde derecho del T-ADN; pTA29: promotor específico de tapete; pNTP303: promotor específico de polen.

Descripción detallada

Con el fin de la invención, el término "promotor expresable en plantas" significa un promotor que es capaz de dirigir la transcripción en una célula de planta. Esto incluye cualquier promotor de origen de planta, pero también cualquier promotor de origen no de planta que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula de planta, por ejemplo, ciertos promotores de origen viral o bacteriano tales como los promotores del gen CAMV35S o T-ADN.

El término "expresión de un gen" se refiere al proceso en el que una región de ADN bajo el control de regiones reguladoras, particularmente el promotor, se transcribe en un ARN que es biológicamente activo, es decir, que o bien es capaz de interacción con otro ácido nucleico o proteína o que es capaz de ser traducido en un polipéptido o proteína biológicamente activo. Se dice que un gen codifica un ARN cuando el producto final de la expresión del gen es ARN biológicamente activo, tal como, por ejemplo, un ARN antisentido o una ribozima. Se dice que un gen codifica una proteína cuando el producto final de la expresión del gen es una proteína o polipéptido biológicamente activo.

El término "gen" significa cualquier fragmento de ADN que comprende una región de ADN (la "región de ADN transcrita") que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula bajo el control de regiones reguladoras adecuadas, por ejemplo, un promotor expresable en plantas. Un gen puede comprender así varios fragmentos de ADN operativamente unidos tales como un promotor, una secuencia conductora 5', una región codificante y una región 3' que comprende un sitio de poliadenilación. Un gen de planta endógeno es un gen que se encuentra naturalmente en una especie de planta. Un gen quimérico es cualquier gen que no se encuentra normalmente en una especie de planta o, alternativamente, cualquier gen en el que el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o la totalidad de la región de ADN transcrita o con al menos otra región reguladora del gen.

Como se usa en el presente documento, "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes establecidos a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Así, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados realmente, es decir, puede estar incorporado en un ácido nucleico o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una región de ADN que se define funcional o estructuralmente puede comprender regiones de ADN adicionales, etc.

La invención se basa, por una parte, en el hallazgo que las células eucariotas, particularmente células de plantas, muy particularmente células de *Zea mays*, contienen simultáneamente al menos dos isoformas (clases) funcionales de proteínas PARP principales que difieren en tamaño y secuencia de aminoácidos, pero que son capaces ambas de unir ADN, particularmente ADN con roturas de una sola cadena, y tienen ambas actividad de ribosilación de poli-ADP. Por otra parte, los inventores han comprobado que la muerte celular programada en eucariotas, particularmente en plantas, puede modularse alterando el nivel de expresión de los genes PARP o alterando la actividad de las proteínas codificadas genéticamente, y que con fin de lograr este objetivo, la expresión de ambos genes necesita estar alterada o, como alternativa, ambas clases de proteínas necesitan estar alteradas en su actividad.

Es evidente que el fallo de la técnica en mostrar que las células eucariotas, particularmente células de plantas, comprenden dos isoformas funcionales de proteínas PARP, codificadas por clases de genes diferentes, ha impedido la modulación eficiente de la actividad de PARP en aquellas células por métodos de ADN recombinante. Diversas realizaciones de los métodos y medios se representan por la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

Se describen métodos para la inhibición de la muerte celular programada o apoptosis en células de plantas, alterando el nivel de expresión de genes PARP, o alterando la actividad o actividad aparente de proteínas PARP en esa célula. Convenientemente, el nivel de expresión de los genes PARP o la actividad de las proteínas PARP está controlado genéticamente por la introducción de genes quiméricos moduladores de la PCD que alteran la expresión de los genes PARP y/o por la introducción de genes quiméricos moduladores de la PCD que alteran la actividad aparente de las proteínas PARP y/o por la alteración de los genes codificantes de PARP endógenos.

Como se usa en el presente documento, "PCD potenciada" con respecto a células especificadas, se refiere a la muerte de aquellas células, provocada por los métodos de la invención, por los cuales las células muertas no estuvieron destinadas a sufrir PCD cuando se compararon con células similares de una planta normal no modificada por los métodos de la invención, bajo condiciones similares.

"PCD inhibida" con respecto a células especificadas debe entenderse como el proceso por el cual una fracción mayor de aquellas células o grupos de células, que normalmente podrían sufrir muerte celular programada (sin la intervención de los métodos de esta invención) en condiciones particulares, se mantienen vivas en aquellas condiciones.

La expresión de los genes quiméricos moduladores de la PCD introducidos o de los genes endógenos modificados influirá así en el nivel funcional de la proteína PARP, e interferirá indirectamente con la muerte celular programada. Una disminución moderada en el nivel funcional de las proteínas PARP conduce a una inhibición de la muerte celular programada, particularmente para la prevención de la muerte celular programada, mientras que una disminución grave en el nivel funcional de las proteínas PARP conduce a la inducción de la muerte celular programada.

Con el fin de inhibir o prevenir la muerte celular programada en una célula eucariota, particularmente en una célula de planta, el nivel combinado de ambas proteínas PARP y/o su actividad o actividad aparente se reduce significativamente, evitando sin embargo que la reparación del ADN (dirigida directa o indirectamente por PARP) se inhiba de tal manera que las células en las cuales la función de las proteínas PARP se inhibe no puedan recuperarse del daño del ADN, o no puedan mantener su integridad genómica. Preferentemente, el nivel y/o la actividad de las proteínas PARP en las células diana deberían reducirse aproximadamente el 75 %, preferentemente aproximadamente el 80 %, particularmente aproximadamente el 90 % del nivel y/o actividad normales en las células diana de tal modo que aproximadamente el 25 %, preferentemente aproximadamente el 20 %, particularmente aproximadamente el 10 % del nivel y/o actividad normales de PARP se retenga en las células diana. Adicionalmente, se cree que la disminución en el nivel y/o actividad de las proteínas PARP no debería exceder del 95 %, no debiendo exceder preferentemente el 90 % de la actividad y/o nivel normales en las células diana. Los métodos de determinación del contenido de una proteína específica tal como las proteínas PARP son muy conocidos para el experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, cuantificación (histoquímica) de tales proteínas usando anticuerpos específicos. Los métodos de cuantificación de la actividad de PARP también están disponibles en la técnica e incluyen el ensayo TUNEL anteriormente mencionado (*in vivo*) o el ensayo *in vitro* descrito por Collinge y Althaus (1994) para la síntesis de poli(ADP-ribosa) (véase Ejemplos).

Con el fin de la invención, las proteínas PARP se definen como proteínas que tienen actividad de poli(ADP-ribosa) polimerasa, comprendiendo preferentemente la denominada "firma PARP". La firma PARP es una secuencia de aminoácidos que está altamente conservada entre las proteínas PARP, definida por de Murcia y Menussier de Murcia (1994) como la extensión del aminoácido de la posición 858 al aminoácido de la posición 906 de la proteína

PARP de *Mus musculus*. Este dominio corresponde con la secuencia de aminoácidos de la posición 817 a 865 de la proteína PARP convencional de *Zea mays* (ZAP1; SEQ ID No 2) o con la secuencia de aminoácidos de la posición 827 a 875 de la proteína PARP convencional de *Zea mays* (ZAP2; SEQ ID No: 11) o con la secuencia de aminoácidos de la posición 500 a 547 de la proteína PARP no convencional de *Zea mays* (SEQ ID No 4) o con la secuencia de aminoácidos de la posición 485 a 532 de la proteína PARP no convencional de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID No 6). Esta secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las diferentes proteínas PARP (teniendo aproximadamente del 90 % al 100 % de identidad de secuencia). Está particularmente conservada lisina en la posición 891 (correspondiente a posición 850 de SEQ ID No 2, la posición 861 de SEQ ID No 11, la posición 532 de SEQ ID No 4 y la posición 517 de SEQ ID No 6) de la proteína PARP de *Mus musculus*, que se considera que está implicada en la actividad catalítica de las proteínas PARP. Particularmente, los aminoácidos en las posiciones 865, 866, 893, 898 y 899 de la proteína PARP de *Mus musculus* o las posiciones correspondientes para las otras secuencias son variables. Las proteínas PARP pueden comprender además un dominio de unión de ADN del extremo N y/o una señal de localización nuclear (NLS).

Actualmente, se han descrito dos clases de proteínas PARP. La primera clase, como se define en el presente documento, comprende las denominadas proteínas PARP clásicas que contienen dedos de Zn (ZAP). Estas proteínas oscilan en tamaño de 113-120 kDa y se caracterizan además por la presencia de al menos uno, preferentemente dos dominios de dedos de Zn localizados en el dominio del extremo N de la proteína, particularmente localizados dentro de los aproximadamente 355 a aproximadamente 375 primeros aminoácidos de la proteína. Los dedos de Zn se definen como secuencias peptídicas que tienen la secuencia CxxC_nHxxC (donde n puede variar de 26 a 30) capaz de complejar un átomo de Zn. Ejemplos de secuencias de aminoácidos para proteínas PARP de la clase ZAP incluyen las secuencias que pueden encontrarse en la base de datos de proteínas PIR con número de acceso P18493 (*Bos taurus*), P26466 (*Gallus gallus*), P35875 (*Drosophila melanogaster*), P09874 (*Homo sapiens*), P11103 (*Mus musculus*), Q08824 (*Oncorhynchus masou*), P27008 (*Rattus norvegicus*), Q11208 (*Sarcophaga peregrina*), P31669 (*Xenopus laevis*), y las secuencias actualmente identificadas de la proteína ZAP1 y ZAP2 de *Zea mays* (SEQ ID No 2 / SEQ ID No 11).

La secuencia de nucleótidos de los ADNc correspondientes puede encontrarse en la base de datos EMBL con los números de acceso D90073 (*Bos taurus*), X52690 (*Gallus gallus*), D13806 (*Drosophila melanogaster*), M32721 (*Homo sapiens*), X14406 (*Mus musculus*), D13809 (*Oncorhynchus masou*), X65496 (*Rattus norvegicus*), D16482 (*Sarcophaga peregrina*), D14667 (*Xenopus laevis*), y en SEQ ID No 1 y 10 (*Zea mays*).

La segunda clase que se define en el presente documento comprende las denominadas proteínas PARP no clásicas (NAP). Estas proteínas son más pequeñas (72-73 kDa) y se caracterizan además por la ausencia de un dominio de dedo de Zn en el extremo N de la proteína, y por la presencia de un dominio del extremo N que comprende tramos de aminoácidos que tienen similitud con proteínas de unión de ADN. Preferentemente, las proteínas PARP de esta clase comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 30 a 32 aminoácidos que comprenden la secuencia R G x x x x G x K x x x x R L (los aminoácidos se representan en el código estándar de una sola letra, donde x representa cualquier aminoácido; SEQ ID No 7). Incluso más preferentemente, estas proteínas PARP comprenden al menos 1 secuencia de aminoácidos de aproximadamente 32 aminoácidos que tienen la secuencia x L x V x x x R x x L x x R G L x x x G V K x x L V x R L x x A I (SEQ ID No 8) (el denominado dominio A1) o al menos 1 secuencia de aminoácidos de aproximadamente 32 aminoácidos que tienen la secuencia G M x x x E L x x x A x x R G x x x x G x K K D x x R L x x (SEQ ID No 9) (el denominado dominio A2), o ambas. Particularmente, los dominios A1 y A2 son capaces de formar una estructura hélice-bucle-hélice. Estas proteínas PARP pueden comprender además un dominio básico "B" (secuencia de aminoácidos rica en K/R de aproximadamente 35 a aproximadamente 56 aminoácidos, implicada en el direccionamiento de la proteína al núcleo) y/o un dominio ácido "C" (secuencia de aminoácidos rica en D/E de aproximadamente 36 aminoácidos). Ejemplos de secuencias de proteínas de la clase NAP incluyen la proteína APP de *Arabidopsis thaliana* (accesible de la base de datos de proteínas PIR con el número de acceso Q11207; SEQ ID No 6) y la proteína NAP de *Zea mays* (SEQ ID No 4). La secuencia de los ADNc correspondientes puede encontrarse en la base de datos EMBL con el número de acceso Z48243 (SEQ ID No 5) y en SEQ ID No 3. Que la segunda clase de proteínas PARP son realmente proteínas PARP funcionales, es decir, son capaces de catalizar la polimerización de poli(ADP-ribosa) dependiente de ADN ha sido demostrado por los inventores (véase el Ejemplo 2).

Los inventores han demostrado además que las células eucariotas, particularmente células de plantas, expresan simultáneamente genes que codifican proteínas PARP de ambas clases.

Otros genes o ADNc que codifican proteínas PARP de ambas clases como se han definido, o partes de las mismas, pueden aislarse a partir de otras especies o variedades eucariotas, particularmente de otras especies o variedades de plantas. Estos genes de PARP o ADNc pueden aislarse, por ejemplo, por hibridación Southern (bien hibridación de baja rigurosidad o bien de alta rigurosidad, dependiendo de la relación entre las especies a partir de las cuales se intenta aislar el gen PARP y la especie de la que se derivó por último lugar la sonda) usando como sondas fragmentos de ADN con la secuencia de nucleótidos de los genes PARP o ADNc anteriormente mencionados, o partes de los mismos, preferentemente partes que están conservadas tales como un fragmento de gen que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la firma PARP arriba mencionada. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a la firma PARP de las proteínas PARP codificadas por genes de plantas son la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 del nucleótido 2558 a 2704 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 3

del nucleótido 1595 a 1747, o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 del nucleótido 1575 a 1724. Si debe hacerse una discriminación entre las clases de genes PARP, deberían usarse preferentemente partes de los genes PARP que son específicas para la clase, tales como los dominios del extremo N que preceden al dominio catalítico o partes de los mismos.

- 5 Los genes o ADNc que codifican proteínas PARP o partes de las mismas también pueden aislarse por amplificación por PCR usando cebadores apropiados tales como los cebadores degenerados con la secuencia de nucleótidos correspondiente a las secuencias indicadas en SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, o cebadores con la secuencia de nucleótidos correspondiente a las secuencias indicadas en SEQ ID No 15 a 20. Sin embargo, es evidente que el experto en la materia puede diseñar oligonucleótidos alternativos para uso en PCR o puede usar oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 20, preferentemente al menos aproximadamente 30, particularmente al menos aproximadamente 50, nucleótidos consecutivos de cualquiera de los genes PARP para aislar los genes o parte de los mismos por amplificación por PCR.

- 10 Es evidente que puede usarse una combinación de estas técnicas, u otras técnicas (incluyendo, por ejemplo, RACE-PCR) disponibles para el experto para aislar genes o ADNc basándose en fragmentos parciales y su secuencia de nucleótidos, por ejemplo, obtenida por amplificación PCR, para aislar genes PARP, o partes de los mismos.

15 Además, también se describen genes PARP, que codifican proteínas PARP en las que algunos de los aminoácidos han sido intercambiados por otros aminoácidos químicamente similares (denominadas sustituciones conservativas), o genes PARP sintéticos (que codifican proteínas similares como los genes PARP naturales pero con una secuencia de nucleótidos diferente, basado en la degeneración del código genético) y partes de los mismos.

- 20 La PCD en células de plantas puede inhibirse por una disminución moderada en el nivel funcional de PARP en aquellas células.

- Con el fin de la presente invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos relacionadas, expresada como porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos (x100) dividido entre el número de posiciones comparadas. Un hueco, es decir, una posición en un alineamiento donde está presente un resto en una secuencia pero no en la otra, se considera una posición con restos no idénticos. El alineamiento de las dos secuencias se realiza por el algoritmo de Wilbur y Upmann (Wilbur y Lipmann, 1983) usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos o aminoácidos, una longitud de palabra de 2 aminoácidos y una penalidad por hueco de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencias, que incluyen el alineamiento de secuencias como se ha descrito arriba, pueden realizarse convenientemente usando paquetes de software comercialmente disponibles, tales como los programas del paquete Intelligenetics™ (Intelligenetics Inc., CA).

- 25 Los genes quiméricos moduladores de la PCD pueden disminuir el nivel funcional de la actividad endógena de PARP reduciendo el nivel de actividad aparente de las PARP endógenas de ambas clases. Para este fin, la región de ADN transcrita codifica un ARN biológicamente activo que se traduce en una proteína o péptido que inhibe las proteínas PARP de las clases NAP o ZAP o ambas, tales como anticuerpos inactivantes o mutantes de PARP negativos dominantes.

"Anticuerpos inactivantes de proteínas PARP" son anticuerpos o partes de los mismos que se unen específicamente al menos a algunos epítopes de las proteínas PARP, tales como el epítipo que cubre parte del dedo de Zn II de la posición 111-118 en ZAP1 o un péptido correspondiente en ZAP2, y que inhiben la actividad de la proteína diana.

- 40 "Mutantes de PARP negativos dominantes", como se usa en el presente documento, son proteínas o péptidos que comprenden al menos parte de una proteína PARP (o una variante de la misma), preferentemente una proteína PARP endógena para la célula hospedadora diana eucariota, que no tienen actividad de PARP, y que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las proteínas PARP endógenas cuando se expresan esa la célula hospedadora. Mutantes de PARP negativos dominantes preferidos son proteínas que comprenden o que consisten en un dominio de unión de ADN funcional (o una variante del mismo) sin un dominio catalítico (tal como el dominio del extremo N que contiene dedos de Zn de aproximadamente 355 a aproximadamente 375 aminoácidos de una PARP de la clase ZAP, particularmente un dominio de proteína de unión de ADN que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 2 del aminoácido 1 a 370 o un dominio de proteínas de unión de ADN que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 11 del aminoácido 1 a 98, o un dominio de proteínas de unión de ADN que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 2 del aminoácido 1 a 370, en la que la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 a 88 está sustituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 11, del aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 98, o tal como el dominio de proteínas de unión de ADN del extremo N de aproximadamente 135 a 160 aminoácidos de una PARP de la clase NAP, particularmente un dominio de proteínas de unión de ADN que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 4 del aminoácido 1 a 159 o un dominio de proteínas de unión de ADN que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 6 del aminoácido 1 a 138) o sin un dominio catalítico funcional (tal como mutantes PARP inactivos, mutados en la denominada firma PARP, particularmente mutados en la lisina conservada de la posición 850 de SEQ ID No 2, la posición 532 de SEQ ID No 4, la posición 517 de SEQ ID No 6). Preferentemente, los mutantes PARP negativos

dominantes deberían retener su actividad de unión de ADN. Los mutantes de PARP negativos dominantes pueden fusionarse a una proteína transportadora, tal como una β -glucuronidasa (SEQ ID No 12).

5 Nuevamente, pueden usarse uno o más genes moduladores de la PCD que codifican uno o más mutantes de PARP negativos dominantes para lograr los objetivos del primer aspecto de la invención. Cuando se usa un gen quimérico modulador de la PCD, este gen debe ser capaz de reducir simultáneamente la expresión de genes PARP de ambas clases.

10 El nivel funcional de PARP en células eucariotas, particularmente en células de plantas, se reduce por modificación de la secuencia de nucleótidos de los genes PARP endógenos en aquellas células de tal manera que las proteínas PARP mutantes codificadas retengan aproximadamente el 10 % de su actividad. Los métodos para lograr una modificación tal de genes endógenos PARP incluyen recombinación homóloga para intercambiar los genes PARP endógenos por genes PARP mutantes, por ejemplo, por los métodos descritos en la patente de EE.UU. 5.527.695. En una realización preferida, tal modificación dirigida a sitio de la secuencia de nucleótidos de los genes PARP endógenos se logra por la introducción de oligonucleótidos de ADN/ARN quiméricos como se describe en el documento WO 96/22364 o en la patente de EE.UU. 5.565.350.

15 Para células de plantas, se ha encontrado, sin embargo, que la introducción de un solo gen quimérico modulador de la PCD, que codifique preferentemente ARN biológicamente activo en reducir la expresión de una sola clase de genes PARP, particularmente de genes PARP de la clase ZAP, puede ser suficiente para la reducción de la actividad total de PARP en aquellas células de plantas. para inhibir o prevenir la muerte celular programada en aquellas células de plantas.

20 Se espera que la introducción de un solo gen quimérico modulador de la PCD, que puede reducir el nivel funcional o aparente de una sola clase de proteínas PARP, particularmente una proteína PARP de la clase ZAP, como se describe en el presente documento, pueda asimismo ser suficiente para la reducción de la actividad total de PARP en las células de plantas.

25 La muerte celular programada reducida o inhibida en células de plantas que comprenden al menos un solo gen quimérico modulador de la PCD puede producir resistencia potenciada a condiciones adversas, tales como resistencia al estrés impuesto mediante tratamiento con productos químicos, resistencia al estrés por frío, resistencia al estrés impuesto por patógenos y plagas, resistencia a la sequía, resistencia al estrés por calor, etc.

30 Si la introducción de genes quiméricos moduladores de la PCD en células de plantas producirá o no por último lugar un nivel funcional moderadamente reducido o gravemente reducido de PARP combinada en aquellas células - es decir, PCD inhibida o PCD potenciada - se determinará normalmente por el nivel de expresión (bien al nivel de la transcripción o bien al nivel combinado transcripción/traducción) de aquellos genes moduladores de la PCD. Un factor principal contribuyente al nivel de expresión del gen modulador de la PCD es la elección de la región promotora, aunque otros factores (tales como, pero no se limitan a, la elección del extremo 3', la presencia de intrones, el uso de codones de la región transcrita, la estabilidad del ARNm, la presencia de secuencias consenso alrededor del sitio de iniciación de la traducción, la elección de regiones de ARN 5' y 3' no traducidas, la presencia de secuencias PEST, la influencia de la estructura de la cromatina que rodea el sitio de inserción de un gen modulador de la PCD estable integrado, el número de copias de los genes moduladores de la PCD introducidos, etc.) o combinaciones de los mismos también contribuirán al nivel de expresión último del gen modulador de la PCD. En general, puede asumirse que la reducción moderada de los niveles funcionales de PARP combinada puede lograrse por genes moduladores de la PCD que comprenden un promotor relativamente débil, mientras que la grave reducción de los niveles funcionales de PARP combinada puede conseguirse por genes moduladores de la PCD que comprenden un promotor relativamente fuerte. Sin embargo, el nivel de expresión de un gen modulador de la PCD que comprende un promotor específico y eventualmente su efecto en la PCD, pueden variar en función de los otros factores contribuyentes, como ya se ha mencionado.

