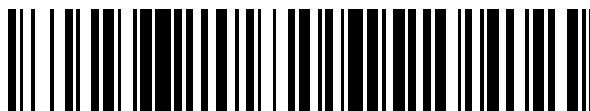


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 250**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2005 PCT/EP2005/002449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2005 WO05095617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2005 E 05715845 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 1725665**

54 Título: **Plantas con actividad aumentada de una enzima fosforilante de almidón**

30 Prioridad:

05.03.2004 EP 04090086

05.03.2004 US 549945 P

29.03.2004 EP 04090121

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

03.10.2017

73 Titular/es:

BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH

(100.0%)

Alfred-Nobel-Strasse 50

40789 Monheim , DE

72 Inventor/es:

FROBERG, CLAUD;

KOETTING, OLIVER;

RITTE, GERHARD y

STEUP, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 635 250 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

Plantas con actividad aumentada de una enzima fosforilante de almidón

- La presente invención se refiere a células vegetales y plantas que están genéticamente modificadas, en las que la modificación genética lleva a un aumento en la actividad de una proteína OK1 fosforilante de almidón en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente. La presente invención también se refiere a medios y procedimientos para la producción de tales células vegetales y plantas. Estos tipos de células vegetales y plantas sintetizan un almidón modificado. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al almidón sintetizado a partir de las células vegetales y plantas de acuerdo con la invención, los procedimientos para la producción de este almidón y la producción de derivados de almidón de este almidón modificado, así como harinas que contienen almidones de acuerdo con la invención.
- Además, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos, que codifican proteínas OK1 fosforilantes de almidón, vectores, células hospedadoras, células vegetales y plantas que contienen tales moléculas de ácidos nucleicos. La presente invención también implica proteínas OK1, que presentan actividad fosforilante de almidón.
- Con relación a la elevada importancia que actualmente se le atribuye a los constituyentes vegetales como fuentes de materias primas renovables, una de las tareas de la investigación biotecnológica es tratar de adaptar estas materias primas vegetales a las necesidades de la industria del procesamiento. Además, con el fin de permitir que las materias primas regeneradoras se utilicen en tantas áreas de aplicación como sea posible, es necesario lograr una gran variedad de materiales.
- El polisacárido de almidón se compone de componentes de base químicamente uniformes, las moléculas de glucosa, pero constituye una mezcla compleja de diferentes formas moleculares, que presentan diferencias en relación con el grado de polimerización y ramificación, y por tanto, difieren fuertemente entre sí en sus características físico-químicas. La discriminación se hace entre el almidón de amilosa, un polímero esencialmente sin ramificaciones hecho de unidades de glucosa enlazadas con enlaces glucosídicos alfa-1,4, y el almidón de amilopectina, un polímero ramificado, en el que las ramificaciones se producen mediante la aparición de enlaces glucosídicos alfa-1,6. Una diferencia esencial adicional entre amilosa y amilopectina recae en el peso molecular. Mientras que la amilosa, dependiendo del origen del almidón, tiene un peso molecular de 5×10^5 - 10^6 Da, el de la amilopectina está entre 10^7 and 10^8 . Las dos macromoléculas se pueden diferenciar mediante su peso molecular y sus diferentes características físico-químicas, la mayoría de las cuales se pueden hacer fácilmente visibles por sus diferentes características de unión a yodo.
- La amilosa se ha considerado durante mucho tiempo como un polímero lineal, que consiste en monómeros de alfa-D-glucosa con enlaces glucosídicos alfa-1,4. En estudios más recientes, sin embargo, se ha demostrado la presencia de puntos de ramificación con enlaces glucosídicos alfa-1,6 (aproximadamente el 0,1 %) (Hizukuri y Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda y col., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).
- Las características funcionales de los almidones, tales como por ejemplo la solubilidad, el comportamiento de retrogradación, la capacidad de unión al agua, las características de formación de películas, la viscosidad, las características de gelatinización, la estabilidad frente a congelación-descongelación, la estabilidad en ácido, la fuerza gelificante y el tamaño del grano de almidón, se ven afectadas, entre otras cosas, por la proporción amilosa/amilopectina, el peso molecular, el patrón de distribución de cadenas laterales, la concentración de iones, el contenido en lípidos y proteínas, el promedio del tamaño de grano del almidón, la morfología del grano del almidón, etc. Las características funcionales del almidón también se ven afectadas por el contenido en fosfato, un componente no carbónico del almidón. En el presente documento, se hace una diferenciación entre fosfato, que está unido de manera covalente en la forma de monoésteres a las moléculas de glucosa del almidón (descrito en lo sucesivo como fosfato de almidón), y el fosfato en la forma de fosfolípidos asociados con el almidón.
- El contenido de fosfato de almidón varía en función del tipo de planta. Por lo tanto, ciertos mutantes de maíz, por ejemplo, sintetizan un almidón con contenido aumentado en fosfato de almidón (en maíz ceroso el 0,002 % y en maíz con contenido aumentado en amilosa, el 0,013 %), mientras que los tipos convencionales de maíz solo tienen trazas de fosfato de almidón. De manera similar, las pequeñas cantidades de fosfato de almidón se encuentran en el trigo (0,001 %), mientras que no se han descubierto evidencias de fosfato de almidón en la avena y el sorgo. Las pequeñas cantidades de fosfato de almidón se han descubierto en mutantes de arroz (en arroz ceroso, el 0,003 %) y en tipos convencionales de arroz (0,013 %). Se ha demostrado la existencia de cantidades significativas de fosfato de almidón en plantas, que sintetizan almidón que se almacena en el tubérculo o en la raíz, tal como tapioca (0,008 %), batata (0,011 %), arrurruz (0,021 %) o patata (0,089 %), por ejemplo. Los valores porcentuales del contenido de fosfato de almidón citado anteriormente se refieren al peso seco del almidón en cada caso y se han determinado por Jane y col. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832).
- El fosfato de almidón puede estar presente en forma de monoésteres en la posición C-2, C-3 o C-6 de monómeros de glucosa polimerizados (Takeda y Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). La distribución de fosfato en el almidón sintetizado por plantas se caracteriza generalmente porque aproximadamente del 30 % al 40 % de los restos fosfato en la posición C-3 y aproximadamente del 60 % al 70 % de los restos fosfato en la posición C-6, de la molécula de glucosa, están unidos de manera covalente (Blennow y col., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules

27, 211-218). Blennow y col. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) han determinado un contenido en fosfato de almidón, que está unido en la posición C-6 de las moléculas de glucosa, para diferentes almidones, tales como, por ejemplo, almidón de patata (entre 7,8 y 33.5 nMol por mg de almidón, dependiendo de la variedad), almidón de diferentes especies de *Curcuma* (entre 1,8 y 63 nMol por mg), almidón de tapioca (2,5 nMol por mg de almidón), almidón de arroz (1,0 nMol por mg de almidón), almidón de frijol mungo (3,5 nMol por mg de almidón) y almidón de sorgo (0,9 nMol por mg de almidón). Estos autores han sido incapaces de demostrar la presencia de cualquier fosfato unido en la posición C-6 en el almidón de la cebada y en almidones de diferentes mutantes cerosos del maíz. Hasta la actualidad, no ha sido posible establecer una conexión entre el genotipo de una planta y el contenido en fosfato de almidón (Jane y col., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Por tanto, actualmente no es posible modificar el contenido de fosfato de almidón en plantas por medio de medidas de cultivo.

Anteriormente, solo se ha descrito una proteína, que facilita la introducción de enlaces covalentes de restos de fosfato en las moléculas de glucosa del almidón. Esta proteína tiene la actividad enzimática de una alfa-glucan-agua diquinasa (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171), se describe con frecuencia en la bibliografía como R1 y se une a los granos de almidón del almidón de almacenamiento en los tubérculos de patata (Lorberth y col., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). En la reacción catalizada por R1, los eductos alfa-1,4-glucano (almidón), adenosintrifosfato (ATP) y agua se convierten en los productos glucan-fosfato (fosfato de almidón), monofosfato y adenosina monofosfato. Al hacerlo, el resto fosfato gamma del ATP se transfiere al agua y el resto fosfato beta del ATP se transfiere al glucano (almidón). R1 transfiere el resto de fosfato beta de ATP a la posición C-6 y C-3 de las moléculas de glucosa de alfa-1,4-glucanos *in vitro*. La proporción de fosfato en C-6 frente a fosfato en C-3, que se obtiene en la reacción *in vitro*, es la misma que la proporción, que está presente en almidón aislado a partir de plantas (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Como aproximadamente el 70 % del fosfato de almidón presente en el almidón de patata está unido a los monómeros de glucosa del almidón en la posición C-6 y aproximadamente el 30 % a la posición C-3, esto significa que R1 preferentemente fosforila la posición C-6 de las moléculas de glucosa. Además, se ha demostrado que mediante el uso de amilopectina del maíz, entre otras cosas, R1 puede fosforilar alfa-1,4-glucanos, que todavía no contienen fosfato unido de manera covalente (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171), es decir, R1 es capaz de introducir fosfato *de novo* en alfa-1,4-glucanos.

Las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos que les corresponden, que codifican una proteína R1, se describen a partir de diferentes especies, tales como, por ejemplo, patata (WO 97 11188, Acc. de GenBank: AY027522, Y09533), trigo (WO 00 77229, US 6,462,256, Acc. de GenBank: AAN93923, Acc. de GenBank: AR236165), arroz (Acc. de GenBank: AAR61445, Acc. de GenBank: AR400814), maíz (Acc. de GenBank: AAR61444, Acc. de GenBank: AR400813), soja (Acc. de GenBank: AAR61446, Acc. de GenBank: AR400815), cítricos (Acc. de GenBank: AY094062), y *Arabidopsis* (Acc. de GenBank: AF312027).

Las plantas de trigo, que presentan una actividad aumentada de una proteína R1 debido a la sobreexpresión de un gen de R1 de patata, se describen en el documento WO 02 34923. Estas plantas sintetizan un almidón con cantidades significativas de fosfato de almidón en la posición C-6 de las moléculas de glucosa en comparación con las correspondientes plantas de tipo silvestre, en las que no se puede detectar fosfato de almidón.

Las proteínas adicionales, que catalizan una reacción, que introduce grupos fosfatos unidos de manera covalente en el almidón, no se han descrito anteriormente. Las enzimas, que preferentemente introducen grupos fosfatos en la posición C-3 y/o en la posición C-2 de las moléculas de glucosa del almidón, también se desconocen. Aparte del aumento del contenido de fosfato de almidón en plantas, tampoco hay, por tanto, formas disponibles de influir de manera específica en la fosforilación del almidón en las plantas, de modificar la distribución de fosfato en el almidón sintetizado por las plantas y/o de aumentar adicionalmente el contenido en fosfato de almidón.

El objeto de la presente invención se basa, por tanto, en proporcionar almidones modificados con contenido aumentado en fosfato y/o una distribución de fosfato modificada, así como células vegetales y/o plantas, que sintetizan tal almidón modificado, así como medios y procedimientos para producir dichas plantas y/o células vegetales.

Este problema se soluciona mediante las realizaciones descritas en las reivindicaciones.

La presente invención, por tanto, se refiere a células vegetales modificadas genéticamente y plantas modificadas genéticamente, caracterizadas porque las células vegetales o las plantas presentan una actividad aumentada en una proteína P-glucan-agua-diquinasa, en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente, en las que la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta y en la que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en:

- a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
- b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, que incluye la secuencia de aminoácidos, que se codifica mediante la inserción en el plásmido DSM16264 o la inserción en el plásmido DSM16302;
- c) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;

- d) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos, que está codificada por la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16264 o mediante la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16302;
- 5 e) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;
- f) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido DSM16264 o en el plásmido DSM16302;
- 10 g) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en a), b), e) o f);
- h) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en a), b), d), e) o f) bajo condiciones rigurosas;
- i) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en a), b), o f) debido a la degeneración del código genético; y
- 15 j) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en a), b), c), d), e), f), g), h) o i).