45 Los genes quiméricos moduladores de la PCD pueden comprender un promotor constitutivo, o un promotor que se expresa en la totalidad o la mayoría de los tipos de células en todo el organismo, particularmente en toda la planta, tales como las regiones promotoras derivadas de los genes T-ADN, en particular los genes opina sintasa de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium* (por ejemplo, los promotores nos, ocs), o las regiones promotoras de genes virales (tales como los promotores CaMV35S, o variantes de los mismos).

50 Puede ser además ventajoso controlar la expresión del gen modulador de la PCD a voluntad o en respuesta a estímulos ambientales, por ejemplo por inclusión de un promotor inducible que puede ser activado por un estímulo externo, tal como, pero no se limita a, la aplicación de compuestos químicos (por ejemplo, fitoprotectores, herbicidas, glucocorticoides), condiciones de luz, exposición a estrés abiótico (por ejemplo, lesiones, metales pesados, temperaturas extremas, salinidad o sequía) o estrés biótico (por ejemplo, infección por patógenos o plagas que incluye infección por hongos, virus, bacterias, insectos, nematodos, micoplasmas y organismos semejantes a micoplasmas, etc.). Ejemplos de promotores inducibles expresables en plantas adecuados para la invención son: promotores inducibles por nematodos (tal como se desvelan en el documento WO 92/21757), promotores inducibles por hongos (documentos WO 93/19188, WO 96/28561), promotores inducibles después de aplicación de

glucocorticoides tales como dexametasona (), o promotores reprimidos o activados después de la aplicación de tetraciclina (Gatz *et al.* 1988; Weimann *et al.*, 1994).

Puede ser conveniente o necesario restringir el efecto sobre la muerte celular programada a un subconjunto particular de las células del organismo, particularmente de la planta, por lo que los genes moduladores de la PCD pueden incluir promotores específicos de tejido o específicos del tipo de célula. Ejemplos de promotores expresables en plantas adecuados expresados selectivamente en tejidos particulares o tipos de células particulares son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, promotores específicos de semillas (por ejemplo, documento WO 89/03887), promotores específicos de primordios de órganos (An *et al.*, 1996), promotores específicos del tallo (Keister *et al.*, 1988), promotores específicos de las hojas (Hudspeth *et al.*, 1989), promotores específicos de mesófilos (tales como los promotores de Rubisco fotoinducibles), promotores específicos de la raíz (Keller *et al.*, 1989), promotores específicos de tubérculos (Keil *et al.*, 1989), promotores específicos de tejido vascular (Peleman *et al.*, 1989), promotores específicos de meristemos (tales como el promotor del gen *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, Long *et al.*, 1996), promotores específicos de primordios (tales como el promotor del gen *Antirrhinum CycD3A*, Doonan *et al.*, 1998), promotores específicos de las anteras (documentos WO 89/10396, WO 9213956, WO 9213957), promotores específicos de los estigmas (documento WO 91/02068), promotores específicos de la zona de dehiscencia (documento WO 97/13865), promotores específicos de semillas (documento WO 89/03887), etc.

Preferentemente, los genes quiméricos moduladores de la PCD están acompañados por un gen marcador, preferentemente un gen marcador quimérico que comprende un ADN de marcador que está operativamente unido en su extremo 5' a un promotor expresable en plantas, preferentemente un promotor constitutivo, tal como el promotor 35S de CaMV, o un promotor fotoinducible tal como el promotor del gen que codifica la subunidad pequeña de Rubisco; y operativamente unido en su extremo 3' a señales adecuadas de formación del extremo 3' de la transcripción en plantas y poliadenilación. Se espera que la elección del ADN de marcador no sea crítica, y pueda usarse cualquier ADN de marcador adecuado. Por ejemplo, un ADN de marcador puede codificar la proteína que proporciona un "color" distinguible a la célula de planta transformada, tal como el gen A1 (Meyer *et al.*, 1987) o la proteína verde fluorescente (Sheen *et al.*, 1995), puede proporcionar resistencia a los herbicidas a la célula de planta transformada, tal como el gen *bar*, que codifica resistencia a la fosfinotricina (documento EP 0.242.246), o puede proporcionar resistencia a los antibióticos a las células transformadas, tales como el gen *aac (6')*, que codifica resistencia a la gentamicina (documento WO 94/01560).

Métodos de introducción de genes quiméricos moduladores de la PCD en células de plantas, particularmente métodos de transformación de células de plantas, son muy conocidos en la técnica, y se cree que no son críticos para los métodos de la invención. La transformación produce tanto células transitorias como establemente transformadas (por lo que los genes quiméricos moduladores de la PCD se insertan establemente en el genoma de la célula, particularmente en el genoma nuclear de la célula).

Es evidente que los métodos y medios descritos en el presente documento para alterar la muerte celular programada en células de plantas y plantas tienen varias posibilidades de aplicación importantes. La inhibición de la PCD por los métodos y medios de la invención puede usarse para aliviar el estrés impuesto sobre las células, particularmente las células de plantas, durante la transformación y así aumentar la eficiencia de transformación, como se describe en el documento WO 97/06267. La inhibición de la PCD también puede usarse para mejorar el cultivo celular de células eucariotas, particularmente de células de plantas.

Inesperadamente, se ha encontrado que después de la introducción de un gen quimérico modulador de la PCD que modula la expresión de un gen PARP de la clase ZAP, particularmente un gen quimérico modulador de la expresión de un gen PARP de la clase ZAP en el que la región transcrita codifica un ARN biológicamente activo que comprende simultáneamente un ARN sentido y antisentido como se describe en el presente documento, las células de plantas transformadas, callos de plantas y plantas presentaron un crecimiento potenciado.

Aunque no se pretende limitar la invención a un modo de acción particular, se cree que el crecimiento potenciado es una consecuencia del número reducido de células que sufren muerte celular programada, probablemente aumentando el umbral para una señal que inhibe la división celular, conduciendo así a plantas que crecen más vigorosamente. Estas plantas son también más resistentes al estrés como se explica en cualquier parte en la presente solicitud.

Aunque es evidente que la invención puede aplicarse esencialmente a todas las especies y variedades de plantas, la invención será especialmente adecuada para alterar la muerte celular programada en plantas con un valor comercial. Plantas particularmente preferidas a las cuales puede aplicarse la invención son maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, céspedes, alfalfa, leguminosas, una verdura crucífera, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, y plantas ornamentales tales como clavel, cristantero, rosas, tulipanes y análogas.

La planta transformada obtenida puede usarse en un esquema de cultivo convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico controlador de la división celular de la invención en otras variedades de la misma especie o especies de plantas relacionadas. Las semillas obtenidas a

partir de las plantas transformadas contienen el gen modulador de la PCD de la invención como una inserción genómica estable.

5 Los siguientes ejemplos describen la construcción de genes quiméricos controladores de la apoptosis y el uso de tales genes para la modulación de la muerte celular programada en células y organismos eucariotas. A menos que se establezca de otro modo en los ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos convencionales como se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE.UU. Materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Cloy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd. (RU) y Blackwell Scientific Publications, RU.

10 En toda la descripción y los ejemplos se hace referencia a las siguientes secuencias:

- SEQ ID No 1: Secuencia de ADN del gen ZAP de *Zea mays* (*zap1*)
- SEQ ID No 2: Secuencia de proteína de la proteína ZAP de *Zea mays* (ZAP1)
- SEQ ID No 3: Secuencia de ADN del gen NAP de *Zea mays* (*nap*)
- 15 SEQ ID No 4: Secuencia de proteína de la proteína NAP de *Zea mays* (NAP)
- SEQ ID No 5: Secuencia de ADN del gen NAP de *Arabidopsis thaliana* (*app*)
- SEQ ID No 6: Secuencia de proteína de la proteína NAP de *Arabidopsis thaliana* (APP)
- SEQ ID No 7: Secuencia consenso para el dominio A de proteínas PARP no convencionales
- SEQ ID No 8: Secuencia consenso para el dominio A1 de proteínas PARP no convencionales
- 20 SEQ ID No 9: Secuencia consenso para el dominio A2 de proteínas PARP no convencionales
- SEQ ID No 10: Secuencia de ADN del segundo gen ZAP de *Zea mays* (*Zap2*)
- SEQ ID No 11: Secuencia de proteína de la proteína ZAP de *Zea mays* (ZAP2)
- SEQ ID No 12: Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión entre el dominio de unión de ADN de APP y la proteína GUS
- 25 SEQ ID No 13: Cebador de PCR degenerado
- SEQ ID No 14: Cebador de PCR degenerado
- SEQ ID No 15: Cebador de PCR
- SEQ ID No 16: Cebador de PCR
- SEQ ID No 17: Cebador de PCR
- 30 SEQ ID No 18: Cebador de PCR
- SEQ ID No 19: Cebador de PCR
- SEQ ID No 20: Cebador de PCR
- SEQ ID No 21: Fusión de traducción de promotor de *app-gus*

Texto libre del listado de secuencias

- 35 El siguiente texto libre se ha usado en la parte del Listado de secuencias de la presente solicitud
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Dominio A de proteínas PARP no convencionales
 - <223> Descripción de Secuencia Artificial: Dominio A1 de proteína PARP no convencional
 - <223> Descripción de Secuencia Artificial: Dominio A2 de proteína PARP no convencional
 - <223> Descripción de Secuencia Artificial: Proteína de fusión entre el dominio del extremo N de APP y la proteína GUS
 - 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR degenerado

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso como cebador de PCR

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fusión del promotor de APP con el gen beta-glucuronidasa

<223> Codón de iniciación de la traducción

Ejemplos

5 Procedimientos experimentales

Cepas de levadura y bacterianas

Se usó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DY (MATa *his3 can1-10 ade2 leu2 trp1 ura3::(3xSV40 AP1-lacZ)* (Kuge y Jones, 1994) para la expresión de la proteína APP. La transformación con levadura se llevó a cabo según Dohmen *et al.* (1991). Las cepas se cultivaron en un medio SDC mínimo (0,67 % de base nitrogenada de levadura, 0,37 % de casamino-ácidos, 2 % de glucosa, 50 mg l⁻¹ de adenina y 40 mg l⁻¹ de triptófano). Para la inducción de la expresión de APP, se sustituyó la glucosa en SDC con 2 % de galactosa.

Se usó la cepa XL-1 de *Escherichia coli* (Stratagene, La Jolla, CA) para las manipulaciones de plásmidos y cribados de genotecas, que se llevaron a cabo según procedimientos convencionales (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Se usó BL21 de *E. coli* (Studier y Moffat, 1986) para la expresión de la proteína APP y C58C1Rif^R de *Agrobacterium tumefaciens* (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985) para la transformación estable de plantas.

Ensayo de actividad de poli(ADP-ribosa) polimerasa

Se ensayó la actividad enzimática de la APP en extractos totales de proteína de cepas de levadura preparadas como sigue. Se cultivaron DY (pV8SPA) o DY (pYeDP1/8-2) en 50 ml de medio SDC durante una noche a 30 °C en un agitador giratorio a 150 rpm. Se recogieron las células de levadura por centrifugación a 1.000 x g, se lavaron tres veces con 150 ml de tampón fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,5) y se suspendieron en 5 ml de tampón sorbitol (sorbitol 1,2 M, K₂HPO₄ 0,12 M, ácido cítrico 0,033 M, pH 5,9). Se añadió Lyticase (Boehringer Mannheim, Alemania) a la suspensión de células a una concentración final de 30 U ml⁻¹ y las células se incubaron a 30 °C durante 1 hora. Entonces se lavaron tres veces los esferoplastos de levadura con tampón sorbitol y se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis frío en hielo (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol, DTT 1 mM). Después de la sonicación, el lisado se centrifugó a 20.000 x g durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante se desaló en una columna EconoPack™ 10 DG (Bio-Rad, Richmond, CA) equilibrada con tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM). Para reducir la degradación proteolítica de las proteínas, los tampones de lisis y de reacción se complementaron con una mezcla de inhibidores de proteasas (Boehringer), una tableta por cada 50 ml. Se eliminaron los ácidos nucleicos de los extractos totales añadiendo NaCl y sulfato de protamina a una concentración final de 600 mM y 10 mg ml⁻¹, respectivamente. Después de incubación a temperatura ambiente durante 10 min, se separó el precipitado por centrifugación a 20.000 x g durante 15 min a 4 °C. El tampón del sobrenadante se intercambió por el tampón de reacción por filtración con gel en una columna Econo-Pack™ 10 DG.

El ensayo para la síntesis de poli(ADP-ribosa) se adaptó de Collinge y Althaus (1994). Se incubaron aproximadamente 500 µg de proteína de levadura total en un tampón de reacción complementado con 30 µCi de ³²P-NAD⁺ (500 Ci mmol⁻¹), NAD⁺ sin marcar a una concentración final de 60 µM y 10 µg ml⁻¹ de ADN de espermatozoos de salmón sonicado. Después de incubación durante 40 min a la temperatura ambiente, se añadieron 500 µl del tampón de parada (Tris-HCl 200 mM, pH 7,6, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, 1 % de Na⁺-N-lauroil-sarcosina y 20 µg ml⁻¹ de proteinasa K) y las reacciones se incubaron a 37 °C durante la noche. Después de extracciones con fenol y fenol/cloroformo, se precipitaron los polímeros con 2,5 volúmenes de etanol que contenía NaAc 0,1 M (pH 5,2). El sedimento se lavó con etanol al 70 %, se secó y se disolvió en 70 % de formamida, EDTA 10 mM, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de xileno-cianol. Las muestras se calentaron a 80 °C durante 10 min y entonces se cargaron en un gel de secuenciación de 12 % de poli(acrilamida/urea) 6 M. Los geles se secaron sobre papel 3MM (Whatman International, Maidstone, RU) y se expusieron a tanto película de rayos X Kodak X-Omat (Eastman, Richmond, NY) como se escanearon usando un Phosphorimager™ 445SI (Molecular Dynamics, Sunnival, CA).

Técnicas inmunológicas

Se expresó un ADNc de *app* truncado que codificaba un polipéptido APP desde los aminoácidos Met³¹⁰ a His⁶³⁷ como una fusión de traducción con seis restos de histidina en el término N después de la inducción de un cultivo de 500 ml del BL21 de *E. coli* (pETΔNdeSPA) con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM. El polipéptido APP se purificó hasta casi homogeneidad por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes (en presencia de clorhidrato de guanidinio 6 M) en una columna Ni²⁺-NTA-agarosa, según el protocolo del fabricante (Qiagen, Chatsworth, CA). Después de la diálisis contra PBS, se usó una mezcla de los polipéptidos APP solubles e insolubles para inmunizar dos conejos blancos de Nueva Zelanda siguiendo un protocolo de inmunización estándar (Harlow y Lane, 1988). Para el análisis de transferencia Western, las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE desnaturizante (Sambrook *et al.*, 1989; Harlow y Lane, 1988) y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Hybond-C; Amersham), utilizando un Semi-Dry Blotter II (Kem-En-Tec, Copenhagen, Dinamarca).

La localización *in situ* del antígeno en células de levadura se llevó a cabo como se ha descrito (Harlow y Lane, 1988). Para la localización de la proteína APP en esferoplastos de levadura, se diluyó suero anti-APP a 1:3000 a 1:5000 en tampón solución salina tamponada con Tris-BSA. Se usó el anticuerpo monoclonal 10H, que reconoce específicamente el polímero poli(ADP-ribosa) (Ikajima *et al.*, 1990) en una dilución 1:100 en tampón de PBS. El anticuerpo de ratón se detectó con el fragmento de F (ab')₂ de oveja anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), a una dilución de 1:200. Se detectó IgG de conejo con el fragmento F (ab')₂ de oveja anti-IgG de conejo conjugado con CY-3 (Sigma), a una dilución de 1:200. Para la visualización del ADN, se incubaron portaobjetos durante 1 min en PBS con 10 µg ml⁻¹ de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma). La obtención de imágenes de fluorescencia se realizó en un microscopio de epifluorescencia Axioskop (Zeiss, Jena, Alemania). Para la observación de los fluorocromos FITC y CY-3 se usaron cubos de 23 y 15 filtros, respectivamente. Las células se fotografiaron con película Fuji Color-100 super plus.

Material vegetal y análisis histoquímico

Se usó SR1 de *Nicotiana tabacum* (Maliga *et al.*, 1975) para la generación de transformantes estables siguiendo el procedimiento de cocultivo de discos de hojas (De Block *et al.*, 1987) con C58C1Rif^R de *A. tumefaciens* (pGV2260; pGCNSPAGUS). Se usó como control la línea SR1 de *N. tabacum* transformada con GUS auténtico bajo el control de CaMV 35S. Se usó *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, para la transformación de la fusión promotor de app-GUS siguiendo el procedimiento de infiltración *in situ*.

Para la tinción histoquímica *in situ* de la actividad de GUS, se fijaron muestras de plantas en 90 % de acetona fría en hielo durante 30 min, se lavaron en K₂HPO₄ 0,1 M (pH 7, 8) y entonces se incubaron en tampón de tinción (K₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,8, X-Gluc 2 mM, Fe³⁺-EDTA 20 mM) a 37 °C. Los tejidos de plantas teñidos se almacenaron en etanol al 70 % a 4°C. Cuando fue necesario, se redujo el pardeamiento de los tejidos debido a la oxidación fenólica por incubación con lactofenol (Beeckman y Engler, 1994). Se examinó la tinción de GUS bajo un microscopio óptico Jenalumar (Zeiss). Los tejidos vegetales se fotografiaron con película Fuji Color-100 super plus.

Diversos métodos

Las etapas de construcción de plásmidos se verificaron rutinariamente por secuenciación del ADN llevada a cabo según los protocolos proporcionados por USB Biochemicals (Cleveland, OH). Se sintetizaron sondas de ADN marcadas con ³²P para la hibridación de los ácidos nucleicos por medio del kit de marcación Ready-Prime DNA (Amersham). Para los experimentos de hibridación de ADN y ARN, se usó el sistema tampón de Church y Gilbert (1984) (fosfato de sodio 0,25 M, pH 7,2, 7 % de SDS, 1 % de BSA, EDTA 1 mM). Para el análisis por transferencia Western, las proteínas totales de levadura se extrajeron con fenol esencialmente como se ha descrito para tejidos vegetales (Hurkman y Tanaka, 1986). Para el análisis por transferencia Northern, se extrajo el ARN total de levadura con fenol caliente como se ha descrito (Ausubel *et al.*, 1987). El ARN se resolvió sobre geles de agarosa al 1,5 % después de la desnaturalización con glixal (Sambrook *et al.*, 1989). Para la transferencia de los ácidos nucleicos se utilizaron filtros de nailon Hybond-N (Amersham).

Ejemplo 1: Aislamiento de genes que codifican homólogos de PARP de *Zea mays*.

(Solo para referencia)

Con el fin de aislar ADNc de maíz que codifica homólogo(s) de PARP se siguieron dos enfoques. Primero, se cribó una genoteca de ADNc de maíz en condiciones de hibridación de ADN-ADN de baja rigurosidad usando una sonda de ADN preparada a partir del ADNc de *app* de *Arabidopsis*. En segundo lugar, se realizó una amplificación por PCR de parte de la PARP de maíz, utilizando el ADNc de la primera cadena como molde y dos cebadores degenerados, designados basándose en la secuencia de la "firma PARP", la secuencia de aminoácidos más conservada entre todas las proteínas PARP conocidas.

Una genoteca de ADNc λZAP (Stratagene) de hojas de maíz (*Zea mays* L.), línea endogámica B734. Se cribaron placas (500.000) según procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Después del cribado con la sonda de *app* de *Arabidopsis*, se purificó un ADNc de longitud no completa de 1,4 kpb. Después del cribado de la genoteca de ADNc inicial con la sonda de *app* y un posterior análisis de amplificación rápida de 5' de los extremos del ADNc (RACE)-PCR, se identificó el gen *nap*, un homólogo de maíz de *app* de *Arabidopsis*. Para la 5'RACE-PCR, el molde se preparó con el kit Marathon (Clontech, Palo Alto, CA) y 0,5 µg de ARN poli (A)⁺ de maíz aislado de la vaina interna, la vaina externa y las hojas de plantas de semillero de maíz de 1 semana de edad. Los cebadores anidados específicos de genes para la amplificación por PCR eran 5'-GGGACCATGTAGTTTATCTTGACCT-3' (SEQ ID No 15) y 5'-GACCTCGTACCCCAACTCTTCCCAT-3' (SEQ ID No 16) para los cebadores de *nap*. Se subclonaron y secuenciaron los productos de PCR amplificados. Se amplificó un fragmento de 800 pb con cebadores específicos de *nap*, lo que permitió reconstruir la secuencia de 2295 pb de longitud del ADNc de *nap* (SEQ ID No 3).

La proteína NAP tenía 653 aminoácidos de longitud (masa molecular ~73 kDa; SEQ ID No 4) y era muy similar (61 % de identidad de secuencia y 69 % de similitud) a la APP. Y, lo que es más importante, NAP tenía una organización del término N congruente con APP (Figura 1A), lo que sugería una presión de selección bastante estricta en cuanto a la estructura de proteínas semejantes a APP en las plantas. El gen *nap* era único en el genoma del maíz (Figura 2A) y codificaba un transcrito de 2,4 kb (Figura 2C).

Usando cebadores degenerados basados en regiones muy altamente conservadas en la "firma PARP" y el ADNc de la primera cadena de *Zea mays* como molde, se amplificó un fragmento de 310 pb. Para la PCR con cebadores degenerados 5'-CCGAATTCGGNTAYATGTTYGGNAA-3' (SEQ ID No 13) y 5'-CCGAATTCACNATRATYTCRTRTA-3' (SEQ ID No 14) con Y=C/T; R=A/G; N=A/G/C/T), se utilizó el ADNc de la primera cadena como molde y se sintetizó usando 5 µg de ARN poli (A)⁺ a partir de hojas jóvenes de maíz y la transcriptasa inversa MuMLV. Se realizaron ampliificaciones PCR con ADN polimerasa Taq en un volumen de 100 µl usando las siguientes condiciones: 1 min a 95 °C, 2 min a 45 °C, 3 min a 72 °C, seguido de 38 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min a 45 °C, 3 min a 72 °C, con una incubación final durante 10 min a 72 °C.

La secuencia del fragmento de 310 pb mostró el 55 % de identidad de secuencia y el 64 % de similitud de secuencia con PARP humana en la misma región, pero era, sin embargo, diferente de la secuencia del ADNc de *nap*. Se identificaron tres ADNc de zap después del cribado con el fragmento de 310 pb, que se obtuvo por PCR con cebadores degenerados. Estos tres ADNc purificados se derivaron todos del mismo transcrito debido a que tenían regiones 3' no codificantes idénticas; el clon más largo (N.º 9) se secuenció en ambas cadenas (SEQ ID No 1). Este ADNc codificaba un polipéptido homólogo a PARP de 689 aminoácidos (SEQ ID No 2; masa molecular ~109 kDa), que los presentes inventores designaron ZAP1 (Figura 1B). El primer dedo de Zn de ZAP1 era probablemente no funcional debido a que tenía la secuencia CKSCxxxHASV, que no incluía un tercer resto de cisteína.

El análisis de 5'RACE-PCR de los transcritos de *zap* de la línea de maíz LG2080 (la genoteca de ADNc cribada se produjo a partir de la línea endogámica B734) se realizó como se ha descrito anteriormente usando los siguientes cebadores específicos de *zap* 5'-AAGTCGACGCGGCCGCCACACCTAGTGCCAGGTCAG-3' (SEQ ID No 17) y 5'-ATCTCAATTGTACATTTCTCAGGA-3' (SEQ ID No 18). Se obtuvo un producto PCR de 450 pb después de PCR con cebadores específicos de *zap*. Se secuenciaron ocho fragmentos 5'RACE-PCR independientes, debido a sus ligeras diferencias en las longitudes en sus extremos 5', generados con cebadores específicos de *zap*. En todos los transcritos de las plantas de maíz LG2080, había una inserción de secuencia adicional en la región codificante, que hacía la proteína ZAP 11 aminoácidos más larga (980 aminoácidos, masa molecular ~110,4 kDa). El dedo de Zn I de ZAP2 era estándar y la lectura CKSCxxxHARC (Figura 1B; SEQ ID No 11). La diferencia de secuencias puede ser debida tanto a diferencias entre variedades de maíz, a la expresión de dos genes homólogos, como a corte y empalme alternativo. En realidad, el maíz puede tener al menos dos genes *zap* (Figura 2B), que codifican un transcrito de 3,4-3,5 kb (Figura 2D). El experimento de transferencia en gel de ADN con una sonda preparada a partir del ADNc de *zap* mostró que estaban presentes los genes homólogos en *Arabidopsis*.

Estructuralmente, ZAP era muy similar a PARP de los animales. Tenía un dominio de unión de ADN bien conservado, compuesto de dos dedos de Zn (36 % de identidad y 45 % de similitud con el dominio de unión de ADN de PARP de ratón). Se mostró homología aún mayor comparando solo las secuencias de los dedos de Zn, Ala¹-Phe¹⁶² en la enzima de ratón (44 % de identidad y 54 % de similitud), o un subdominio en la dirección 3' de la señal de localización nuclear (NLS), Leu²³⁷-Ser³⁶⁰ en la PARP de ratón (identidad 40 % y similitud 50 %). Mientras que la señal de localización nuclear bipartita característica de PARP de mamífero no pudo identificarse en ZAP, la secuencia KRKK se ajustaba una NLS monopartita (Figura 1B). El dominio de automodificación supuesto estaba poco conservado y era más corto en ZAP que en PARP de ratón. La compilación de la homología de los dominios catalíticos entre ZAP, NAP, APP y PARP de ratón se muestra en la Figura 2. Debe observarse que el dominio de unión de NAD⁺ de ZAP era más similar a la enzima de mamífero (identidad 48 %) que a la de APP y NAP (40 % y 42 % de identidad de secuencia, respectivamente), mientras que APP y NAP eran el 68 % idénticos y el 76 % similares en su dominio catalítico.

Ejemplo 2: Demostración de que la proteína PARP no convencional tiene una actividad de poli(ADP-ribosa) polimerasa dependiente de ADN.

(Solo para referencia)

APP es una poli(ADP-ribosa) polimerasa dependiente de ADN

Se realizó un estudio más detallado de la proteína APP (expresada en levadura) para entender la actividad de las proteínas semejantes a PARP de la clase NAP. La elección de levadura como el organismo para la expresión y el análisis enzimático de la proteína APP de *Arabidopsis* se realizó por varias razones. Como eucariota, *Saccharomyces cerevisiae* es más adecuado para la expresión de proteínas nativas que otros organismos eucariotas, y a diferencia de la mayoría de las otras células eucariotas, no posee actividad endógena de PARP (Lindahl *et al.*, 1995).

Se puso ADNc de *app* de longitud completa en pYeDP1/8-2 bajo el control de un promotor de levadura inducible por galactosa de la manera siguiente. Se escindió ADNc de *app* de longitud completa de pC3 (Lepiniec *et al.*, 1995) como un fragmento *XhoI-EcoRI*. Los extremos se rellenaron con el fragmento de Klenow de ADN-polimerasa I, y el fragmento se subclonó en el sitio *SmaI* del vector de expresión en levadura pYeDP1/8-2 (Cullin y Pompon, 1988). El vector de expresión resultante pV8SPA (Figura 4A) se transformó en la cepa DY de *S. cerevisiae*.

Para la expresión de APP en *E. coli*, se amplificó por PCR la región codificante completa del ADNc de *app* con ADN polimerasa Pfu (Stratagene), usando los cebadores 5'-AGGATCCCATGGCGAACAAGCTCAAAGTGAC-3' (SEQ ID

No 19) y 5'-AGGATCCTTAGTGCTTGTAGTTGAAT-3' (SEQ ID No 20), y se subclonó como un fragmento *Bam*HI en pET19b (Novagene, Madison, WI), produciendo pETSPA. La expresión de la APP de longitud completa en BL21 de *E. coli* de pETSPA fue muy pobre. Para obtener una mejor expresión, se digirió pETSPA con *Nco*I y *Nde*I o con *Sma*I, se rellenaron los extremos con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I, y entonces se autoligaron los plásmidos. De los plásmidos resultantes pET Δ NdeSPA y pET Δ SmaSPA, solo pETANdeSPA dio expresión satisfactoria del polipéptido APP truncado (Met³¹⁰ a His⁶³⁷) en BL21 de *E. coli*.

La expresión de la APP en levadura se verificó por análisis de transferencia Northern y Western (Fig. 4). Dado que el promotor en pV8SPA es inactivo cuando las células se cultivan en glucosa y se desreprimen en medios que contienen galactosa, se esperaba que la expresión estuviera estrictamente regulada por la fuente de carbono. Sin embargo, el análisis de transferencia Northern del ARN y el análisis de inmunotransferencia de proteínas en DY (pV8SPA) en comparación con la cepa de control DY que contenía el vector vacío, mostró que el ARNm de app y la proteína APP se expresaban en levadura incluso cuando se cultivaban en medios que contenían glucosa (Figura 4B, carril 2). La peculiaridad de la expresión observada en medio que contenía glucosa era que tanto el ARNm de app como la proteína APP eran más cortos que los detectados después de la inducción con galactosa (compárense los carriles 2 y 4 en la Figura 4B). El polipéptido APP con el peso molecular más alto (aparentemente una proteína de longitud completa) se detectaba únicamente en medio que contenía galactosa, aunque tales células también expresaban el ARNm y la proteína truncados. La explicación más probable para este hallazgo es que cuando la cepa DY (pV8SPA) se cultiva en glucosa, existe una expresión que se fuga del casete de expresión, comenzando la transcripción 200-300 pb en la dirección 3' del inicio de la transcripción observado después de inducción en galactosa. Este ARNm más corto probablemente no codifica la primera metionina (Met¹) de APP y, por tanto, la traducción se inicia en Met⁷². Esto explicaría la diferencia observada de -5 kDa (siendo la diferencia calculada 7,5 kDa) en las masas moleculares de los polipéptidos APP de las cepas cultivadas en glucosa o en galactosa. La posibilidad de que las diferencias en las masas moleculares puedan atribuirse a automodificación por poli(ADP-ribosilación se excluyó por cultivo de cepas en presencia de inhibidores de PARP tales como 3-ABA y nicotinamida (Figura 4B, compárense los carriles 6 y 8 con el carril 4).

Para detectar la síntesis de poli(ADP-ribosa), se extrajeron las proteínas totales de cepas de levadura cultivadas en diferentes condiciones y se incubaron en presencia de NAD⁺ marcada radiactivamente. Para prevenir la síntesis de poli(ADP-ribosa) y la posible automodificación de la APP *in vivo*, también se cultivaron cepas en presencia de 3ABA, un inhibidor reversible de PARP, que posteriormente se separó de los extractos de proteínas durante el desalado. La Figura 5 muestra que poli(ADP-ribosa) es sintetizada por extractos de proteínas de DY (pV8SPA) cultivados en galactosa (Figura 5A, pistas 1 y 2), pero no por una cepa que contiene el vector vacío (Figura 5A, carril 4). Puede observarse también que APP de *Arabidopsis* podría sintetizar polímeros de hasta 40 restos de longitud (Figura 5A, carril 1) estando incorporada la mayor parte de la radiactividad en el 10-15-mero. Esta observación es según los tamaños de polímero detectados por otros autores (Chen *et al.*, 1994). Se incorporó más radiactividad en el polímero cuando la cepa de levadura se cultivó con 3ABA que sin ella (Figura 5A, carril 1 comparado con el carril 2); la razón podría ser que o bien la APP extraída de cultivos inhibidos se automodificaba menos (se cree que la automodificación inhibe la actividad de PARP) o bien que la NAD⁺ marcada era usada por la enzima del cultivo no inhibido para la extensión del polímero existente, produciendo una actividad específica global más baja. En las mismas condiciones de reacción, la poli(ADP-ribosa) sintetizada por PARP humana, tanto en tampón de reacción solo como en presencia de un extracto de proteínas de levadura total de DY (pYeDP1/8-2) (Figura 5A, carriles 5 y 6, respectivamente), presentaba cadenas mucho más largas, posiblemente hasta 400-meras (de Murcia y Ménissier de Murcia, 1994).

La estimulación de la actividad enzimática por ADN cortado es una propiedad bien conocida de la PARP de animales (Alvarez-Gonzalez y Althaus, 1989). Por tanto, los presentes inventores probaron si la actividad de la proteína APP era dependiente de ADN. Después de la eliminación de los ácidos nucleicos de la levadura (ADN, ARN) y algunas proteínas básicas del extracto de proteína DY (pV8SPA) cultivado en galactosa, se analizó la síntesis de poli(ADP-ribosa) en presencia de concentraciones crecientes de ADN de esperma de salmón sonicado. Como puede apreciarse en la Figura 5B, hubo una correlación directa entre la cantidad de ADN presente en la reacción y la incorporación de ³²P-NAD⁺. El barrido de las imágenes fosforescentes indicó que se incorporaba ~6 veces más radioactividad en la poli(ADP-ribosa) en la mezcla de reacción que contenía 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ADN que en la que contenía 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ADN (Figura 5B, carriles 4 y 2, respectivamente). La síntesis del polímero era sensible a 3ABA en la mezcla de reacción (Figura 5B, carril 5).

APP es una proteína nuclear

En las células animales, la actividad de PARP está localizada en el núcleo (Schreiber *et al.*, 1992). La localización intracelular, en el caso de ser nuclear, de APP podría proporcionar una indicación adicional importante de que APP es una PARP de planta auténtica. Para este fin, la localización de los polipéptidos APP en células de levadura se analizó usando antisueros anti-APP. El polipéptido APP sintetizado en levadura cultivada sobre galactosa se encontraba principalmente en el núcleo. Esta localización no se veía afectada por la presencia en el medio de los inhibidores de PARP.

Además, los presentes inventores probaron si la APP era constitutivamente activa en células de levadura, como se ha informado para la PARP humana (Collinge y Althaus, 1994). Aquí, se incubaron esferoplastos de levadura fijados

con el anticuerpo monoclonal 10H, que reconoce específicamente los polímeros de poli(ADP-ribosa) (Kawamitsu *et al.*, 1984). Se localizó una señal de fluorescencia amarillenta-verde positiva con el anticuerpo 10H en el núcleo y se observó únicamente en células DY (pV8SPA) cultivadas en galactosa. La tinción positiva se reducía notablemente en las células cultivadas en presencia de los inhibidores de PARP, 3ABA y nicotinamida.

5 Para identificar la localización intracelular de APP en células de plantas, se usó un enfoque ampliamente adoptado en estudios de plantas, es decir, el examen de la localización subcelular de una proteína de fusión formada entre la proteína en cuestión y un gen indicador, una vez que se produjo la fusión proteínica en plantas transgénicas o células transfectadas (Citovsky *et al.*, 1994; Sakamoto y Nagatani, 1996; Terzaghi *et al.*, 1997; von Arnim y Deng, 1994). Se realizó una fusión traduccional del extremo N de GUS con la parte del polipéptido APP que se extendía desde Met¹ a Pro⁴⁰⁷. La fusión traduccional de APP con GUS bacteriano se construyó como sigue. Se cortó el plásmido pETSPA con *Sma*I, se trató con fosfatasa alcalina y se ligó a un fragmento como *Nco*I-*Xba*I de pGUS1 (Plant Genetic Systems N.V., Gante, Bélgica). La mezcla de ligación se transformó en XL-1 de *E. coli* y las células se sembraron sobre medio LB complementado con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 0,1 mM, 40 μg ml⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido y 100 μg ml⁻¹ de ampicilina. De este modo, se seleccionó pETSPAGUS como colonias azules. La expresión en *E. coli* de la proteína de fusión de ~110 kDa se confirmó por geles de actividad GUS *in situ* (Lee *et al.*, 1995).

La fusión APP-GUS se puso bajo el control del promotor 35S del CaMV (el fragmento *Bam*HI hecho como con Klenow de pETSPAGUS se subclonó en pJD330 digerido con *Sma*I; Gallie y Walbot, 1992) y el casete de expresión resultante se subclonó como un fragmento *Xba*I en el sitio *Xba*I del vector binario pCGN1547 (McBride y Summerfelt, 1990) para dar pGCNSPAGUS. El pGCNSPAGUS se introdujo finalmente en C58C1Rif^R(pGV2260) de *A. tumefaciens* por el procedimiento de transformación de congelación-descongelación.

La expresión de la proteína de fusión se verificó en *E. coli*. El ADNc quimérico bajo el control del promotor 35S del CaMV se integró de manera estable en el genoma del tabaco. Se analizó la progenie de cuatro plantas transgénicas independientes de tabaco para la distribución subcelular de la actividad de GUS después de tinción histoquímica *in situ* (Jefferson *et al.*, 1987). En plantas de semillero de 2 días de edad pudo detectarse la actividad de GUS en los cotiledones y en las raíces, pero no en los hipocótilos o los ápices de la raíz. Debido a la transparencia de los tejidos de la raíz, la tinción de GUS se localizaba claramente en los núcleos de los pelos radiculares y las células epidérmicas. Adicionalmente, se observó cierta tinción difusa no localizada de otras células de las raíces, en particular a lo largo de los cilindros vasculares. Esta tinción no nuclear de GUS era más pronunciada en los tejidos de las hojas. Mientras que las hojas jóvenes verdaderas o cotiledones presentaban una tinción azul intensa de los núcleos, también se apreciaba cierta tinción difusa del citoplasma. En las hojas completamente expandidas, sin embargo, la tinción de GUS se hacía homogénea y similar a la tinción de las plantas de control transformadas con GUS bajo el control del promotor 35S del CaMV, en el que se expresaba GUS en el citoplasma. Eventualmente, las hojas más viejas o los cotiledones no presentaban prácticamente actividad alguna de GUS detectable histoquímicamente, con la excepción de los haces vasculares, donde la tinción de GUS no podía confinarse a ningún compartimiento particular de las células.

La deficiencia en ADN ligasa I induce la expresión del gen app

La PARP en las células animales es una de las proteínas nucleares más abundantes y su actividad está regulada por cambios alostéricos en la proteína después de fijación al ADN dañado. Los presentes inventores encontraron que el gen *app* en *Arabidopsis* tenía un nivel de expresión más bien bajo, lo que sugería que la activación transcripcional de este gen podría ser esencial para la función de APP *in vivo*. Para probar esta hipótesis, se estudió la expresión del gen *app* durante la desestabilización del genoma *in vivo* producida por una deficiencia en ADN ligasa I. Se aisló previamente una mutación por inserción de T-ADN, línea SK1 B2, en el gen de ADN ligasa I de *Arabidopsis* (Babiychuk *et al.*, 1997). La mutación es letal en el estado homocigótico, pero el alelo mutante muestra transmisión normal en los gametos. Los presentes inventores esperaban, por tanto, que las células homocigóticas para la mutación murieran debido a una síntesis incompleta del ADN durante la fase S del ciclo celular, poco después de la fertilización del saco embrionario mutante con polen mutante.

Se construyó una fusión de traducción promotor de *app*-GUS, en la que la región codificante de GUS estaba fusionada en marco con los cinco primeros aminoácidos de APP y 2 kb de secuencias flanqueantes de *app* 5' (SEQ ID No 21). El gen que codifica la proteína de fusión se transformó en *Arabidopsis*. Después de dos retrocruzamientos con un no mutante, las plantas heterocigóticas transformadas con el promotor de *app*-GUS se cruzaron con la línea SK1 B2 de *Arabidopsis*. Las inflorescencias de las plantas de control y las plantas heterocigóticas para la mutación de ligasa se tiñeron por la actividad de GUS. El patrón de tinción GUS detectado principalmente en los tejidos de envejecimiento refleja probablemente la expresión del gen *app*, aunque los presentes inventores no tienen evidencia firme de que la totalidad de las secuencias reguladoras estuvieran presentes en las construcciones usadas. Este patrón era el mismo tanto en las inflorescencias de las plantas de control, que no llevaban el gen mutante de ligasa como en las plantas heterocigóticas para una mutación. Aproximadamente la cuarta parte de los óvulos en las plantas mutantes con la proteína de fusión son GUS-positivos. El examen microscópico más próximo mostró que en los óvulos GUS-positivos únicamente se teñía el gametofito. La única diferencia entre las plantas de control y la planta mutante era una mutación en un gen de ADN ligasa. Los presentes inventores, por tanto, llegan a la conclusión de que el gen *app* es inducido, debido o bien a la acumulación de roturas del ADN, o a la muerte de los

sacos embrionarios mutantes fertilizados con polen mutante. Se encontró que la tinción GUS de los sacos embrionarios aparece dentro de las 24 horas después de la polinización, o por consiguiente muy pronto después de la fertilización.

5 **Ejemplo 3: Construcción de genes quiméricos moduladores de la PCD e introducción de los vectores de T-ADN que comprenden tales genes moduladores de la PCD en una cepa de *Agrobacterium* (solo para referencia)**

3.1. Construcción de los genes p35S:(ARNbc-APP) y p35S:(ARNbc-ZAP)

Usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, se unen operativamente las siguientes regiones de ADN, como se expone resumidamente en la Figura 6 (construcciones 1 y 5):

- 10 Para el gen quimérico p35S: (ARNbc-ZAP)
- una región promotora 35S de CaMV (Odell *et al.*, 1985)
 - una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
 - una región de ADN que codifica ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- 15
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica ZAP2 en orientación inversa
 - una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico p35S: (ARNbc-APP)

- una región promotora 35S de CaMV (Odell *et al.*, 1985)
 - una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- 20
- una región de ADN que codifica APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
 - aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica APP en orientación inversa
 - una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

3.2. Construcción de los genes pNOS:(ARNbc-APP) y pNOS:(ARNbc-ZAP)

25 Usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, se unen operativamente las siguientes regiones de ADN, como se expone resumidamente en la Figura 6 (construcciones 2 y 6):

Para el gen quimérico pNOS:(ARNbc-ZAP)

- una región promotora NOS (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)
 - una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- 30
- una región de ADN que codifica ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
 - aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica ZAP2 en orientación inversa
 - una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico pNOS:(ARNbc-APP)

- una región promotora NOS (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)
- 35
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
 - una región de ADN que codifica APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
 - aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica APP en orientación inversa
 - una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

3.3. Construcción de los genes pTA29:(ARNbc-APP) y pTA29:(ARNbc-ZAP)

Usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, se unen operativamente las siguientes regiones de ADN, como se expone resumidamente en la Figura 6 (construcciones 3 y 7):

Para el gen quimérico pTA29:(ARNbc-ZAP)

- 5 • una región promotora TA29 (WO 89/10396)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de ADN que codifica ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica ZAP2 en orientación inversa
- 10 • una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico pTA29:(ARNbc-APP)

- una región promotora TA29 (WO 89/10396)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de ADN que codifica APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- 15 • aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica APP en orientación inversa
- una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

3.4. Construcción de los genes pNTP303:(ARNbc-APP) y pNTP303:(ARNbc-ZAP)

Usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, se unen operativamente las siguientes regiones de ADN, como se expone resumidamente en la Figura 6 (construcciones 4 y 8):

20 Para el gen quimérico pNTP303:(ARNbc-ZAP)

- una región promotora NTP303 (Wetering 1994)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de ADN que codifica ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- 25 • aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica ZAP2 en orientación inversa
- una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico pNTP303:(ARNbc-APP)

- una región promotora NTP303 (Wetering 1994)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- 30 • una región de ADN que codifica APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de ADN que codifica APP en orientación inversa
- una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990)

3.5. Construcción de los genes marcadores quiméricos

Usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, se unen operativamente las siguientes regiones de ADN, como se expone resumidamente en la Figura 6:

35 Para el gen marcador *gat*

- una región promotora Act2 (An *et al.*, 1996)

- un ADN que codifica aminoglucósido-6'-acetiltransferasa (documento WO 94/26913)
- una región del extremo 3' de un gen de nopalina sintasa (Depicker et al., 1982)

Para el gen marcador *bar*

- una región promotora Act2 (An et al., 1996)
- 5
- un ADN que codifica fosfinotricina acetiltransferasa (documento US 5.646.024)
 - una región del extremo 3' de un gen de nopalina sintasa (Depicker et al., 1982)

3.6. Construcción de los vectores de T-ADN que comprenden los genes quiméricos moduladores de la PCD

Usando enzimas de restricción apropiadas, se escinden los genes moduladores quiméricos de la PCD descritos en 3.1 a 3.5 y se introducen en el policonector entre las fronteras de T-ADN de un vector T-ADN derivado de pGSV5 (documento WO 97/13865) junto con el gen marcador *gat* o el gen marcador *bar*. Los vectores de T-ADN resultantes se representan esquemáticamente en la Figura 6.