La presente invención describe una célula vegetal o planta, que está modificada genéticamente, en la que la modificación genética lleva a un aumento de la actividad de al menos una proteína OK1 en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre o plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

- 20 En relación con la presente invención, la expresión "célula vegetal de tipo silvestre" significa que las células vegetales en cuestión se usaron como material de partida para la producción de las células vegetales de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de la modificación genética introducida, se corresponde con la de una célula vegetal de acuerdo con la invención.

- 25 En relación con la presente invención, la expresión "planta de tipo silvestre" significa que las plantas en cuestión se usaron como material de partida para la producción de las plantas de acuerdo con la invención, es decir, su información genética, aparte de la modificación genética introducida, se corresponde con la de una planta de acuerdo con la invención.

- 30 En relación con la presente invención, la expresión "que se corresponde" significa que, en comparación con varios objetos, los objetos en cuestión que se comparan entre sí se han mantenido en las mismas condiciones. En relación con la presente invención, la expresión "que se corresponde" en relación con la célula vegetal de tipo silvestre o la planta de tipo silvestre significa que las células vegetales o las plantas, que se comparan entre sí, han crecido en las mismas condiciones de cultivo y que tienen la misma edad (de cultivo).

- 35 La expresión "actividad aumentada de al menos una proteína OK1" en el marco de la presente invención significa un aumento en la expresión de genes endógenos, que codifican las proteínas OK1 y/o un aumento en la cantidad de proteínas OK1 en las células y/o un aumento en la actividad enzimática de proteínas OK1 en las células.

- 40 El aumento en la expresión se puede determinar midiendo la cantidad de proteínas OK1 que codifican transcritos, por ejemplo; por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Northern o RT-PCR. Un aumento preferentemente significa un aumento en la cantidad de transcritos de al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 85 % y lo más preferentemente al menos el 100 %, en comparación con las correspondientes células vegetales que no se han modificado genéticamente. Un aumento en la cantidad de transcritos que codifican una proteína OK1 también significa que las plantas o células vegetales, que no presentan cualquiera de las cantidades detectables de transcritos que codifican una proteína OK1, presentan cantidades detectables de transcritos que codifican una proteína OK1 después de la modificación genética de acuerdo con la invención.

- 45 El aumento en la cantidad de proteína de una proteína OK1, que da como resultado una actividad aumentada de esta proteína en las células vegetales en cuestión, puede, por ejemplo, determinarse mediante procedimientos inmunológicos tales como análisis por transferencia de Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) o RIA (radioinmunoensayo). En el presente documento, un aumento preferentemente significa un aumento en la cantidad de proteína OK1 en comparación con las correspondientes células vegetales que no se han modificado genéticamente en al menos el 50 %, en particular en al menos el 70 %, preferentemente en al menos el 85 % y particular y preferentemente en al menos el 100 %. Un aumento en la cantidad de proteína OK1 también significa que las plantas o las células vegetales que no tienen ninguna actividad de proteína OK1 detectable presentan una cantidad detectable de proteína OK1 después de la modificación genética de acuerdo con la invención.

- 55 Los procedimientos para crear anticuerpos, que reaccionen específicamente con una determinada proteína, es decir, que se unan específicamente a dicha proteína, son conocidos por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Lottspeich and Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). La producción de tales anticuerpos la ofrecen varias empresas (por ejemplo Eurogentec, Bélgica) como un servicio por contrato. Una posible manera de crear anticuerpos, que reaccionen específicamente con una proteína OK1, se

describe a continuación (véase Ejemplo 10).

En el marco de la presente invención, la expresión "proteína OK1" se entiende que significa una proteína, que transfiere un resto de fosfato de ATP en almidón ya fosforilado (almidón-P). Los almidones aislados a partir de hojas de un mutante de *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* no tiene cantidades detectables de restos fosfato unidos de manera covalente y no están fosforilados por una proteína OK1, es decir, una proteína OK1 de acuerdo con la invención requiere almidón ya fosforilado como sustrato para transferir restos de fosfato adicionales.

Preferentemente, el resto de fosfato beta del ATP se transfiere desde una proteína OK1 al almidón y el resto de fosfato gamma del ATP se transfiere al agua. Un producto de reacción adicional producido por una reacción fosforilante de almidón-P llevada a cabo usando una proteína OK1 es AMP (adenosina monofosfato). Una proteína OK1 se describe por tanto como [fosforilado-alfa-glucano]-agua-diquinasa ([P-glucan]-agua-diquinasa) o as [fosforilado-almidón]-agua-diquinasa.

Preferentemente, se produce una unión de monoéster de fosfato adicional en la posición C-6 y/o en la posición C-3 de una molécula de glucosa del almidón-P, que se fosforila mediante una proteína OK1. En la fosforilación de almidón-P catalizada por una proteína OK1, es particularmente preferido si se producen más uniones de monoéster de fosfato en la posición C-3 en comparación con las uniones de monoéster de fosfato en la posición C-6 en las moléculas de glucosa del almidón-P en cuestión. Las secuencias de aminoácidos, que codifican proteínas OK1, contienen un dominio de fosfohistidina. Los dominios de fosfohistidina se describen, por ejemplo, por Tien-Shin Yu y col. (2001, *Plant Cell* 13, 1907-1918). Los dominios de fosfohistidina de las proteínas OK1 que codifican aminoácidos preferentemente contienen dos histidinas.

En la catálisis de una reacción fosforilante de un almidón-P por medio de una proteína OK1, una proteína OK1 fosforilada se produce como un producto intermediario, en el que un resto de fosfato de ATP está unido de manera covalente a un aminoácido de la proteína OK1. El producto intermediario se produce mediante la autofosforilación de la proteína OK1, es decir, la propia proteína OK1 cataliza la reacción, que conduce al producto intermediario. Preferentemente, un resto de histidina de la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína OK1 se fosforila como resultado del proceso de autofosforilación, particular y preferentemente un resto de histidina, que es parte de un dominio de fosfohistidina.

Además, las proteínas OK1 de acuerdo con la invención tienen una actividad aumentada de unión al almidón-P en comparación con los almidones no fosforilados.

Como anteriormente no se han descrito enzimas, que requieran almidón-P como un sustrato para fosforilarlos adicionalmente, tampoco ha sido posible anteriormente aumentar el contenido en fosfato de almidón del almidón ya fosforilado en plantas por encima de una cierta cantidad. Esto es posible en la actualidad con la utilización de una proteína de acuerdo con la invención o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para la modificación genética de plantas. La aclaración de la función de una proteína OK1 y, por tanto, la obtención de una proteína OK1, lleva al hecho de que en la actualidad se puede modificar genéticamente a las plantas de tal manera que sintetizen un almidón con características modificadas. La modificación de la distribución del fosfato en el almidón sintetizado por plantas no era posible anteriormente debido a la ausencia de medios disponibles. Debido a la obtención mediante la presente invención de proteínas y ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, en la actualidad también es posible modificar la proporción de fosfato en almidones naturales.

En relación con la presente invención, la expresión "actividad aumentada de unión" se entiende que significa una afinidad aumentada de una proteína por un primer sustrato en comparación con un segundo sustrato. Es decir, la cantidad de proteína, que, en las mismas condiciones de incubación, se une a un primer sustrato en mayor medida en comparación con un segundo sustrato, presenta una actividad aumentada de unión con el primer sustrato.