3.7. Introducción de los vectores de T-ADN en *Agrobacterium*

Se introducen los vectores de T-ADN en C58C1 Rif(pGV4000) de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación como se describe por Walkerpeach y Velten (1995) y se seleccionan los transformantes usando espectinomicina y estreptomycinina.

Ejemplo 4: Transformación mediada por *Agrobacterium* de *Arabidopsis thaliana* con los vectores de T-ADN del Ejemplo 3 (solo para referencia)

Se usan las cepas de *Agrobacterium* para transformar *Arabidopsis thaliana* var. C24 aplicando el método de transformación de las raíces como se describe por Valvekens et al. (1992). Los explantes se co-infectan con las cepas de *Agrobacterium* que contienen ARNbc-APP, respectivamente las construcciones ARNbc-ZAP. Las construcciones ARNbc-APP se usan en combinación con el gen *pact:bar*. Las construcciones ARNbc-ZAP se usan en combinación con el gen *pact-gat*. Se seleccionan transformantes para resistencia a fosfinotricina. Se prueban las líneas transgénicas enraizadas regeneradas para la presencia del otro T-ADN por cribado para resistencia a kanamicina. Las líneas transgénicas que contienen ambos T-ADN se transfieren al invernadero. Se puntúa el fenotipo de las líneas transgénicas T0 y las generaciones T1 se estudian además con mayor detalle.

Ejemplo 5: Transformación mediada por *Agrobacterium* de *Brassica napus* con los vectores de T-ADN del Ejemplo 3 (solo para referencia)

Se usan las cepas de *Agrobacterium* para transformar *Brassica napus* var. N90-740 aplicando el método de transformación del hipocótilo esencialmente como se describe por De Block et al. (1989), excepto por las siguientes modificaciones:

- Se precultivan explantes de hipocótilo durante 1 día en medio A2 [MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2 % de glucosa, 0,5 % de agarosa, 1 mg/l de 2,4-D, 0,25 mg/l de ácido naftalenoacético (NAA) y 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP)].
- El medio de infección A3 es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2 % de glucosa, 0,1 mg/l de NAA, 0,75 mg/l de BAP y 0,01 mg/l de ácido giberélico (GA3).
- El medio de selección A5G es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2 % de glucosa, 40 mg/l de adenina.SO₄, 0,5 g/l de polivinilpirrolidona (PVP), 0,5 % de agarosa, 0,1 mg/l de NAA, 0,75 mg/l de BAP, 0,01 mg/l de GA3, 250 mg/l de carbenicilina, 350 mg/l de triacilina, 5 mg/l de AgNO₃ durante tres semanas. Después de este periodo, se continúa la selección en medio A5J (similar a A5G pero con 3 % de sacarosa)
- El medio de regeneración A6 es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 2 % de sacarosa, 40 mg/l de adenina.SO₄, 0,5 g/l de PVP, 0,5 % agarosa, 0,0025 mg/l de BAP y 250 mg/l de triacilina.
- Se transfieren brotes sanos a un medio de enraizado que era A9:MS semiconcentrado, 1,5 % de sacarosa (pH 5,8), 100 mg/l de triacilina, 0,6 % de agar en recipientes de 1 litro.

MS significa medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962).

Para introducir ambas construcciones ARNbc-APP y ARNbc-ZAP de T-ADN en una misma célula de planta, se aplica el método de co-transformación, especialmente como se describe por De Block y Debrouwer (1991). Se seleccionan líneas de plantas transformadas en medio que contiene fosfinotricina, después de lo cual se criba la presencia del segundo T-ADN probando los brotes enraizados regenerados para resistencia a kanamicina. En los experimentos de co-transformación, se usan las construcciones ARNbc-APP en combinación con el gen *pact:bar*.

Los construcciones ARNbc-ZAP se usan en combinación con el gen *pact-gat*. Las líneas transgénicas que contienen ambos T-ADN se transfieren al invernadero. Se puntúa el fenotipo de las líneas transgénicas T0 y las generaciones T1 se estudian además con mayor detalle.

Ejemplo 6: Ensayo *in vitro* para probar el vigor de las líneas de plantas (solo para referencia)

5 **6.1. Ensayo de aptitud para *Brassica napus***

Medios y tampones de reacción

Medio de siembra:

Sales de Murashige y Skoog semiconcentradas

2 % de sacarosa

10 pH 5,8

0,6 % de agar

Medio de inducción de callo: A2S

Medio MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,8), 3 % de sacarosa, 40 mg/l de adenina-SO₄, 0,5 % de agarosa, 1 mg/l de 2,4-D, 0,25 mg/l de NAA, 1 mg/l de BAP

15 Medio de incubación:

Tampón fosfato de K 25 mM, pH 5,8

2 % de sacarosa

1 gota de Tween 20 para 25 ml de medio

Tampón de reacción:

20 Tampón fosfato de K 50 mM, pH 7,4

Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 10 mM (TTC) (= 3,35 mg/ml)

1 gota de Tween 20 para 25 ml de tampón

Esterilización de semillas y crecimiento de plantas de semillero

25 Se empapan semillas en etanol al 70 % durante 2 min, luego se esterilizan superficialmente durante 15 min en una disolución de hipoclorito de sodio (con aproximadamente 6 % de cloro activo) que contiene 0,1 % de Tween 20. Finalmente, se aclaran las semillas con 1 l de agua destilada estéril. Se ponen 7 semillas/recipiente de 1 l (Weck) que contiene aproximadamente 75 ml de medio de siembra. Se dejan germinar las semillas a 23 °C y 30 μEinstein/s⁻¹m⁻² con un periodo de luz de 16 h.

La línea N90-740 se incluye siempre para normalización entre experimentos.

30 *Precultivo de los explantes de hipocótilo*

- 12-14 días después de la siembra, se cortan los hipocótilos en segmentos de aproximadamente 7 mm. 25 hipocótilos/placa de Petri Optilux (Falcon S1005)

- Los explantes de hipocótilos se cultivan durante 4 días en medio A2S a 23-25 °C (a 30 μEinstein/s⁻¹m⁻²).

□ P.S.: son necesarios aproximadamente 150-300 explantes de hipocótilo/línea para llevar a cabo el ensayo

35 - Transferir los explantes de hipocótilos a placas de Petri Optilux (Falcon S1005) que contienen 30 ml de medio de incubación.

- Incubar durante aproximadamente 20 horas a 24 °C en la oscuridad.

Ensayo de TTC

- Transferir 150 explantes de hipocótilo a un tubo Falcon de 50 ml.

40 - Lavar con tampón de reacción (sin TTC).

- Añadir 25 ml-30 ml de tampón de reacción/tubo.

Tubo 1 □ No se añadió TTC

* para medir la absorción de fondo

* es suficiente una línea/experimento

Tubo 2 □ + TTC 10 mM

5 (los explantes tienen que estar sumergidos, ¡pero no se infiltran a vacío!)

- Invertir los tubos
- Incubar durante aproximadamente 1 hora en la oscuridad a 26 °C (¡la reacción no termina!)
- Lavar los hipocótilos con agua desionizada
- Eliminar el agua

10 - Congelar a -70 °C durante 30 min

- Descongelar a temperatura ambiente (en la oscuridad)
- Añadir 50 ml de etanol (industrial)
- Extraer el TTC-H reducido por agitación mediante sacudidas durante 1 hora
- Medir las absorciones de los extractos a 485 nm

15 P.S.: el TTC-H reducido no es estable □ mantener en la oscuridad y medir la D.O.₄₈₅ tan pronto como sea posible

$$D.O._{485} \text{ (TTC-H)} = (D.O._{485} + \text{TTC}) - (D.O._{485} - \text{TTC})$$

- 20
- La comparación de las capacidades reductoras de TTC entre muestras de experimentos independientes diferentes puede hacerse por ajuste de la capacidad reductora de TTC de N90-740 en los diferentes experimentos al 100 %.
 - Las líneas con una capacidad reductora de TTC alta son vigorosas, mientras que las líneas con una capacidad reductora de TTC baja son débiles.

6.2. Ensayo de aptitud de *Arabidopsis*

Medios y tampones de reacción

25 Medio de plantas: sales de Murashige y Skoog semiconcentradas

1,5 % de sacarosa

pH 5,8

0,6 % de agar

→ Autoclave 15 min

30 Añadir esterilizado por filtración - 100 mg/l de mio-inositol

- 0,5 mg/l de piridoxina

- 0,5 mg/l de ácido nicotínico

- 1 mg/l de tiamina

Medio de incubación:

Tampón fosfato de K 10 mM, pH 5,8

35 2 % de sacarosa

1 gota de Tween 20 para 25 ml de medio

Tampón de reacción: Tampón fosfato de K 50 mM, pH 7,4

Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio 10 mM (TTC) (= 3,35 mg/ml)

ES 2 629 771 T3

1 gota de Tween 20 por 25 ml de tampón

Plantas de Arabidopsis

- Esterilización de las semillas de *Arabidopsis*
 - 2 min en etanol al 70 %
- 5 10 min de lejía (6 % de cloro activo) + 1 gota de Tween 20 para 20 ml de disolución
lavar 5 veces con agua estéril
 - P.S.: la esterilización se hace en tubos Eppendorf de 2 ml, las semillas de *Arabidopsis* se hunden al fondo del tubo, permitiendo la eliminación de los líquidos por medio de una Pipetman de 1 ml
- Cultivo de las plantas de *Arabidopsis*
 - 10 Las semillas se siembran en 'Discos de cultivo de tejidos Intergrid de Falcon' (N.º 3025) que contienen ±100 ml de medio vegetal: 1 semilla/cuadrícula.
Las plantas se cultivan a 23 °C
 - 40 $\mu\text{Einstein s}^{-1}\text{m}^{-2}$
 - 16 horas de luz - 8 horas de oscuridad
 - 15 durante aproximadamente 3 semanas (las plantas comienzan a formar capullos)
→P.S.: * se necesitan aproximadamente 90-110 plantas/línea para llevar a cabo el ensayo
* incluir línea de control (C24; Columbia;...) para calibración.

Pre-incubación

- Recoger brotes de *Arabidopsis* cortando de las raíces (mediante tijeras).
- 20 Poner cada brote inmediatamente en medio de incubación (los brotes tienen que estar sumergidos, pero no se infiltran a vacío)
Medio de incubación: ±150 ml en 'Discos de cultivo de tejidos Intergrid de Falcon' (N.º 3025)
 - a) Medio de incubación: para cuantificación de la absorción del fondo (véase el ensayo de TTC)
 - b) Medio de incubación
 - 25 c) Medio de incubación + niacinamida 2 mM
- 30 - 35 brotes/placa de Petri (pero la misma cantidad de brotes para todas las líneas y para cada condición)
- Incubar a 24 °C en la oscuridad durante ±20 horas.

Ensayo de TTC

- Transferir los brotes a tubos Falcon de 50 ml
- 30 - Lavar con tampón de reacción (sin TTC)
- Añadir 30-35 ml de tampón de reacción/tubo
 - a) sin TTC añadida (para medida de la absorción de fondo)
 - b y c) + TTC 10 mM
- (los brotes tienen que estar sumergidos, ¡pero no se infiltran a vacío!)
- 35 - Incubar durante aproximadamente 2 horas en la oscuridad a 26 °C (¡la reacción no termina!)
- Lavar los brotes con agua desionizada
- Eliminar el agua
- Congelar a -70 °C durante 30 min

- Descongelar a la temperatura ambiente (en la oscuridad)
- Añadir 50 ml de etanol (industrial)
- Extraer el TTC-H reducido por agitación mediante sacudidas durante 1 hora
- Medir las absorciones de los extractos a 485 nm

5 P.S.: el TTC-H reducido no es estable → mantener en la oscuridad y medir la D.O.₄₈₅ tan pronto como sea posible

- Comparar los perfiles de reducción de las líneas probadas frente a la línea de control (para la población de 30 a 35 plantas)

$$D.O._{485} (TTC-H) = (D.O._{485} + TTC) - (D.O._{485} - TTC)$$

10 - La comparación de las capacidades reductoras de TTC entre muestras de experimentos independientes diferentes puede hacerse por ajuste de la capacidad reductora de TTC de la línea de control (C24; Columbia;...) en los diferentes experimentos al 100 %.

- Las líneas con una capacidad reductora de TTC alta son vigorosas, mientras que las líneas con una capacidad reductora de TTC baja son débiles.

15 - Si la adición de niacinamida al medio de incubación produce una mayor capacidad reductora de TTC, indica una aptitud menor (como se muestra para C24 y Columbia)

Ejemplo 7: Análisis fenotípicos de las líneas transgénicas que contienen ambas construcciones ARNbc-APP y ARNbc-ZAP (solo para referencia)

20 Se puntuaron el fenotipo de la flor y la viabilidad del polen (tinción de Alexander (Alexander, 1969) y ensayo de germinación) de las líneas T0 que contenían ARNbc-APP y ARNbc-ZAP bajo el control de promotores específicos de tapete o de polen. Para *Arabidopsis*, la generación T1 se obtiene por autopolinización o, si las plantas son estériles masculinas, por retrocruzamiento usando polen de plantas no mutantes no transformadas. Para *Brassica napus*, la generación T1 se obtiene siempre por retrocruzamiento usando polen de plantas no transformadas.

25 La semilla T1 se deja germinar sobre medio que contiene kanamicina, después de lo cual las plantas resistentes se puntúan por medio del ensayo de multipocillos de amonio para resistencia a fosfotricina (De Block *et al.*, 1995). La mitad de las plantas que contienen ambos T-ADN se transfiere al invernadero para puntuar la fertilidad masculina de las plantas, mientras que la otra mitad se usa para cuantificar el vigor de las plantas por medio del ensayo de aptitud.

Para las plantas que comprenden combinaciones (APP/ZAP) de genes moduladores de la PCD bajo control del promotor 35S o NOS, se observa un alto vigor en varias de las líneas transgénicas.

30 Para las plantas que comprenden combinaciones (APP/ZAP) de los genes moduladores de la PCD bajo control de TA29, se observa esterilidad masculina en varias de las líneas transgénicas.

Para las plantas que comprenden combinaciones (APP/ZAP) de los genes moduladores de la PCD bajo control de NTP303, se observa polen estéril en varias de las líneas transgénicas.

35 **Ejemplo 8: Análisis fenotípico de plantas que comprenden un gen quimérico modulador de la PCD (solo para referencia)**

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico p35S::(ARNbc-ZAP) usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, uniendo operativamente las siguientes regiones de ADN:

- una región promotora 35S2 de CaMV (Odell *et al.*, 1985)
- un ADN que codifica una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- 40 • una región de ADN que codifica ZAP2 de *Zea mays* desde el sitio HincII al sitio SnaBI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 del nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 1728
- el extremo 5' de la región que codifica ZAP2 desde el sitio HincII al sitio EcoRV en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 del nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 792)
- 45 • una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen *et al.*, 1990).

Este gen quimérico se introdujo en el policonector entre las fronteras de T-ADN de un vector de T-ADN derivado de pGSV5 (descrito en el documento WO 97/13865) junto con el gen marcador bar, y produce el vector de T-ADN pTYG33, que se introdujo en C58C1 Rif (pGV4000) de *Agrobacterium* por electroporación como se ha descrito.

5 Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico pNos::(ARNbc-ZAP) usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, uniendo operativamente las siguientes regiones de ADN:

- una región promotora de nopalina sintasa (Herrera-Estrella et al., 1985)
- un ADN que codifica una región conductora Cab 22 (Harpster et al., 1988)
- una región de ADN que codifica ZAP2 de *Zea mays* desde el sitio HincII al sitio SnaBI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 del nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 1728
- 10 • el extremo 5' de la región que codifica ZAP2 desde el sitio HincII al sitio EcoRV en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 del nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 792)
- una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen et al., 1990).

15 Este gen quimérico se introdujo en el policonector entre las fronteras de T-ADN de un vector de T-ADN derivado de pGSV5 (descrito en el documento WO 97/13865) junto con el gen marcador bar, y produce el vector de T-ADN pTYG34, que se introdujo en C58C1 Rif (pGV4000) de *Agrobacterium* por electroporación como se ha descrito.

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico p35S::(ARNbc-APP) usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, uniendo operativamente las siguientes regiones de ADN:

- una región promotora 35S2 de CaMV (Odell et al., 1985)
- 20 • un ADN que codifica una región conductora Cab 22 (Harpster et al., 1988)
- una región de ADN que codifica APP de *Arabidopsis thaliana* desde el sitio Scal al sitio SmaI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 del nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 1349
- el extremo 5' de la región que codifica ZAP2 desde el sitio Scal al sitio HaeIII en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 del nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 784)
- 25 • una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen et al., 1990).

Este gen quimérico se introdujo en el policonector entre las fronteras de T-ADN de un vector de T-ADN derivado de pGSV5 (descrito en el documento WO 97/13865) junto con el gen marcador bar, y produce el vector de T-ADN pTYG29, que se introdujo en C58C1 Rif (pGV4000) de *Agrobacterium* por electroporación como se ha descrito.

30 Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico pNos::(ARNbc-APP) usando procedimientos convencionales de ADN recombinante, uniendo operativamente las siguientes regiones de ADN:

- una región promotora de nopalina sintasa (Herrera-Estrella et al., 1985)
- un ADN que codifica una región conductora Cab 22 (Harpster et al., 1988)
- 35 • una región de ADN que codifica APP de *Arabidopsis thaliana* desde el sitio Scal al sitio SmaI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 del nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 1349
- el extremo 5' de la región que codifica ZAP2 desde el sitio Scal al sitio HaeIII en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 del nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 784)
- una región del extremo 3' de 35S de CaMV (Mogen et al., 1990).

40 Este gen quimérico se introdujo en el policonector entre las fronteras de T-ADN de un vector de T-ADN derivado de pGSV5 (descrito en el documento WO 97/13865) junto con el gen marcador bar, y produce el vector de T-ADN pTYG30, que se introdujo en C58C1 Rif (pGV4000) de *Agrobacterium* por electroporación como se ha descrito.

45 Las cepas de *Agrobacterium* resultantes se usaron para introducir los diferentes genes moduladores de la PCD por separado en plantas de *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* (Columbia y C24) como se describe en los Ejemplos 4 y 5.

Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas por autopolinización de la generación T0 (generación T1) se dejaron germinar en medio que contenía fosfotricina. Las plantas transgénicas resistentes se cultivaron adicionalmente.

5 El crecimiento de las plantas transgénicas T1 (tanto derivadas de Columbia como de C24) que comprendían una construcción pNOS::(ARNbc-ZAP) como en pTYG33 o una construcción p35S::(ARNbc-ZAP) como en pTYG34, era significativamente más rápido que el de las plantas transgénicas de control transformadas por el T-ADN del vector de T-ADN sin gen quimérico modulador de la PCD (véase la Tabla 1).

10 Se evaluó la tolerancia al estrés de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* T1 (derivadas de Columbia) dejando en flotación pequeñas plantas sobre una disolución de ácido salicílico de o bien 10 o bien 50 mg/l o, para control, simplemente sobre H₂O. Las plantas sensibles al estrés desarrollaban hojas blanqueadas y retorcidas después de 1 a 2 días de incubación, mientras que las plantas tolerantes al estrés se mantenían intactas durante al menos cinco días. Nuevamente, las plantas transgénicas que comprendían una construcción pNOS::(ARNbc-ZAP) como en pTYG33 o una construcción p35S::(ARNbc-ZAP) como en pTYG34, eran significativamente más tolerantes al estrés que las plantas transgénicas de control (véase la Tabla 1).

15 El callo transgénico resistente a PPT obtenido a partir de *Brassica napus* transformada por las construcciones ARNbc-ZAP o ARNbc-APP de pTYG29, pTYG30, pTYG33 o pTYG34, se incubó en un medio que contenía 50 mg/l de aspirina durante 2 días. Después de 2 días, se determinó el peso de los callos y los callos se transfirieron a un medio sin aspirina y se incubaron adicionalmente durante 5 días. Al final del periodo de 5 días, se determinó el peso de los callos, y el aumento en peso se expresó como un porcentaje del peso después del periodo de incubación de dos días. Como control, se tomó callo transgénico transformado por un T-ADN sin un gen quimérico modulador de la PCD por el mismo procedimiento, con la excepción de que no se añadió aspirina durante la incubación de 2 días. Los resultados se resumen en la Tabla II e indican que las células de *Brassica napus* transgénicas que comprenden un gen quimérico modulador de la PCD son más resistentes al estrés que las células de control.

Tabla 1. Evaluación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* (generación T1)

Gen quimérico modulador de la PCD	Crecimiento (Columbia y C24)	Tolerancia al estrés (Columbia)
pNOS::(ARNbc-ZAP)	+++	++
p35S::(ARNbc-ZAP)	++	+
pNOS::(ARNbc-APP)	+	+/-
p35S::(ARNbc-APP)	+	-
Control	+	+/- (**)
** <i>A. thaliana</i> Columbia tiene un cierto grado de tolerancia natural a la aspirina.		

25

Tabla 2. Recrecimiento de los callos de *Brassica* transgénica después de la incubación en aspirina

Gen quimérico modulador de la PCD	Aumento de peso (%)
pNOS::(ARNbc-ZAP)	80
p35S::(ARNbc-ZAP)	90
pNOS::(ARNbc-APP)	75
p35S::(ARNbc-APP)	85
Control	70
El error estándar de la media es < 5 %.	

REFERENCIAS

- Alexander (1969) Stain Technology 44, 117
- 30 Alvarez-Gonzalez and Althaus (1989) Mut. Res. 218, 67-74
- An et al. (1996) The Plant Cell 8, 15-30

- An et al. (1996b) *Plant Journal* 10, 107-121
- Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA.
- Ausubel et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*. New York: Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience
- 5 Babiychuk et al (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12722-12727
- Beeckman and Engler (1994) *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 37-42.
- Chen et al. (1994) *Eur. J. Biochem* 224, 135-142
- Citovsky et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3210-3214.
- Cohen (1993) *Immunol. Today* 14, 126-130
- 10 Collinge and Althaus (1994) *Mol. Gen. Genet.* 245, 686-693
- Croy (1993) *Plant Molecular Biology Labfax* publicado a la vez por BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications, RU.
- Cullin and Pompon (1988) *Gene*, 65, 203-217
- De Block et al. (1987) *EMBO J.* 6, 2513-2518
- 15 De Block et al. (1989) *Plant Physiol.* 91: 694
- De Block and Debrouwer (1991) *Theor. Appl. Genet* 82, 257-263
- De Block et al. (1995) *Planta* 197, 619-626
- de Murcia and Ménissier de Murcia (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 172-176.
- Deblaere et al. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 4777-4788
- 20 Depicker et al. (1982) *J. Mol. App. Gen.* 1, 561-573
- Ding et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12804-12812
- Dohmen et al. (1991) *Yeast*, 7, 691-692
- Doonan et al. (1998) en "Plant Cell Division" (Francis, Duditz and Inzé, Eds.) Portland Press, Londres
- Ellis et al. (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, 663-698
- 25 Gallie and Walbot (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 4631-4638
- Gatz et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 85, 1394-1397
- Gavrieli et al. (1992) *J. Cell. Biol.* 119, 493-501
- Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 30 Harpster et al. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 182-190.
- Hawkins and Phillips (1983) *Plant Sci. Lett.* 32, 221-224
- Heller et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11176-11180
- Herrera-Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2, 987
- Hudspeth et al. (1989) *Plant Mol Biol* 12, 579-589
- 35 Hurkman and Tanaka (1986) *Plant Physiol.* 81, 802-806
- Ikajima et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 21907-21913
- Jefferson et al. (1987) *EMBO J.* 6, 3901-3907
- Kameshita et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4770-4776

- Kawamitsu et al. (1984) *Biochemistry*, 23, 3771-3777
- Keil et al. (1989) *EMBO J.* 8, 1323-1330
- Keller et al. (1988) *EMBO J.* 7, 3625-3633
- Keller et al. (1989) *Genes Devel.* 3, 1639-1646
- 5 Kuepper et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18721-18724
- Kuge and Jones (1994) *EMBO J.* 13, 655-664
- Lazebnik et al. (1994) *Nature* 371, 346-347
- Lee et al. (1995) *Plant J.* 8, 603-612
- Lepiniec et al. (1995) *FEBS Letters* 364, 103-108
- 10 Lindahl et al. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 405-411
- Long et al. (1996) *Nature*, 379, 66-69
- Maliga et al. (1975) *Nature*, 255, 401-402
- McBride and Summerfelt (1990) *Plant Mol. Biol.* 14, 269-276
- Ménissier de Murcia et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7303-7307
- 15 Mogen et al. (1990) *The Plant Cell* 2, 1261
- Molinette et al. (1993) *EMBO J.* 12, 2109-2117
- Odell et al. (1985) *Nature* 313, 810
- O' Farrel (1995) *Biochimie* 77, 486-491
- Payne et al. (1976) *Exp. Cell Res.* 99, 428-432
- 20 Peleman et al. (1989) *Gene* 84, 359-369
- Pennell and Lamb (1997) *The Plant Cell* 9, 1157-1168
- Phillips and Hawkins (1985) *J. Exp. Bot.* 36, 119-128
- Puchta et al. (1995) *Plant J.* 7, 203-210
- Sakamoto and Nagatani (1996) *Plant J.* 10, 859-868
- 25 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Schreiber et al. (1992) *EMBO J.* 11, 3263-3269
- Sheen et al. (1995) *The Plant Journal* 8, 777-784
- Shoji et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38, 36-43
- 30 Smulson et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 119-127
- Studier and Moffat (1986) *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Sugiyama et al. (1995) *J. Plant Res.* 108, 351-361
- Terzaghi et al. (1997) *Plant J.* 11, 967-982
- Valvekens et al. (1988) *PNAS* 85, 5536
- 35 von Arnim and Deng (1994) *Cell*, 79, 1035-1045
- Wang et al. (1995) *Genes Dev.* 9, 509-520
- Wang et al. (1996) *Plant Cell* 8, 375-391

Wang et al. (1997) Genes Dev. 11, 2347-2358

Weimann et al. (1994) Plant J. 5, 559-569

Tesis doctoral de Wetering (1994), Katholieke Universiteits Nijmegen

5 Walkerpeach and Velten (1995) En: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds) Plant Molecular Biology Manual pp B1/1-B1/19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Wilbur and Lipmann (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 706

Willmitzer and Wagner (1982) In ADP-Ribosylation Reactions (Hayashi, O. and Ueda, K., eds). New York: Academic Press, pp. 241-252

Zhang et al. (1994) Science, 263, 687-689

10 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Plant Genetic Systems, N.V.

<120> Métodos y medios de modulación de la muerte celular programada en células eucariotas

15 <130> PCDMOD WO1

<140>

<141>

20 <150> US SN 09/118276

<151> 17-07-1998

<160> 21

25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3211

<212> ADN

30 <213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (113)..(3022)

35

<400> 1

ES 2 629 771 T3

```

acctacctga atagtcate cctaagtgtt cgccttctc tgcgtccgg cctccaactc 60
catcgaaggg gctagggaga ggaggaacc cgaaccacag caggccggcg ca atg gcg 118
                                                    Met Ala
                                                    1

gcg ccg cca aag gcg tgg aag gcg gag tat gcc aag tct ggg cgg gcc 166
Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly Arg Ala
           5                10                15

tcg tgc aag tca tgc cgg tcc cct atc gcc aag gac cag ctc cgt ctt 214
Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu Arg Leu
           20                25                30

ggc aag atg gtt cag gcg tca cag ttc gac ggc ttc atg ccg atg tgg 262
Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro Met Trp
           35                40                45                50

aac cat gcc agc gtt gac gat gtt gaa ggg ata gat gca ctt aga tgg 310

```

ES 2 629 771 T3

Asn His Ala Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu Arg Trp	
55	60
gat gat caa gag aag ata cga aac tac gtt ggg agt gcc tca gct ggt	358
Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser Ala Gly	
70	75
80	
aca agt tct aca gct gct cct cct gag aaa tgt aca att gag att gct	406
Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu Ile Ala	
85	90
95	
cca tct gcc cgt act tca tgt aga cga tgc agt gaa aag att aca aaa	454
Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile Thr Lys	
100	105
110	
gga tgg gtc cgt ctt tca gct aag ctt gag agt gaa ggt ccc aag ggt	502
Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro Lys Gly	
115	120
125	130
ata cca tgg tat cat gcc aac tgt ttc ttt gag gta tcc ccg tct gca	550
Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro Ser Ala	
135	140
145	
act gtt gag aag ttc tca ggc tgg gat act ttg tcc gat gag gat aag	598
Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu Asp Lys	
150	155
160	
aga acc atg ctc gat ctt gtt aaa aaa gat gtt ggc aac aat gaa caa	646
Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn Glu Gln	
165	170
175	
aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat agc tac	694
Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp Ser Tyr	
180	185
190	
aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg cga aac	742
Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val Arg Asn	
195	200
205	210
aaa ggg caa ctt gla gac cca cgt ggt tcc aat act agt tca gct gat	790
Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser Ala Asp	
215	220
225	
atc caa cta aag ctt aag gag caa agt gac aca ctt tgg aag tta aag	838
Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys Leu Lys	
230	235
240	
gat gga ctt aag act cat gta tgg gct gct gaa tta agg gat atg ctt	886

ES 2 629 771 T3

Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp Met Leu	
. 245	250 255
gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta ttg gat	934
Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu Leu Asp	
260	265 270
cgc tgt gcg gat gga atg ata ttt gga gcg ctg ggt cct tgc cca gtc	982
Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys Pro Val	
275	280 285 290
tgt gct aat ggc atg tac tat tat aat ggt cag tac caa tgc agt ggt	1030
Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys Ser Gly	
	295 300 305
aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa cct gtc	1078
Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Pro Val	
	310 315 320
cgc gtt aag aag aag tgg caa att cca cat gga aca aag aat gat tac	1126
Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr	
	325 330 335
ctt atg aag tgg ttc aaa tct caa aag gtt aag aaa cca gag agg gtt	1174
Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val	
	340 345 350
ctt cca cca atg tca cct gag aaa tct gga agt aaa gca act cag aga	1222
Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg	
355	360 365 370
aca tca ttg ctg tcl tct aaa ggg tlg gat aaa tta agg ttt tct gtt	1270
Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val	
	375 380 385
gta gga caa tca aaa gaa gca gca aat gag tgg att gag aag ctc aaa	1318
Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys	
	390 395 400
ctt gct ggt gcc aac ttc tat gcc agg gtt gtc aaa gat att gat tgt	1366
Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys	
	405 410 415
tta att gca tgt ggt gag ctc gac aat gaa aat gct gaa gtc agg aaa	1414
Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys	
	420 425 430
gca agg agg ctg aag ata cca att gta agg gag ggt tac att gga gaa	1462

ES 2 629 771 T3

Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Ile	Pro	Ile	Val	Arg	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	
435					440					445						450
tgt	ggt	aaa	aag	aac	aaa	atg	ctg	cca	ttt	gat	ttg	tat	aaa	cta	gag	1510
Cys	Val	Lys	Lys	Asn	Lys	Met	Leu	Pro	Phe	Asp	Leu	Tyr	Lys	Leu	Glu	
				455					460					465		
aat	gcc	tta	gag	tcc	tca	aaa	ggc	agt	act	gtc	act	ggt	aaa	ggt	aag	1558
Asn	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser	Lys	Gly	Ser	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Lys	
				470					475					480		
ggc	cga	agt	gct	ggt	cat	gag	tcc	tct	ggt	ttg	caa	gat	act	gct	cac	1606
Gly	Arg	Ser	Ala	Val	His	Glu	Ser	Ser	Gly	Leu	Gln	Asp	Thr	Ala	His	
				485					490					495		
att	ctt	gaa	gat	ggg	aaa	agc	ata	tac	aat	gca	acc	tta	aac	atg	tct	1654
Ile	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ala	Thr	Leu	Asn	Met	Ser	
				500					505					510		
gac	ctg	gca	cta	ggt	gtg	aac	agc	tac	tat	gta	ctc	cag	atc	att	gaa	1702
Asp	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Val	Leu	Gln	Ile	Ile	Glu	
				515					520					525		530
cag	gat	gat	ggg	tct	gag	tgc	tac	gta	ttt	cgt	aag	tgg	gga	cgg	glt	1750
Gln	Asp	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	Tyr	Val	Phe	Arg	Lys	Trp	Gly	Arg	Val	
				535					540					545		
ggg	agt	gag	aaa	att	gga	ggg	caa	aaa	ctg	gag	gag	atg	tca	aaa	act	1798
Gly	Ser	Glu	Lys	Ile	Gly	Gly	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Met	Ser	Lys	Thr	
				550					555					560		
gag	gca	atc	aag	gaa	ttc	aaa	aga	tta	ttt	ctt	gag	aag	act	gga	aac	1846
Glu	Ala	Ile	Lys	Glu	Phe	Lys	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Lys	Thr	Gly	Asn	
				565					570					575		
tca	tgg	gaa	gct	tgg	gaa	tgt	aaa	acc	aat	ttt	cgg	aag	cag	cct	ggg	1894
Ser	Trp	Glu	Ala	Trp	Glu	Cys	Lys	Thr	Asn	Phe	Arg	Lys	Gln	Pro	Gly	
				580					585					590		
aga	ttt	tac	cca	ctt	gat	ggt	gat	tat	ggt	ggt	aag	aaa	gca	cca	aaa	1942
Arg	Phe	Tyr	Pro	Leu	Asp	Val	Asp	Tyr	Gly	Val	Lys	Lys	Ala	Pro	Lys	
				595					600					605		610
cgg	aaa	gat	atc	agt	gaa	atg	aaa	agt	tct	ctt	gct	cct	caa	ttg	cta	1990
Arg	Lys	Asp	Ile	Ser	Glu	Met	Lys	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Gln	Leu	Leu	
				615					620					625		
gaa	ctc	atg	aag	atg	ctt	ttc	aat	gtg	gag	aca	tat	aga	gct	gct	atg	2038

ES 2 629 771 T3

Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met	
630	635
640	
atg gaa ttt gaa att aat atg tca gaa atg cct ctt ggg aag cta agc	2086
Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser	
645	650
655	
aag gaa aat att gag aaa gga ttt gaa gca tta act gag ata cag aat	2134
Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn	
660	665
670	
tta ttg aag gac acc gct gat caa gca ctg gct gtt aga gaa agc tta	2182
Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu	
675	680
685	690
att gtt gct gcg agc aat cgc ttt ttc act ctt atc cct tct att cat	2230
Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His	
695	700
705	
cct cat att ata cgg gat gag gat gat ttg atg atc aaa gcg aaa atg	2278
Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met	
710	715
720	
ctt gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt ggc ttc	2326
Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe	
725	730
735	
gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tat atg aaa ctt cac	2374
Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His	
740	745
750	
tgt gac atc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tac aag tta att	2422
Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile	
755	760
765	770
gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct act cac aag gac tgg tcg	2470
Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser	
775	780
785	
ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca ctt gat cga gat gga gaa ctt aat	2518
Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn	
790	795
800	
aag tac tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta tta tgg	2566
Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp	
805	810
815	
cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gtg gga att ctt agt caa ggg cta	2614

ES 2 629 771 T3

```

His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu
      820                      825                      830

aga att gca cct cct gag gca cct gtt act ggc tat atg ttc ggc aaa 2662
Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys
835                      840                      845                      850

ggc ctc tac ttt gca gat cta ,gta agc aag agc gca caa tac tgt tat 2710
Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr Cys Tyr
                      855                      860                      865

gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tct gag gtt gct 2758
Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala
                      870                      875                      880

tta gga gac atg tat gaa cta aag aaa gcc acg tcc atg gac aaa cct 2806
Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro
                      885                      890                      895

cca aga ggg aag cat tcg acc aag gga tta ggc aaa acc gtg cca ctg 2854
Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu
      900                      905                      910

gag tca gag ttt gtg aag tgg agg gat gat gtc gta gtt ccc tgc ggc 2902
Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly
915                      920                      925                      930

aag ccg gtg cca tca tca att agg agc tct gaa ctc atg tac aat gag 2950
Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu
                      935                      940                      945

tac atc gtc tac aac aca tcc cag gtg aag atg cag ttc ttg ctg aag 2998
Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys
                      950                      955                      960

gtg cgt ttc cat cac aag agg tag ctgggagact aggcaagtag agttggaagg 3052
Val Arg Phe His His Lys Arg
      965                      970

tagagaagca gagttaggcg atgcctcttt tggattatt agtaagcctg gcatgtat 3112

atgggtgctc gcgcttgatc cattttggta agtggtgctt gggcatcagc gcgaatagca 3172

ccaatcacac acttttacct aatgacgttt tactgtata 3211

```

<210> 2

<211> 969

5

<212> PRT

<213> Zea mays

ES 2 629 771 T3

<400> 2

Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu
 20 25 30

Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro
 35 40 45

Met Trp Asn His Ala Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu
 50 55 60

Arg Trp Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser
 65 70 75 80

Ala Gly Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu
 85 90 95

Ile Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile
 100 105 110

Thr Lys Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro
 115 120 125

Lys Gly Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro
 130 135 140

Ser Ala Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Asp Lys Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn
 165 170 175

Glu Gln Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp
 180 185 190

Ser Tyr Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val
 195 200 205

Arg Asn Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser
 210 215 220

Ala Asp Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys
 225 230 235 240

ES 2 629 771 T3

Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp
 245 250 255
 Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu
 260 265 270
 Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys
 275 280 285
 Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys
 290 295 300
 Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu
 305 310 315 320
 Pro Val Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn
 325 330 335
 Asp Tyr Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu
 340 345 350
 Arg Val Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr
 355 360 365
 Gln Arg Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe
 370 375 380
 Ser Val Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys
 385 390 395 400
 Leu Lys Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile
 405 410 415
 Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val
 420 425 430
 Arg Lys Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile
 435 440 445
 Gly Glu Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys
 450 455 460
 Leu Glu Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys
 465 470 475 480
 Val Lys Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr
 485 490 495

ES 2 629 771 T3

Ala His Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn
500 505 510

Met Ser Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile
515 520 525

Ile Glu Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly
530 535 540

Arg Val Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser
545 550 555 560

Lys Thr Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr
565 570 575

Gly Asn Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln
580 585 590

Pro Gly Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala
595 600 605

Pro Lys Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln
610 615 620

Leu Leu Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala
625 630 635 640

Ala Met Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys
645 650 655

Leu Ser Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile
660 665 670

Gln Asn Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu
675 680 685

Ser Leu Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser
690 695 700

Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala
705 710 715 720

Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val
725 730 735

Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys
740 745 750

ES 2 629 771 T3

Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys
 755 760 765

Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp
 770 775 780

Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu
 785 790 795 800

Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu
 805 810 815

Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln
 820 825 830

Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe
 835 840 845

Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr
 850 855 860

Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu
 865 870 875 880

Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp
 885 890 895

Lys Pro Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val
 900 905 910

Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro
 915 920 925

Cys Gly Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr
 930 935 940

Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu
 945 950 955 960

Leu Lys Val Arg Phe His His Lys Arg
 965

<210> 3

<211> 2295

5

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

ES 2 629 771 T3

<221> CDS

<222> (107)..(2068)

<400> 3

5

```

tgacctgttc catcccgcca gcccttcgc tcccacgacc caaccccact gcccgagacc 60

cccgagcctt ctcgaatctt gcgagaacct cagggcgag gagcag atg tcg gcg      115
                                     Met Ser Ala
                                     1

agg cta cgg gtg gcg gac gtc cgc gcg gag ctt cag cgc cgc ggc etc     163
Arg Leu Arg Val Ala Asp Val Arg Ala Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu
      5              10              15

gat gta tcc ggc acc aag cct gct ctc gtg cgg agg ctg gac gcc gca     211
Asp Val Ser Gly Thr Lys Pro Ala Leu Val Arg Arg Leu Asp Ala Ala
      20              25              30              35

att tgc gag gcg gag aag gcc gtg gtg gct gct gcg cca acc agt gtg     259
Ile Cys Glu Ala Glu Lys Ala Val Val Ala Ala Ala Pro Thr Ser Val
              40              45              50

gca aat ggg tat gac gta gcc gta gat ggc aaa agg aac tgc ggg aat     307
Ala Asn Gly Tyr Asp Val Ala Val Asp Gly Lys Arg Asn Cys Gly Asn
              55              60              65

aat aag agg aaa agg tcc ggg gat ggg ggt gaa gag gga aac ggc gat     355
Asn Lys Arg Lys Arg Ser Gly Asp Gly Gly Glu Glu Gly Asn Gly Asp
              70              75              80

acg tgt aca gat gtg aca aaa cta gag ggc atg agc tat cgt gag ctg     403
Thr Cys Thr Asp Val Thr Lys Leu Glu Gly Met Ser Tyr Arg Glu Leu
      85              90              95

cag gga ttg gcc aag gca cgt gga gtt gcg gca aat ggg ggc aag aaa     451
Gln Gly Leu Ala Lys Ala Arg Gly Val Ala Ala Asn Gly Gly Lys Lys
      100              105              110              115

gat gtt atc cag agg ttg ctc tcg gcg act gct ggt cct gct gca gtt     499
Asp Val Ile Gln Arg Leu Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Ala Ala Val
              120              125              130

gca gat ggt ggt cct ctg ggc gcc aag gaa gtc ata aaa ggt ggt gat     547
Ala Asp Gly Gly Pro Leu Gly Ala Lys Glu Val Ile Lys Gly Gly Asp
              135              140              145

```


ES 2 629 771 T3

gag gag gtt gag gtg aaa aag gag aag atg gtt act gcc acg aag aag	595
Glu Glu Val Glu Val Lys Lys Glu Lys Met Val Thr Ala Thr Lys Lys	
150	155
160	
gga gct gca gtg ctg gat cag cac att ccc gat cac ata aaa gtg aac	643
Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp His Ile Lys Val Asn	
165	170
175	
tat cat gtc ttg caa gtg ggc gat gaa atc tat gat gcc acc ttg aac	691
Tyr His Val Leu Gln Val Gly Asp Glu Ile Tyr Asp Ala Thr Leu Asn	
180	185
190	195
cag act aat gtt gga gac aac aac aat aag ttc tat atc att caa gtt	739
Gln Thr Asn Val Gly Asp Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Val	
200	205
210	
tta gaa tct gat gct ggt gga agc ttt atg gtt tac aat aga tgg gga	787
Leu Glu Ser Asp Ala Gly Gly Ser Phe Met Val Tyr Asn Arg Trp Gly	
215	220
225	
aga gtt ggg gta cga ggt caa gat aaa cta cat ggt ccc tcc cca aca	835
Arg Val Gly Val Arg Gly Gln Asp Lys Leu His Gly Pro Ser Pro Thr	
230	235
240	
cga gac caa gca ata tat gaa ttt gag ggg aag ttc cac aac aaa acc	883
Arg Asp Gln Ala Ile Tyr Glu Phe Glu Gly Lys Phe His Asn Lys Thr	
245	250
255	
aat aat cat tgg tct gat cgc aaq aac ttc aaa tqt tat qca aag aaa	931
Asn Asn His Trp Ser Asp Arg Lys Asn Phe Lys Cys Tyr Ala Lys Lys	
260	265
270	275
tac act tgg ctt gaa atg gat tat ggt gaa act gag aaa gaa ata gag	979
Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys Glu Ile Glu	
280	285
290	
aaa ggt tcc att act gat caq ata aaa gag aca aaa ctt gaa act aga	1027
Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu Glu Thr Arg	
295	300
305	
att gcg cag ttc ata tcc ctg atc tgc aat att agc atg atg aag caa	1075
Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met Met Lys Gln	
310	315
320	
aga atg gtg gaa ata ggt tat aat gct gaa aag ctt ccc ctt gga aag	1123
Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro Leu Gly Lys	
325	330
335	

ES 2 629 771 T3

cta agg aaa gct aca ata ctt aag ggt tat cat gtt ttg aaa agg ata 1171
 Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu Lys Arg Ile
 340 345 350 355

tcc gat gtt att tca aag gcg gac agg aga cat ctt gag caa ttg act 1219
 Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu Gln Leu Thr
 360 365 370

ggg gaa ttc tac acc gtg att cct cat gac ttt ggt ttc aga aag atg 1267
 Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe Arg Lys Met
 375 380 385

cgt gaa ttt att atc gat act cct cag aaa cta aaa gct aag ctg gag 1315
 Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala Lys Leu Glu
 390 395 400

atg gtt gaa gcc ctt ggt gag att gaa att gca act aaa ctt ttg gag 1363
 Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys Leu Leu Glu
 405 410 415

gat gat tca agt gac cag gat gat ccg ttg tat gct cga tac aag caa 1411
 Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg Tyr Lys Gln
 420 425 430 435

ctt cat tgt gat ttc aca cct ctt gaa gct gat tca gat gag tac tct 1459
 Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp Glu Tyr Ser
 440 445 450

atg ata aaa tca tat ttg aga aat aca cat gga aaa aca cac tct ggt 1507
 Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr His Ser Gly
 455 460 465

tat acg gtg gac ata gtg caa ata ttt aag gtt tca agg cat ggt gaa 1555
 Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg His Gly Glu
 470 475 480

aca gag cga ttt caa aaa ttt gct agt aca aga aat agg atg ctt ttg 1603
 Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg Met Leu Leu
 485 490 495

tgg cat ggt tct cgg ttg agc aac tgg gct ggg atc ctt tct cag ggt 1651
 Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu Ser Gln Gly
 500 505 510 515

ctg cga atc gct cct cct gaa gca cct gtt act ggt tac atg ttt ggc 1699
 Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly
 520 525 530

ES 2 629 771 T3

aag ggt gtt tac ttt gct gac atg ttt tca aag agt gca aac tat tgc 1747
 Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys
 535 540 545

tac gcc tct gaa gca tgt aga tct gga gta ctg ctt tta tgt gag gtt 1795
 Tyr Ala Ser Glu Ala Cys Arg Ser Gly Val Leu Leu Leu Cys Glu Val
 550 555 560

gca ttg ggc gat atg aat gag cta ctg aat gca gat tac gat gct aat 1843
 Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Asn Ala Asp Tyr Asp Ala Asn
 565 570 575

aac ctg ccc aaa gga aaa tta aga tcc aag gga gtt ggt caa aca gca 1891
 Asn Leu Pro Lys Gly Lys Leu Arg Ser Lys Gly Val Gly Gln Thr Ala
 580 585 590 595

cct aac atg gtc gag tct aag gtc gct gac gat ggt gtt gtt gtt ccc 1939
 Pro Asn Met Val Glu Ser Lys Val Ala Asp Asp Gly Val Val Val Pro
 600 605 610

ctt ggc gaa ccc aaa cag gaa cct tcc aaa agg ggt ggc ttg ctt tat 1987
 Leu Gly Glu Pro Lys Gln Glu Pro Ser Lys Arg Gly Gly Leu Leu Tyr
 615 620 625

aat gag tac ata gtg tac aac gta gac cag ata aga atg cgg tat gtc 2035
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Asp Gln Ile Arg Met Arg Tyr Val
 630 635 640

tta cat gtt aac ttc aat ttc aag aga cgg tag atgttgcaaa gagctgaaac 2088
 Leu His Val Asn Phe Asn Phe Lys Arg Arg
 645 650

tgttgctgag atcttagcag aacatatgtg gacttatagc accaggtgcc ctcagcctca 2148

ttttctgagc aaatttgga gcctttgcat ttcgattttg gtttcagett ctagecccat 2208

tgatgattga tactgagtgt atatatgaac cattgatatc caccttccat gtacttaagt 2268

ttttttaaca tgtcccatgc ataataa 2295

<210> 4

<211> 653

5 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 4

ES 2 629 771 T3

Met Ser Ala Arg Leu Arg Val Ala Asp Val Arg Ala Glu Leu Gln Arg
1 5 10 15
Arg Gly Leu Asp Val Ser Gly Thr Lys Pro Ala Leu Val Arg Arg Leu
20 25 30
Asp Ala Ala Ile Cys Glu Ala Glu Lys Ala Val Val Ala Ala Ala Pro
35 40 45
Thr Ser Val Ala Asn Gly Tyr Asp Val Ala Val Asp Gly Lys Arg Asn
50 55 60
Cys Gly Asn Asn Lys Arg Lys Arg Ser Gly Asp Gly Gly Glu Glu Gly
65 70 75 80
Asn Gly Asp Thr Cys Thr Asp Val Thr Lys Leu Glu Gly Met Ser Tyr
85 90 95
Arg Glu Leu Gln Gly Leu Ala Lys Ala Arg Gly Val Ala Ala Asn Gly
100 105 110
Gly Lys Lys Asp Val Ile Gln Arg Leu Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro
115 120 125
Ala Ala Val Ala Asp Gly Gly Pro Leu Gly Ala Lys Glu Val Ile Lys
130 135 140
Gly Gly Asp Glu Glu Val Glu Val Lys Lys Glu Lys Met Val Thr Ala
145 150 155 160
Thr Lys Lys Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp His Ile
165 170 175
Lys Val Asn Tyr His Val Leu Gln Val Gly Asp Glu Ile Tyr Asp Ala
180 185 190
Thr Leu Asn Gln Thr Asn Val Gly Asp Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile
195 200 205
Ile Gln Val Leu Glu Ser Asp Ala Gly Gly Ser Phe Met Val Tyr Asn
210 215 220
Arg Trp Gly Arg Val Gly Val Arg Gly Gln Asp Lys Leu His Gly Pro
225 230 235 240
Ser Pro Thr Arg Asp Gln Ala Ile Tyr Glu Phe Glu Gly Lys Phe His
245 250 255
Asn Lys Thr Asn Asn His Trp Ser Asp Arg Lys Asn Phe Lys Cys Tyr

ES 2 629 771 T3

260	265	270
Ala Lys Lys Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys 275	280	285
Glu Ile Glu Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu 290	295	300
Glu Thr Arg Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met 305	310	315 320
Met Lys Gln Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro 325	330	335
Leu Gly Lys Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu 340	345	350
Lys Arg Ile Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu 355	360	365
Gln Leu Thr Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe 370	375	380
Arg Lys Met Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala 385	390	395 400
Lys Leu Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys 405	410	415
Leu Leu Glu Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg 420	425	430
Tyr Lys Gln Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp 435	440	445
Glu Tyr Ser Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr 450	455	460
His Ser Gly Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg 465	470	475 480
His Gly Glu Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg 485	490	495
Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu 500	505	510
Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr		

ES 2 629 771 T3

	515		520		525														
Met	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Phe	Ser	Lys	Ser	Ala				
	530					535					540								
Asn	Tyr	Cys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Arg	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	Leu				
545					550					555					560				
Cys	Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Asp	Met	Asn	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Asp	Tyr				
				565					570					575					
Asp	Ala	Asn	Asn	Leu	Pro	Lys	Gly	Lys	Leu	Arg	Ser	Lys	Gly	Val	Gly				
			580					585						590					
Gln	Thr	Ala	Pro	Asn	Met	Val	Glu	Ser	Lys	Val	Ala	Asp	Asp	Gly	Val				
		595					600							605					
Val	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Ser	Lys	Arg	Gly	Gly				
	610					615					620								
Leu	Leu	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Ile	Val	Tyr	Asn	Val	Asp	Gln	Ile	Arg	Met				
625					630					635					640				
Arg	Tyr	Val	Leu	His	Val	Asn	Phe	Asn	Phe	Lys	Arg	Arg							
				645						650									

<210> 5

<211> 2147

5

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

10

<222> (129) .. (2042)

<400> 5

ES 2 629 771 T3

```
attgatgaag aagaaaacga agaagaagac ttttcaaatg ctgcgcgaa ctcaattctg 60
acgaaaacca tacttctca gtctcattcc ctttccgacg aactattctc ctgaagaaga 120
agacgaaa atg gcg aac aag ctc aaa gtc gac gaa ctc cgt tta aaa ctc 170
      Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu
           1             5             10
gcc gag cgt gga ctc agt act act gga gtc aaa gcc gtt ctg gtg gag 218
Ala Glu Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu
15             20             25             30
```

ES 2 629 771 T3

agg ctt gaa gag gct atc gca gaa gac act aag aag gaa gaa tca aag 266
Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys
35 40 45

agc aag agg aaa aga aat tct tct aat gat act tat gaa tcg aac aaa 314
Ser Lys Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys
50 55 60

ttg att gca att ggc gaa ttt cgt ggg atg att gtg aag gaa ttg cgt 362
Leu Ile Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg
65 70 75

gag gaa gct att aag aga ggc tta gat aca aca gga acc aaa aag gat 410
Glu Glu Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp
80 85 90

ctt ctt gag agg ctt tgc aat gat gct aat aac gtt tcc aat gca cca 458
Leu Leu Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro
95 100 105 110

gtc aaa tcc agt aat ggg aca gat gaa gct gaa gat gac aac aat ggc 506
Val Lys Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly
115 120 125

ttt gaa gaa gaa aag aaa gaa gag aaa atc gta acc gcg aca aag aag 554
Phe Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys
130 135 140

ggt gca gcg gtg cta gat cag tgg att cct gat gag ata aag agt cag 602
Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln
145 150 155

tac cat gtt cta caa agg ggt gat gat gtt tat gat gct atc tta aat 650
Tyr His Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn
160 165 170

cag aca aat gtc agg gat aat aat aac aag ttc ttt ctc cta caa gtc 698
Gln Thr Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val
175 180 185 190

cta gag tcg gat agt aaa aag aca tac atg gtt tac act aga tgg gga 746
Leu Glu Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly
195 200 205

aga gtt ggt gtg aaa gga caa agt aag cta gat ggg cct tat gac tca 794
Arg Val Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser
210 215 220

ES 2 629 771 T3

tgg gat cgt gcg ata gag ata ttt acc aat aag ttc aat gac aag aca	842
Trp Asp Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr	
225 230 235	
aag aat tat tgg tct gac aga aag gag ttt atc cca cat ccc aag tcc	890
Lys Asn Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser	
240 245 250	
tat aca tgg ctc gaa atg gat tac gga aaa gag gaa aat gat tca ccg	938
Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro	
255 260 265 270	
gtc aat aat gat att ccg agt tca tct tcc gaa gtt aaa cct gaa caa	986
Val Asn Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln	
275 280 285	
tca aaa cta gat act cgg gtt gcc aag ttc atc tct ctt ata tgt aat	1034
Ser Lys Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn	
290 295 300	
gtc agc atg atg gca cag cat atg atg gaa ata gga tat aac gct aac	1082
Val Ser Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn	
305 310 315	
aaa ttg cca ctc ggc aag ata agc aag tcc aca att tca aag ggt tat	1130
Lys Leu Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr	
320 325 330	
gaa gtg ctg aag aga ata tcg qaq qtg att gac cgg tat gat aga acg	1178
Glu Val Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr	
335 340 345 350	
agg ctt gag gaa ctg agt gga gag ttc tac aca gtg ata cct cat gat	1226
Arg Leu Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp	
355 360 365	
ttt ggt ttt aag aaa atg agt cag ttt gtt ata gac act cct caa aag	1274
Phe Gly Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys	
370 375 380	
ttg aaa cag aaa att gaa atg gtt gaa gca tta ggt gaa att gaa ctc	1322
Leu Lys Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu	
385 390 395	
gca aca aag ttg ttg tcc gtc gac ccg gga ttg cag gat gat cct tta	1370
Ala Thr Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu	
400 405 410	

ES 2 629 771 T3

tat tat cac tac cag caa ctt aat tgt ggt ttg acg cca gta gga aat	1418
Tyr Tyr His Tyr Gln Gln Leu Asn Cys Gly Leu Thr Pro Val Gly Asn	
415	420 425 430
gat tca gag gag ttc tct atg gtt gct aat tac atg gag aac act cat	1466
Asp Ser Glu Glu Phe Ser Met Val Ala Asn Tyr Met Glu Asn Thr His	
435	440 445
gca aag acg cal tcg gga tat acg gtt gag att gcc caa cta ttt aga	1514
Ala Lys Thr His Ser Gly Tyr Thr Val Glu Ile Ala Gln Leu Phe Arg	
450	455 460
gct tcg aga gct gtt gaa gct gat cga ttc caa cag ttt tca agt tcg	1562
Ala Ser Arg Ala Val Glu Ala Asp Arg Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser	
465	470 475
aag aac agg atg cta ctc tgg cac ggt tca cgt ctc act aac tgg gct	1610
Lys Asn Arg Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Trp Ala	
480	485 490
ggt att tta tct caa ggt ctg cga ata gct cct cct gaa gcg cct gta	1658
Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val	
495	500 505 510
act ggt tac atg ttt gga aaa ggg gtt tac ttt gcg gat atg ttc tcc	1706
Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser	
515	520 525
aag agt gcg aac tat tgc tat gcc aac act ggc gct aat gat ggc gtt	1754
Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Tyr Ala Asn Thr Gly Ala Asn Asp Gly Val	
530	535 540
ctg ctc ctc tgc gag gtt gct ttg gga gac atg aat gaa ctt ctg tat	1802
Leu Leu Leu Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Tyr	
545	550 555
tca gat tat aac gcg gat aat cta ccc ccg gga aaq cta aqc aca aaa	1850
Ser Asp Tyr Asn Ala Asp Asn Leu Pro Pro Gly Lys Leu Ser Thr Lys	
560	565 570
ggt gtg ggg aaa aca gca cca aac cca tca gag gct caa aca cta gaa	1898
Gly Val Gly Lys Thr Ala Pro Asn Pro Ser Glu Ala Gln Thr Leu Glu	
575	580 585 590
gac ggt gtt gtt gtt cca ctt ggc aaa cca gtg gaa cgt tca tgc tcc	1946
Asp Gly Val Val Val Pro Leu Gly Lys Pro Val Glu Arg Ser Cys Ser	
595	600 605

ES 2 629 771 T3

aag ggg atg ttg ttg tac aac gaa tat ata gtc tac aat gtg gaa caa 1994
 Lys Gly Met Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Glu Gln
 610 615 620

atc aag atg cgt tat gtg atc caa gtc aaa ttc aac tac aag cac taa 2042
 Ile Lys Met Arg Tyr Val Ile Gln Val Lys Phe Asn Tyr Lys His
 625 630 635

aacttatgta tattagcttt tgaacatcaa ctaattatcc aaaaatcagc gttttattgt 2102

atctctttca aactccttca tctctgattt tgcacggttc actcg 2147

<210> 6

<211> 637

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu Arg Leu
 20 25 30

Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys Ser Lys
 35 40 45

Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys Leu Ile
 50 55 60

Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp Leu Leu
 85 90 95

Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro Val Lys
 100 105 110

Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly Phe Glu
 115 120 125

Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys Gly Ala
 130 135 140

Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln Tyr His

10

ES 2 629 771 T3

145	150	155	160
Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr			
	165	170	175
Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu			
	180	185	190
Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val			
	195	200	205
Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp			
	210	215	220
Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn			
225	230	235	240
Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr			
	245	250	255
Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn			
	260	265	270
Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys			
	275	280	285
Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser			
290	295	300	
Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu			
305	310	315	320
Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr Glu Val			
	325	330	335
Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr Arg Leu			
	340	345	350
Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly			
	355	360	365
Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys			
	370	375	380
Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu Ala Thr			
385	390	395	400
Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Tyr			

ES 2 629 771 T3

405	410	415
His Tyr Gln Gln Leu Asn Cys Gly Leu Thr Pro Val Gly Asn Asp Ser		
420	425	430
Glu Glu Phe Ser Met Val Ala Asn Tyr Met Glu Asn Thr His Ala Lys		
435	440	445
Thr His Ser Gly Tyr Thr Val Glu Ile Ala Gln Leu Phe Arg Ala Ser		
450	455	460
Arg Ala Val Glu Ala Asp Arg Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser Lys Asn		
465	470	480
Arg Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Trp Ala Gly Ile		
485	490	495
Ieu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly		
500	505	510
Tyr Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser		
515	520	525
Ala Asn Tyr Cys Tyr Ala Asn Thr Gly Ala Asn Asp Gly Val Leu Leu		
530	535	540
Leu Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Tyr Ser Asp		
545	550	560
Tyr Asn Ala Asp Asn Leu Pro Pro Gly Lys Leu Ser Thr Lys Gly Val		
565	570	575
Gly Lys Thr Ala Pro Asn Pro Ser Glu Ala Gln Thr Leu Glu Asp Gly		
580	585	590
Val Val Val Pro Leu Gly Lys Pro Val Glu Arg Ser Cys Ser Lys Gly		
595	600	605
Met Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Glu Gln Ile Lys		
610	615	620
Met Arg Tyr Val Ile Gln Val Lys Phe Asn Tyr Lys His		
625	630	635

<210> 7

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio A de proteínas PARP no convencionales

5 <400> 7

Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 8

10 <211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio A1 de proteína PARP no convencional

<400> 8

Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gly Val Lys Xaa Xaa Leu Val Xaa Arg Leu Xaa Xaa Ala
 20 25 30

20 Ile

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Dominio A2 de proteína PARP no convencional

30

<400> 9

ES 2 629 771 T3

Gly Met Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Gly Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Lys Lys Asp Xaa Xaa Arg Leu Xaa Xaa
20 25 30

<210> 10

<211> 3212

5 <212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

10 <222> (81)..(3020)

<400> 10

ES 2 629 771 T3

```

gcttcctctg tcgtccggcc tccaactcca tcgaaggggc tagggagagg agggaaccgc 60
aaccacagca ggccggcgca atg gcg gcg ccg cca aag gcg tgg aag gcg gag 113
      Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu
                1             5             10

tat gcc aag tct ggg cgg gcc tcg tgc aag tca tgc cgg tcc cct atc 161
Tyr Ala Lys Ser Gly Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile
                15             20             25

gcc aag gac cag ctc cgt ctt ggc aag atg gtt cag gcg tca cag ttc 209
Ala Lys Asp Gln Leu Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe
                30             35             40

gac ggc ttc atg ccg atg tgg aac cat gcc agg tgc atc ttc agc aag 257
Asp Gly Phe Met Pro Met Trp Asn His Ala Arg Cys Ile Phe Ser Lys
                45             50             55

aag aac cag ata aaa tcc gtt gac gat gtt gaa ggg ata gat gca ctt 305
Lys Asn Gln Ile Lys Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu
                60             65             70             75

aga tgg gat gat caa gag aag ata cga aac tac gtt ggg agt gcc tca 353
Arg Trp Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser
                80             85             90

gct ggt aca agt tct aca gct gct cct cct gag aaa tgt aca att gag 401
Ala Gly Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu
                95             100            105

att gct cca tct gcc cgt act tca tgt aga cga tgc agt gaa aag att 449
Ile Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile
                110            115            120

aca aaa gga tcg gtc cgt ctt tca gct aag ctt gag agt gaa ggt ccc 497
Thr Lys Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro
                125            130            135

```


ES 2 629 771 T3

```

aag ggt ata cca tgg tat cat gcc aac tgt ttc ttt gag gta tcc ccg 545
Lys Gly Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro
140                145                150                155

tct gca act gtt gag aag ttc tca ggc tgg gat act ttg tcc gat gag 593
Ser Ala Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu
                160                165                170

gat aag aga acc atg ctc gat ctt gtt aaa aaa gal gtt ggc aac aat 641
Asp Lys Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn
                175                180                185

gaa caa aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat 689
Glu Gln Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp
                190                195                200

agc tac aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg 737
Ser Tyr Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val
                205                210                215

cga aac aaa ggg caa ctt qta gac cca cgt ggt tcc aat act agt tca 785
Arg Asn Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser
220                225                230                235

gct gat atc caa cta aag ctt aag gag caa agt gac aca ctt tgg aag 833
Ala Asp Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys
                240                245                250

tta aag gat qga ctt aag act cat qta tcg gct gct gaa tta aqg gat 881
Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp
                255                260                265

atg ctt gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta 929
Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu
                270                275                280

ttg gat cgc tgt gcg gat gga atg ata ttt gga qcg ctg ggt cct tgc 977
Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys
                285                290                295

cca gtc tgt gct aat ggc atg tac tat tat aat ggt cag tac caa tgc 1025
Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys
300                305                310                315

agt ggt aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa 1073
Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu
                320                325                330

```

ES 2 629 771 T3

cct gtc cgc gtt aag aag aag tgg caa att cca cat gga aca aag aat 1121
Pro Val Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn
335 340 345

gat tac ctt atg aag tgg ttc aaa tct caa aag gtt aag aaa cca gag 1169
Asp Tyr Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu
350 355 360

agg gtt ctt cca cca atg tca cct gag aaa tct gga agt aaa gca act 1217
Arg Val Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr
365 370 375

cag aga aca tca ttg ctg tct tct aaa ggg ttg gat aaa tta agg ttt 1265
Gln Arg Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe
380 385 390 395

tct gtt gta gga caa tca aaa gaa gca gca aat gag tgg att gag aag 1313
Ser Val Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys
400 405 410

ctc aaa ctt gct ggt gcc aac ttc tat gcc agg gtt gtc aaa gat att 1361
Leu Lys Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile
415 420 425

gat tqt tta att qca tqt qgt qag ctc gac aat qaa aat gct qaa qtc 1409
Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val
430 435 440

agg aaa gca agg agg ctg aag ata cca att gta agg gag ggt tac att 1457
Arg Lys Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile
445 450 455

gga gaa tgt gtt aaa aag aac aaa atg ctg cca ttt gat ttg tat aaa 1505
Gly Glu Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys
460 465 470 475

cta gag aat gcc tta gag tcc tca aaa ggc agt act gtc act gtt aaa 1553
Leu Glu Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys
480 485 490

gtc aag ggc cga agt gct gtt cat gag tcc tct ggt ttg caa gat act 1601
Val Lys Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr
495 500 505

gct cac att ctt gaa gat ggg aaa agc ata tac aat gca acc tta aac 1649
Ala His Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn
510 515 520

ES 2 629 771 T3

atg tct gac ctg gca cta ggt gtg aac agc tac tat gta ctc cag atc 1697
Met Ser Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile
525 530 535

att gaa cag gat gat ggg tct gag tgc tac gta ttt cgt aag tgg gga 1745
Ile Glu Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly
540 545 550 555

cgg gtt ggg agt gag aaa att gga ggg caa aaa ctg gag gag atg tca 1793
Arg Val Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser
560 565 570

aaa act gag gca atc aag gaa ttc aaa aga tta ttt ctt gag aag act 1841
Lys Thr Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr
575 580 585

gga aac tca tgg gaa gct tgg gaa tgt aaa acc aat ttt cgg aag cag 1889
Gly Asn Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln
590 595 600

cct ggg aga ttt tac cca ctt gat gtt gat tat ggt gtt aag aaa gca 1937
Pro Gly Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala
605 610 615

cca aaa cgg aaa gat atc agt gaa atg aaa agt tct ctt gct cct caa 1985
Pro Lys Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln
620 625 630 635

ttg cta gaa ctc atg aag atg ctt ttc aat gtg gag aca tat aga gct 2033
Leu Leu Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala
640 645 650

gct atg atg gaa ttt gaa att aat atg tca gaa atg cct ctt ggg aag 2081
Ala Met Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys
655 660 665

cta agc aag gaa aat att gag aaa gga ttt gaa gca tta act gag ata 2129
Leu Ser Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile
670 675 680

cag aat tta ttg aag gac acc gct gat caa gca ctg gct gtt aga gaa 2177
Gln Asn Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu
685 690 695

agc tta att gtt gct gcg agc aat cgc ttt ttc act ctt atc cct tct 2225
Ser Leu Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser
700 705 710 715

ES 2 629 771 T3

att cat cct cat att ata cgg gat gag gat gat ttg atg atc aaa gcg	2273
Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala	
720 725 730	
aaa atg ctt gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt	2321
Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val	
735 740 745	
ggc ttc gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tat atg aaa	2369
Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys	
750 755 760	
ctt cac tgt gac atc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tac aag	2417
Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys	
765 770 775	
tta att gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct act cac aag gac	2465
Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp	
780 785 790 795	
tgg tcg ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca ctt gat cga gat gga gaa	2513
Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu	
800 805 810	
ctt aat aag tac tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta	2561
Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu	
815 820 825	
tta tgg cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gtg gga att ctt act caa	2609
Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln	
830 835 840	
ggg cta aga att gca cct cct gag gca cct gtt act ggc tat atg ttc	2657
Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe	
845 850 855	
ggc aaa ggc ctc tac ttt gca gat cta gta agc aag agc gca caa tac	2705
Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr	
860 865 870 875	
tgt tat gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tct gag	2753
Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu	
880 885 890	
gtt gct tta gga gac atg tat gaa cta aag aaa gcc acg tcc atg gac	2801
Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp	
895 900 905	

ES 2 629 771 T3

aaa cct cca aga ggg aag cat tcg acc aag gga tta ggc aaa acc gtg 2849
 Lys Pro Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val
 910 915 920

cca ctg gag tca gag ttt gtg aag tgg agg gat gat gtc gta gtt ccc 2897
 Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro
 925 930 935

tgc ggc aag ccg gtg cca tca tca att agg agc tct gaa ctc atg tac 2945
 Cys Gly Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr
 940 945 950 955

aat gag tac atc gtc tac aac aca tcc cag gtg aag atg cag ttc ttg 2993
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu
 960 965 970

ctg aag gtg cgt ttc cat cac aag agg tagctgggag actaggcaag 3040
 Leu Lys Val Arg Phe His His Lys Arg
 975 980

tagagtggga aggtagagaa gcagagttag gcgatgcctc ttttggtatt attagtaagc 3100

ctggcatgta tttatgggtg ctgcgcttg atccattttg gtaagtgttg cttgggcac 3160

agcgcgaata gcaccaatca cacactttta cctaagcag ttttactgta ta 3212

<210> 11

<211> 980

5

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 11

Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu
 20 25 30

Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro
 35 40 45

Met Trp Asn His Ala Arg Cys Ile Phe Ser Lys Lys Asn Gln Ile Lys
 50 55 60

Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu Arg Trp Asp Asp Gln
 65 70 75 80

10

ES 2 629 771 T3

Glu	Lys	Ile	Arg	Asn	Tyr	Val	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Glu	Lys	Cys	Thr	Ile	Glu	Ile	Ala	Pro	Ser	Ala
			100					105					110		
Arg	Thr	Ser	Cys	Arg	Arg	Cys	Ser	Glu	Lys	Ile	Thr	Lys	Gly	Ser	Val
		115					120						125		
Arg	Leu	Ser	Ala	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Gly	Pro	Lys	Gly	Ile	Pro	Trp
	130					135					140				
Tyr	His	Ala	Asn	Cys	Phe	Phe	Glu	Val	Ser	Pro	Ser	Ala	Thr	Val	Glu
145					150					155					160
Lys	Phe	Ser	Gly	Trp	Asp	Thr	Leu	Ser	Asp	Glu	Asp	Lys	Arg	Thr	Met
				165					170					175	
Leu	Asp	Leu	Val	Lys	Lys	Asp	Val	Gly	Asn	Asn	Glu	Gln	Asn	Lys	Gly
			180					185						190	
Ser	Lys	Arg	Lys	Lys	Ser	Glu	Asn	Asp	Ile	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Ala
		195					200					205			
Arg	Leu	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Thr	Val	Arg	Asn	Lys	Gly	Gln
		210					215					220			
Leu	Val	Asp	Pro	Arg	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Ser	Ala	Asp	Ile	Gln	Leu
225					230						235				240
Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Ser	Asp	Thr	Leu	Trp	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Leu
				245					250					255	
Lys	Thr	His	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	Asp	Met	Leu	Glu	Ala	Asn
			260					265					270		
Gly	Gln	Asp	Thr	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	His	Leu	Leu	Asp	Arg	Cys	Ala
		275					280					285			
Asp	Gly	Met	Ile	Phe	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro	Cys	Pro	Val	Cys	Ala	Asn
	290					295					300				
Gly	Met	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Ser	Gly	Asn	Val	Ser
305					310					315					320
Glu	Trp	Ser	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Glu	Pro	Val	Arg	Val	Lys
				325					330					335	

ES 2 629 771 T3

Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr Leu Met Lys
 340 345 350

Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val Leu Pro Pro
 355 360 365

Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg Thr Ser Leu
 370 375 380

Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val Val Gly Gln
 385 390 395 400

Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys Leu Ala Gly
 405 410 415

Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys Leu Ile Ala
 420 425 430

Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys Ala Arg Arg
 435 440 445

Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile Gly Glu Cys Val Lys
 450 455 460

Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys Leu Glu Asn Ala Leu
 465 470 475 480

Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys Val Lys Gly Arg Ser
 485 490 495

Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr Ala His Ile Leu Glu
 500 505 510

Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn Met Ser Asp Leu Ala
 515 520 525

Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile Ile Glu Gln Asp Asp
 530 535 540

Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly Arg Val Gly Ser Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser Lys Thr Glu Ala Ile
 565 570 575

Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr Gly Asn Ser Trp Glu
 580 585 590

ES 2 629 771 T3

Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln Pro Gly Arg Phe Tyr
 595 600 605

Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala Pro Lys Arg Lys Asp
 610 615 620

Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln Leu Leu Glu Leu Met
 625 630 635 640

Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Glu Phe
 645 650 655

Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Glu Asn
 660 665 670

Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn Leu Leu Lys
 675 680 685

Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu Ile Val Ala
 690 695 700

Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His Pro His Ile
 705 710 715 720

Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met Leu Glu Ala
 725 730 735

Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe Asp Ser Asp
 740 745 750

Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His Cys Asp Ile
 755 760 765

Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Gln Tyr
 770 775 780

Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser Leu Glu Leu
 785 790 795 800

Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn Lys Tyr Ser
 805 810 815

Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp His Gly Ser
 820 825 830

Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala
 835 840 845

ES 2 629 771 T3

```

Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Leu Tyr
   850                               855                               860

Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr Cys Tyr Val Asp Arg
865                               870                               875                               880

Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly Asp
                               885                               890                               895

Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro Pro Arg Gly
                               900                               905                               910

Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu Glu Ser Glu
                               915                               920                               925

Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly Lys Pro Val
   930                               935                               940

Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu Tyr Ile Val
945                               950                               955                               960

Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys Val Arg Phe
                               965                               970                               975

His His Lys Arg
                               980

```

<210> 12

<211> 1010

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia artificial: Proteína de fusión entre el dominio del extremo N de APP y la proteína GUS

<400> 12

ES 2 629 771 T3

Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu Ala Glu
1 5 10 15
Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu Arg Leu
 20 25 30
Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys Ser Lys
 35 40 45
Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys Leu Ile

ES 2 629 771 T3

50	55	60
Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg Glu Glu		
65	70	75
Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp Leu Leu		
	85	90
		95
Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro Val Lys		
	100	105
		110
Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly Phe Glu		
115	120	125
Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys Gly Ala		
130	135	140
Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln Tyr His		
145	150	155
		160
Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr		
	165	170
		175
Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu		
	180	185
		190
Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val		
195	200	205
Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp		
210	215	220
Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn		
225	230	235
		240
Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr		
	245	250
		255
Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn		
	260	265
		270
Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys		
275	280	285
Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser		
290	295	300
Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu		

ES 2 629 771 T3

305		310		315		320									
Pro	Leu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Ser	Thr	Ile	Ser	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val
			325						330					335	
Leu	Lys	Arg	Ile	Ser	Glu	Val	Ile	Asp	Arg	Tyr	Asp	Arg	Thr	Arg	Leu
			340					345					350		
Glu	Glu	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asp	Phe	Gly
		355					360						365		
Phe	Lys	Lys	Met	Ser	Gln	Phe	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Gln	Lys	Leu	Lys
	370					375						380			
Gln	Lys	Ile	Glu	Met	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Ala	Thr
385					390					395					400
Lys	Leu	Leu	Ser	Val	Asp	Pro	Met	Val	Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr
				405					410						415
Arg	Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Asp	Gly	Leu	Trp	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Arg
			420						425					430	
Glu	Asn	Cys	Gly	Ile	Asp	Gln	Arg	Trp	Trp	Glu	Ser	Ala	Leu	Gln	Glu
		435					440						445		
Ser	Arg	Ala	Ile	Ala	Val	Pro	Gly	Ser	Phe	Asn	Asp	Gln	Phe	Ala	Asp
	450						455						460		
Ala	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Ala	Gly	Asn	Val	Trp	Tyr	Gln	Arg	Glu	Val
465					470					475					480
Phe	Ile	Pro	Lys	Gly	Trp	Ala	Gly	Gln	Arg	Ile	Val	Leu	Arg	Phe	Asp
				485					490						495
Ala	Val	Thr	His	Tyr	Gly	Lys	Val	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Glu	Val	Met
				500					505					510	
Glu	His	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Pro	Phe	Glu	Ala	Asp	Val	Thr	Pro	Tyr
			515						520					525	
Val	Ile	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Thr	Val	Cys	Val	Asn	Asn	Glu
		530					535							540	
Leu	Asn	Trp	Gln	Thr	Ile	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Ile	Thr	Asp	Glu	Asn
545					550						555				560
Gly	Lys	Lys	Lys	Gln	Ser	Tyr	Phe	His	Asp	Phe	Phe	Asn	Tyr	Ala	Gly

ES 2 629 771 T3

565	570	575
Ile His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp		
580	585	590
Asp Ile Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser		
595	600	605
Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg		
610	615	620
Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr		
625	630	635
Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu		
645	650	655
Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr		
660	665	670
Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe		
675	680	685
Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu		
690	695	700
Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu Met Val His		
705	710	715
Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser		
725	730	735
His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly		
740	745	750
Ile Val Val Ile Asp Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu		
755	760	765
Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu		
770	775	780
Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln Ala Ile Lys		
785	790	795
Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser		
805	810	815
Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe		

ES 2 629 771 T3

		820						825					830		
Ala	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Asp	Pro	Thr	Arg	Pro	Ile
		835						840					845		
Thr	Cys	Val	Asn	Val	Met	Phe	Cys	Asp	Ala	His	Thr	Asp	Thr	Ile	Ser
		850					855						860		
Asp	Leu	Phe	Asp	Val	Leu	Cys	Leu	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Tyr	Val
865					870					875					880
Gln	Ser	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Leu
				885					890					895	
Leu	Ala	Trp	Gln	Glu	Lys	Leu	His	Gln	Pro	Ile	Ile	Ile	Thr	Glu	Tyr
			900					905						910	
Gly	Val	Asp	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	His	Ser	Met	Tyr	Thr	Asp	Met	Trp
			915				920							925	
Ser	Glu	Glu	Tyr	Gln	Cys	Ala	Trp	Leu	Asp	Met	Tyr	His	Arg	Val	Phe
		930				935								940	
Asp	Arg	Val	Ser	Ala	Val	Val	Gly	Glu	Gln	Val	Trp	Asn	Phe	Ala	Asp
945					950						955				960
Phe	Ala	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Gly
				965						970				975	
Ile	Phe	Thr	Arg	Asp	Arg	Lys	Pro	Lys	Ser	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Gln
			980					985						990	
Lys	Arg	Trp	Thr	Gly	Met	Asn	Phe	Gly	Glu	Lys	Pro	Gln	Gln	Gly	Gly
		995					1000							1005	
Lys	Gln														
		1010													

<210> 13

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR degenerado

ES 2 629 771 T3

<400> 13
ccgaattcgg ntayatgty ggnaa 25

5
<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Cebador de PCR degenerado

<400> 14
ccgaattcac natrtaytcr ttrta 25

15
<210> 15
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido para su uso como cebador de PCR

<400> 15
gggaccatgt agtttatctt gacct 25

25
<210> 16
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido para su uso en PCR

<400> 16
gacctcgtag cccaactctt ccccat 26

35
<210> 17
<211> 36

ES 2 629 771 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido para su uso en PCR

<400> 17

aagtcgacgc ggccgccaca cctagtgcca ggtcag 36

10 <210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: oligonucleótido para su uso en PCR

<400> 18

atctcaattg tacattctc agga 24

20

<210> 19

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido para su uso en PCR

<400> 19

30 aggatcccat ggccaacaag ctcaaagtga c 31

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido para su uso en PCR

ES 2 629 771 T3

<400> 20

aggatccta gtgcttag ttgaat 26

<210> 21

5 <211> 4947

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia artificial: Fusión del promotor de APP con el gen beta-glucuronidasa

<220>

<221> promotor

<222> (1)..(1961)

15

<220>

<221> señal_misc

<222> (1962)..(1964)

<223> codón de iniciación de la traducción

20

<400> 21

ES 2 629 771 T3

ctcgagatag tatatTTTT agttactatc attacataag tatatTTTaa aaaactaatt 60
atatgaatta tgtagctaac tagatagata atcgtataac caattcatgt tagtatagta 120
tagTTtaagt atgtatTTTg ggattacaag tgtggTTggc atcaagacaa ggatggTgat 180
agcTTTctc tgtaattTg ttaagaaaa gTTTTgcat tttatgtata aacgtgTTT 240
TTTTtataa tttcaattt caacaaaaaa caattTTTT taataatgat tgaccactat 300
agacaattta aatgataaaa aaaaggggga atTTTcaca atgTTTgga gattagtcta 360
gattTTTTgt ccaaattTc cgattgtaag aattaagaag caatgaacat ttgtgTTaag 420
cttaatgatt tgtactcaca atatcTTTta aattTaaat tgttaaccaa aatcctat 480
atattgtact tgtaatagaa atataaacta ttaaaaacaa cactttatc atataatata 540
agTtaaaaca tatgTTTTt ttagtatgtt ctaatcacac ctattaaaa aagttgaagc 600
taaagagcc aaaagaaaa ataaagatag gggatgggga caggctgtaa tgttaggcgg 660
ttggtatatg aactgagaac atgtctgtt gttcggTca tctacgccac tcaaccattt 720
ggctatgTTt tctTTTTggc tttgcatgt tctcttact tttctcttt ggtcaaaatc 780
tctatctcgt cTTTtcatg gcttaccga atgTTagtTg tcatgtaaat ttggTTatga 840
aaagatattt tatataaact ttatcgtata ttaatatcgt tatcatctaa ccattTTTTa 900

ES 2 629 771 T3

aaactaaact agaaccatcc agttttacaa gagttttttt tttttttttc taactaaata 960
atatttgaag tgtacaatat taacaatata tgggccaaat aatagtggaa accaaatcgt 1020
lagtcccact ttatgatggg cctgttgatt cttatgtctt cttcgtaagt tgtgattalg 1080
cagattacgg gctaataaac atgcatgttt agtttttact gtccaagtaa cgaaatttta 1140
tcttttgggt tgttgccca tttcatatat tccaaatgcc aatccagcc cggctcgaca 1200
cagcaactgct cggctcaaca ctcgatgcg gttggtagcc acttaagacc ttggtttgat 1260
taacatgta cgaataatt gtgtcccttt ttcttcaagg agactaatct cttttaataa 1320
aaaagaattg tgcattagt caacacaagt cctataatcc gtttacgtaa tttgtatgca 1380
cgtccttggg aaagtgagta gtggcgtacg ttacagccaa aaactatttg tatattttct 1440
ttcgtaaac aaccagcaaa attttcagaa aaatgttctt aaattataaa ttagtagtac 1500
attttaaac atagagattt tttgtttctt ttaatagaag agttaaact atgtacaaaa 1560
tttcaactcc tttcaaagt attgcctgt tactagattt ttaacctttt tttttttatc 1620
tttcatgatt ttctattgct tgccatcacc aatggtagga aataaatact attttaaaaa 1680
ggcaggggt ggalltaaga alcaatccaa aagtlgggg lctlllggag altaaaaagt 1740
tatatgggaa atatccaaa atatgaacga gaacttttgt caaaaaaatt taaaataatt 1800
tttcaaaaag cctaaagct ttcaagggaa gccatcgatg aagaagaaaa cgaagaagaa 1860
gactcttcaa acgttcgcg gaactcactt ctgacgaaaa ccatacttcc tcagtctcat 1920
tcctttccg acgaactatt tcctgaaga agaagacgaa aatggcgaac aagctcaaag 1980
tcgacatggt ccgtcctgta gaaaccccaa cccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt 2040
gggcattcag tctggatcgc gaaaactgtg gaattgatca gcgttggtgg gaaagcgcgt 2100
tacaagaaag cgggcaatt gctgtgccag gcagttttaa cgatcagttc gccgatgcag 2160
atattcgtaa ttaagcgggc aacgtctggt atcagcgcga agtctttata ccgaaaggtt 2220
cggcaggcca gcgtatcgtg ctgcgtttcg atgcggtcac tcattacggc aaagtgtggg 2280
tcaataatca ggaagtgatg gagcatcagg gcggtatac gccatttgaa gccgatgtca 2340

ES 2 629 771 T3

cgccgatgt tattgccggg aaaagtgtac gtatcaccgt ttgtgtgaac aacgaactga 2400
actggcagac tatcccggcg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt 2460
cttacttcca tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca 2520
cgccgaacac ctgggtggac gatatcaccg tggtgacgca tgtcgcgcaa gactgtaacc 2580
acgcgtctgt tgactggcag gtgggtggcca atggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg 2640
cggatcaaca ggtggttgca actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtggtgaatc 2700
cgcacctctg gcaaccgggt gaaggttatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc 2760
agacagagtg tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaagggcg 2820
aacagttcct gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggctgt catgaagatg 2880
cggacttaag tggcaanagg ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac gcattaatgg 2940
actggattgg ggccaactcc taccgtaact cgcattacco ttacgctgaa gagatgctcg 3000
actgggcaga tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggctttaacc 3060
tctcttiagg cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg 3120
cagtcaacgg gaaactcag caaqcgcact tacagccgat taaagagctg atagcgcgtg 3180
acaaaaacca cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgcaa cgaaccggat acccgtccc 3240
aagtgcacgg gaatatttcg ccaactggcg aagcaacgcg taaactcgac ccgacgcgtc 3300
cgatcacctg cgtcaatgta atgttctgcg acgctcacac cgataccatc accgatctct 3360
ttgatgtgct gtgcctgaac cgttattacg gatggtatgt ccaaagcggc gatttgcaaa 3420
cggcagagaa ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca ggagaaactg catcagccga 3480
ttatcatcac cgaatacggc gtggatacgt tagccgggct gcaactcaatg tacaccgaca 3540
tgtggagtga agagtatcag tgtgcatggc tggatatgta tcaccgcgtc ttgatcgcg 3600
tcagcgcctg cgtccgtgaa caggtatgga atttcgccga ttttgcgacc tcgcaaggca 3660
tattgcgctg tggcggtaac aagaaaggga tcttcaactc cgaccgcaaa ccgaagtcgg 3720
cggcttttct gctgcaaaaa cgctggactg gcatgaactt cggtgaaaaa ccgcagcagg 3780

ES 2 629 771 T3

gaggcaaaca atgannnnnn gaattggtcc tgctttaatg agatatgcga gacgcctatg 3840
atcgcgatgat atttgctttc aattctgttg tgcacgttgt aaaaaacctg agcatgtgta 3900
gtcagatcc ttaccgccgg ttccggttca ttctaataaa tatatcaccg gttactatcg 3960
tatttttatg aataatattc tccgttcaat ttactgattg taccctacta cttatatgta 4020
caatattaa atgaaaacaa tatattgtgc tgaatagggt tatagcgaca tctatgatag 4080
agcgccacaa taacaaacaa ttgcgtttta ttattacaaa tccaatttta aaaaaagcgg 4140
cagaaccggt caaacctaaa agactgatta cataaatctt attcaaattt caaaaggccc 4200
caggggctag tatctacgac acaccgagcg gcgaactaat aacgttact gaagggaact 4260
ccggttccc gccggcgcg atgggtgaga ttcttgaag ttgagtattg gccgtccgct 4320
ctaccgaaag ttacgggcac cattcaaccg ggtccagcac ggcggccggg taaccgactt 4380
gctgccccga gaattatgca gcattttttt ggtgatgtg ggccccaaat gaagtgcagg 4440
tcaaaccttg acagtgacga caaatcgttg ggcggtcca gggcgaattt tgcgacaaca 4500
tgtcgaggct cagcaggact ctagaggatc cccgggtacc gagctcgaat tcaactggcg 4560
tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgag 4620
cacatcccc ttccgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc 4680
aacagttgcg cagcctgaat ggcgatggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 4740
tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat 4800
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 4860
tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 4920
tttcaccgtc atcaccgaaa cgcgcga 4947

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una planta con resistencia potenciada a condiciones adversas, comprendiendo dicho método introducir un gen quimérico en dicha célula de planta o planta por transformación, en el que dicho gen quimérico comprende las siguientes regiones de ADN operativamente unidas:

5 a) un promotor expresable en plantas;

b) una región de ADN, que cuando se transcribe da una molécula de ARN, en la que dicha molécula de ARN cuando está siendo traducida en un péptido o proteína inhibe PARP de clase NAP o ZAP o ambas en células de dicha planta, en la que dicha molécula de ARN codifica un mutante de PARP negativo dominante que cuando se expresa en células de dicha planta reduce la actividad aparente de la proteína PARP codificada por un gen PARP endógeno, en la que dicho mutante de PARP negativo dominante comprende o consiste en un dominio de unión de ADN funcional sin un dominio catalítico o sin un dominio catalítico funcional, en la que dicho mutante de PARP negativo dominante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4 del aminoácido 1 a 159, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6 del aminoácido 1 a 138, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido 1 a 98, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, en la que la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 a 88 está sustituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 98, o en la que dicho mutante de PARP negativo dominante está mutado en la lisina conservada de posición 850 de SEQ ID No. 2, posición 532 de SEQ ID No. 4 o posición 517 de SEQ ID No. 6; y

20 c) una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación

en el que dicha condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho promotor es un promotor específico de tejido o inducible.

3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho promotor está seleccionado de un promotor sensible a hongos, un promotor sensible a nematodos, un promotor selectivo de anteras, un promotor selectivo de estigmas, o un promotor selectivo de la zona de dehiscencia.

4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho promotor expresable en plantas es un promotor constitutivo.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la actividad de PARP aparente total en células de dicha planta se reduce a aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 90% de la actividad de PARP aparente normal en dichas células de dicha planta.

30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha planta está seleccionada del grupo que consiste en maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verduras crucíferas, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavel, rosa, crisantemo y tulipán.

35 7. Un gen quimérico para producir una planta con resistencia potenciada a condiciones adversas en el que dicha condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico, comprendiendo dicho gen quimérico las siguientes regiones de ADN operativamente unidas

a. un promotor expresable en plantas;

b. una región de ADN, que cuando se transcribe da una molécula de ARN, en la que dicha molécula de ARN cuando está siendo traducida en un péptido o proteína inhibe PARP de clase NAP o ZAP o ambas en células de dicha planta, en la que dicha molécula de ARN codifica un mutante de PARP negativo dominante que cuando se expresa en células de dicha planta reduce la actividad aparente de la proteína PARP codificada por un gen PARP endógeno, en la que dicho mutante de PARP negativo dominante comprende o consiste en un dominio de unión de ADN funcional sin un dominio catalítico o sin un dominio catalítico funcional, en la que dicho mutante de PARP negativo dominante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4 del aminoácido 1 a 159, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6 del aminoácido 1 a 138, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido 1 a 98, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 del aminoácido 1 a 370, en la que la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 a 88 está sustituida por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 11 del aminoácido en la posición 1 al aminoácido en la posición 98, o en la que dicho mutante de PARP negativo dominante está mutado en la lisina conservada de posición 850 de SEQ ID No. 2, posición 532 de SEQ ID No. 4 o posición 517 de SEQ ID No. 6; y

c. una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación.

8. El gen quimérico de la reivindicación 7, en el que dicho promotor es un promotor específico de tejido o inducible.

9. El gen quimérico de la reivindicación 8, en el que dicho promotor está seleccionado de un promotor sensible a hongos, un promotor sensible a nematodos, un promotor selectivo de anteras, un promotor selectivo de estigmas, o un promotor selectivo de la zona de dehiscencia.
- 5 10. El gen quimérico de la reivindicación 7, en el que dicho promotor expresable en plantas es un promotor constitutivo.
11. Una célula de planta con resistencia potenciada a condiciones adversas en la que dicha condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico, comprendiendo dicha célula de planta el gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 10 12. Una planta con resistencia potenciada a condiciones adversas, en la que dicha condición adversa está seleccionada de estrés impuesto mediante tratamiento con ácido salicílico, comprendiendo dicha planta la célula de planta de la reivindicación 11.
13. Una semilla de la planta de la reivindicación 12, que comprende el gen quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
- 15 14. La planta de la reivindicación 12, en la que dicha planta está seleccionada del grupo que consiste en maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verduras crucíferas, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavel, rosa, crisantemo y tulipán.

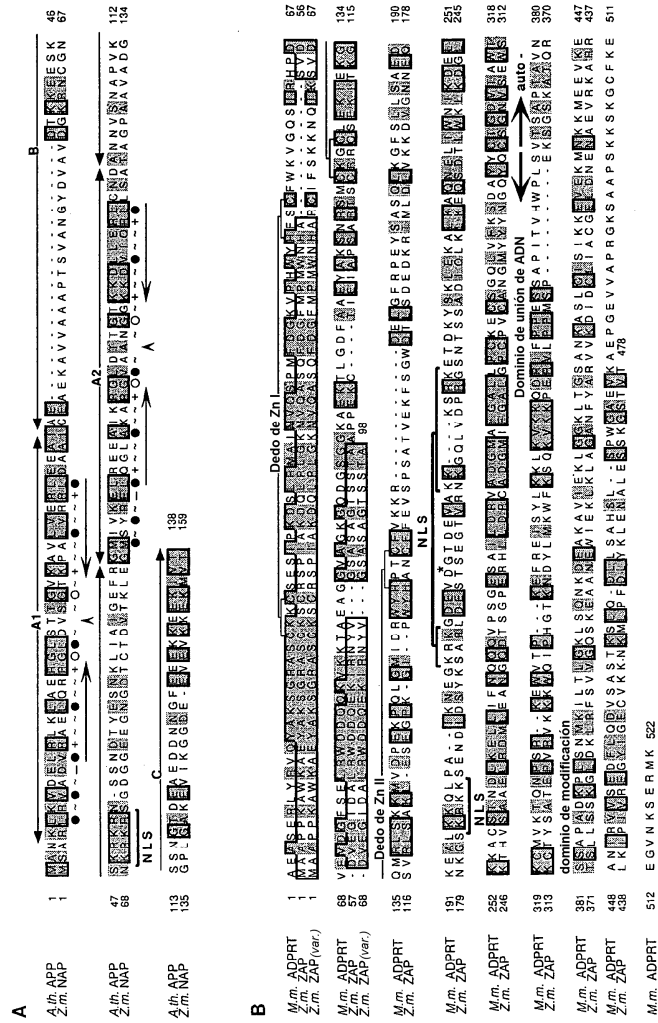


Figura 1

M.m. ADPRT	523	CGS A V R P	587	W V V E E S M
Z.m. ZAP	479	CGS A V R P	543	W V V E E S M
Z.m. NAP	160	CGS A V R P	226	W V V E E S M
Z.m. APP	139	CGS A V R P	205	W V V E E S M
M.m. ADPRT	588	CGS A V R P	647	W V V E E S M
Z.m. ZAP	544	CGS A V R P	606	W V V E E S M
Z.m. NAP	227	CGS A V R P	287	W V V E E S M
Z.m. APP	206	CGS A V R P	267	W V V E E S M
M.m. ADPRT	648	CGS A V R P	708	W V V E E S M
Z.m. ZAP	607	CGS A V R P	666	W V V E E S M
Z.m. NAP	288	CGS A V R P	349	W V V E E S M
Z.m. APP	268	CGS A V R P	334	W V V E E S M
M.m. ADPRT	709	CGS A V R P	767	W V V E E S M
Z.m. ZAP	667	CGS A V R P	727	W V V E E S M
Z.m. NAP	350	CGS A V R P	409	W V V E E S M
Z.m. APP	335	CGS A V R P	394	W V V E E S M
M.m. ADPRT	768	CGS A V R P	834	W V V E E S M
Z.m. ZAP	728	CGS A V R P	792	W V V E E S M
Z.m. NAP	410	CGS A V R P	475	W V V E E S M
Z.m. APP	395	CGS A V R P	460	W V V E E S M
M.m. ADPRT	835	CGS A V R P	900	W V V E E S M
Z.m. ZAP	793	CGS A V R P	859	W V V E E S M
Z.m. NAP	476	CGS A V R P	541	W V V E E S M
Z.m. APP	461	CGS A V R P	526	W V V E E S M
M.m. ADPRT	901	CGS A V R P	965	W V V E E S M
Z.m. ZAP	860	CGS A V R P	925	W V V E E S M
Z.m. NAP	542	CGS A V R P	606	W V V E E S M
Z.m. APP	527	CGS A V R P	593	W V V E E S M
M.m. ADPRT	966	CGS A V R P	1012	W V V E E S M
Z.m. ZAP	926	CGS A V R P	989	W V V E E S M
Z.m. NAP	609	CGS A V R P	653	W V V E E S M
Z.m. APP	594	CGS A V R P	637	W V V E E S M

Figura 2

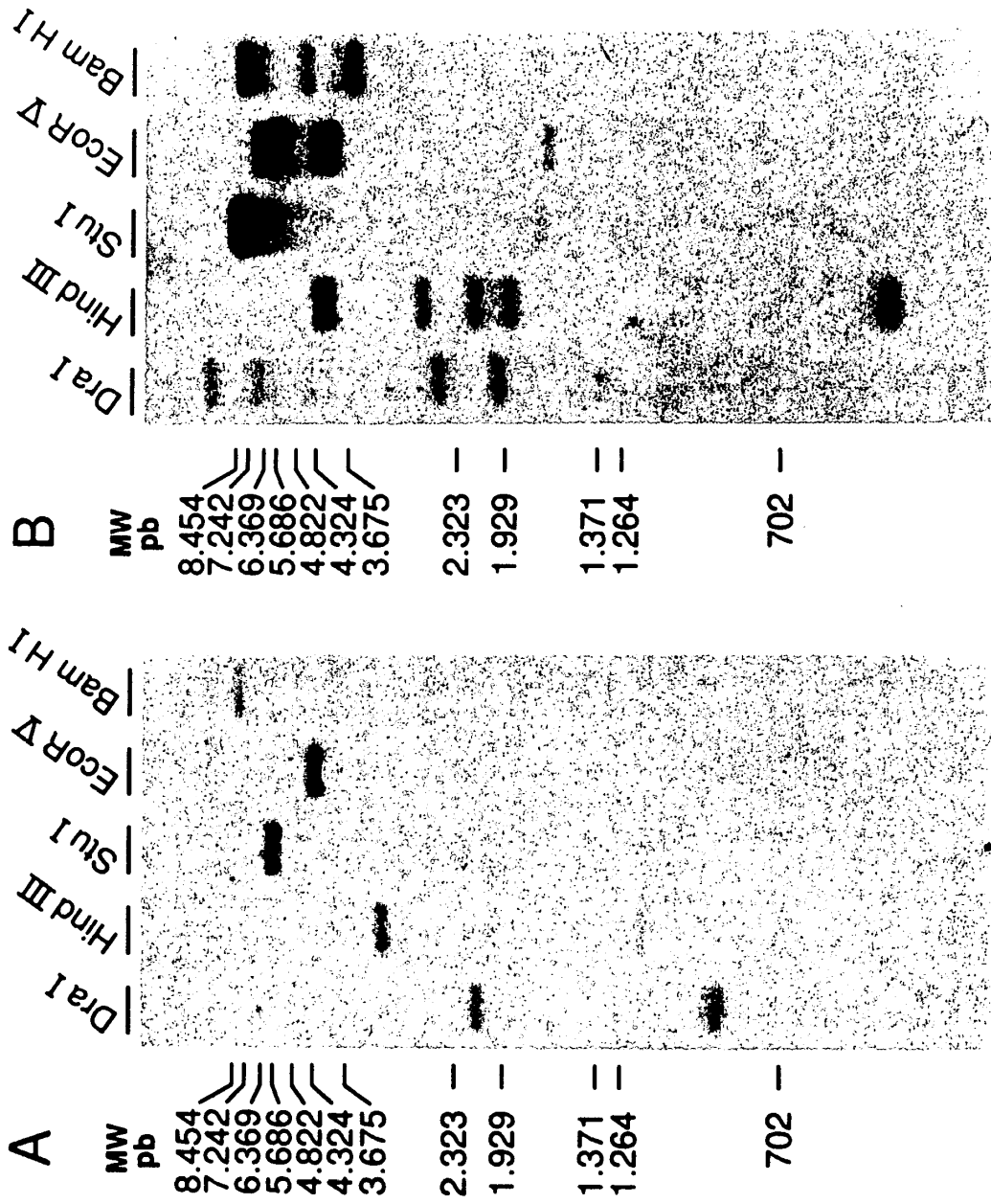


Figura 3

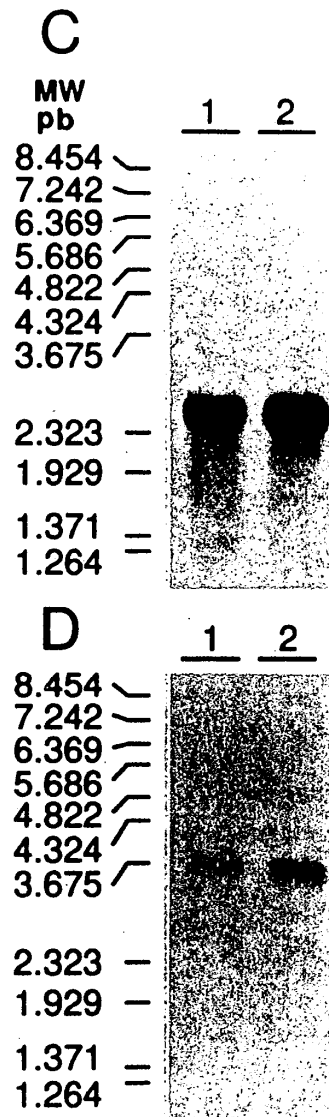
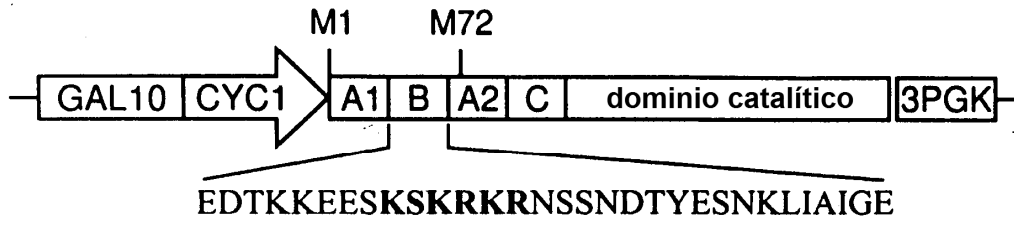


Figura 3 continuación

A



B

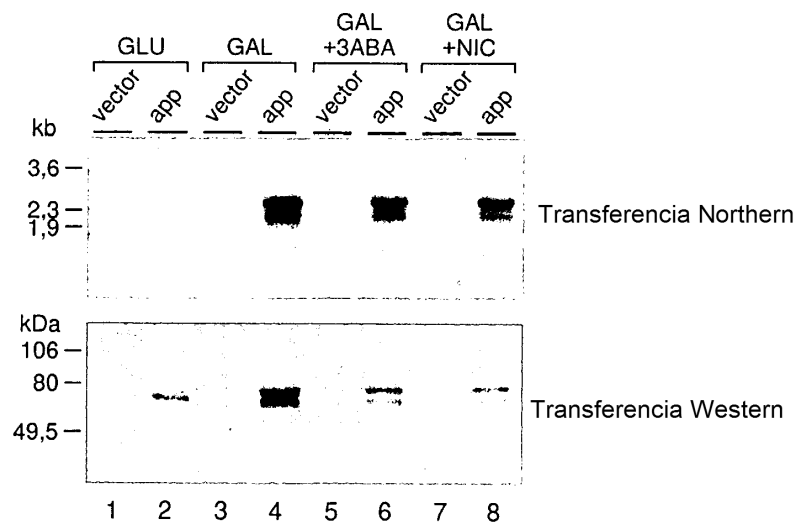


Figura 4

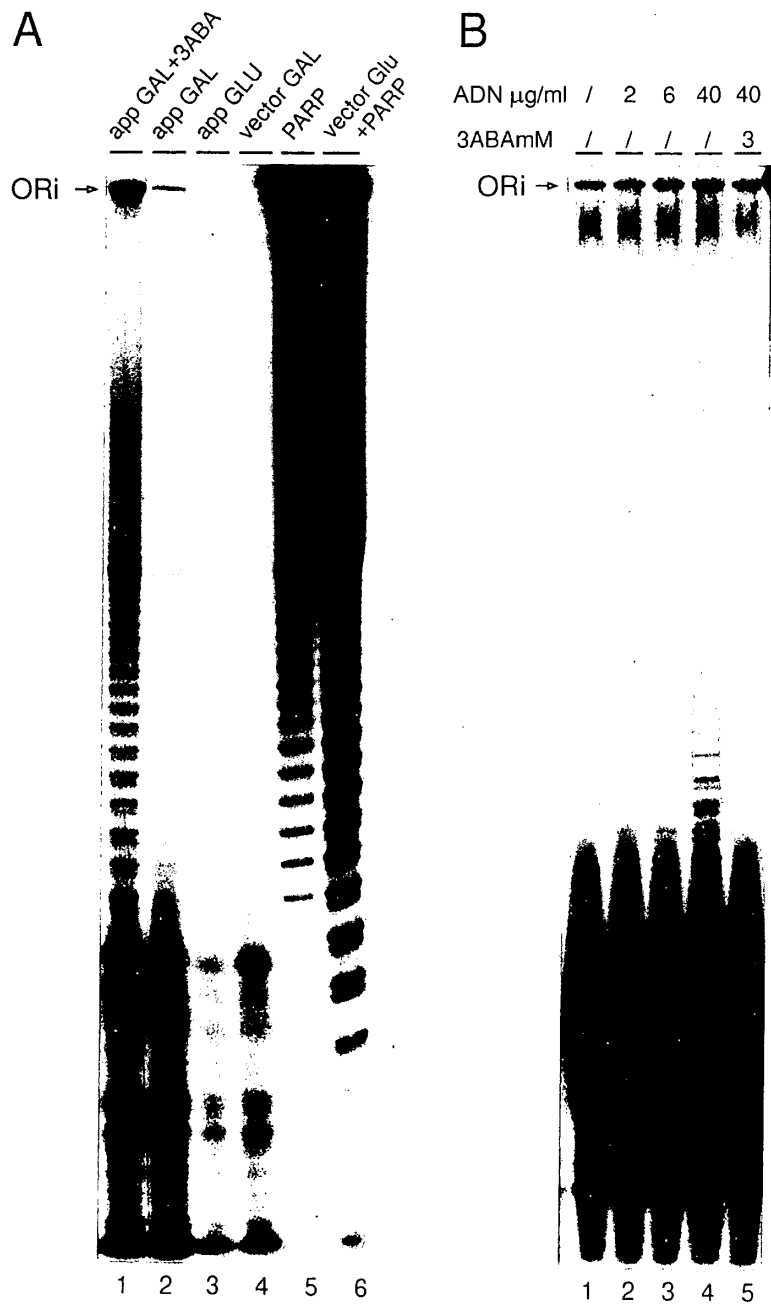


Figura 5

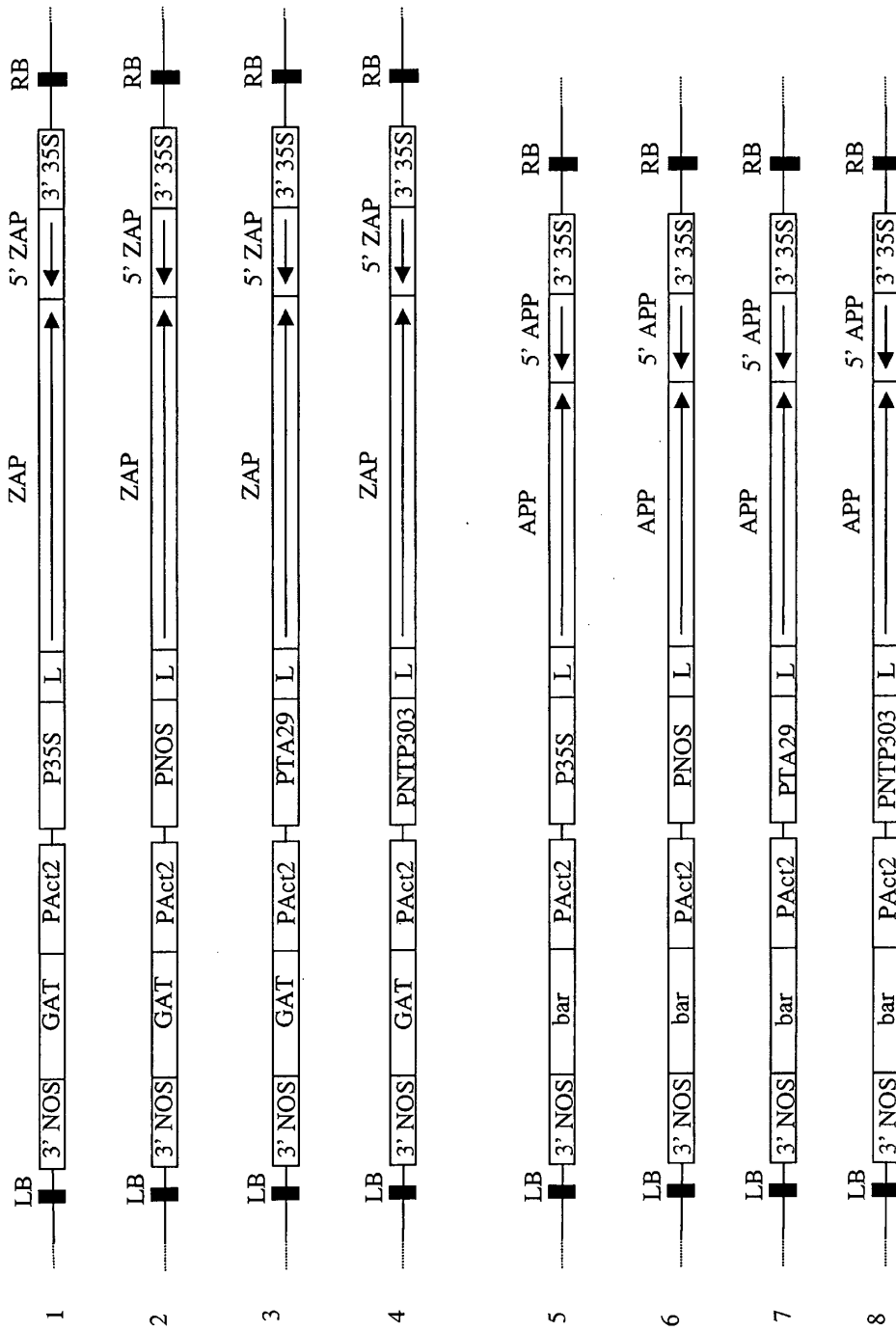


Figura 6