En relación con la presente invención, la expresión "fosfato de almidón" se entiende que significa grupos fosfato unidos de manera covalente a las moléculas de glucosa del almidón.

En relación con la presente invención, la expresión "almidón no fosforilado" se entiende que significa un almidón, que no contiene ninguna cantidad detectable de fosfato de almidón. Se describen diferentes procedimientos para determinar la cantidad de fosfato de almidón. Preferentemente, se puede usar el procedimiento para determinar la cantidad de fosfato de almidón descrito por Ritte y col. (2000, *Starch/Stärke* 52, 179-185. Particular y preferentemente, la determinación de la cantidad de fosfato de almidón por medio de ³¹P-NMR se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Kasemusuan y Jane (1996, *Cereal Chemistry* 73, 702-707).

En relación con la presente invención, la expresión "almidón fosforilado" o "almidón-P" se entiende que significa un almidón, que contiene fosfato de almidón.

Se puede demostrar la actividad de una proteína OK1, por ejemplo, mediante incubación *in vitro* de una proteína OK1 usando ATP, que contiene un resto de fosfato marcado en la posición beta (ATP marcado). Preferentemente se usa ATP, en el que el resto de fosfato está marcado de manera específica en la posición beta, es decir, en el que solo el resto de fosfato en la posición beta tiene un marcaje. Preferentemente el ATP marcado de manera radiactiva, particular y preferentemente ATP, en el que el resto de fosfato está marcado específicamente de manera radiactiva en la posición beta y especial y preferentemente ATP, en el que el resto de fosfato en la posición beta está marcado específicamente con ³³P, se usa. Si una proteína OK1 con ATP marcado y almidones, que no están fosforilados, se incuban, no se transfiere fosfato al almidón debido a la OK1. Preferentemente, se usa el almidón de la hoja del

mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* (Tien-Shin Yu y col., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918).

Si, por otra parte, se incubaba una proteína OK1 con almidón-P en presencia de ATP marcado, entonces se puede demostrar posteriormente la existencia del fosfato marcado que está unido de manera covalente al almidón-P. Preferentemente, se usa el almidón de las hojas de *Arabidopsis thaliana*, particular y preferentemente, el almidón de los mutantes *Arabidopsis thaliana sex1-3* fosforilados de manera enzimática por medio de una proteína R1 (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Los restos de fosfato marcados, que se han incorporado en el almidón-P debido a una proteína OK1, por ejemplo mediante separación del almidón-P marcado (por ejemplo, mediante precipitación con etanol, filtración, procedimientos cromatográficos, etc.) del resto de la mezcla de reacción y posterior detección del resto de fosfato marcado en la fracción de almidón-P, se puede demostrar. Al mismo tiempo, los restos de fosfato marcados unidos en la fracción de almidón-P se pueden demostrar, por ejemplo, determinando la cantidad de radiactividad presente en la fracción de almidón-P (por ejemplo, por medio de contadores de centelleo). Los procedimientos posibles para demostrar la existencia de una proteína, que requiere almidón-P como un sustrato para una reacción de fosforilación, se describen a continuación en Procedimientos generales, parte 11 y en el Ejemplo 6.

Se puede determinar qué posiciones de los átomos de carbono (C-2, C-3 o C-6) de los monómeros de glucosa en el almidón-P están preferentemente fosforilados por una proteína OK1, por ejemplo, mediante el análisis de los almidones-P fosforilados por una proteína, tal como se describe por Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171). A tal fin, un almidón-P fosforilado por una proteína se hidroliza usando un ácido, y posteriormente se analiza por medio de una cromatografía de intercambio aniónico.

Preferentemente, el almidón-P fosforilado por una proteína OK1 se analiza por medio de RMN con el fin de establecer qué posiciones de los átomos de carbono (C-2, C-3 o C-6) de los monómeros de glucosa en el almidón-P están fosforiladas. Un procedimiento particularmente preferido para identificar las posiciones de los átomos de carbono de una molécula de glucosa del almidón, que se fosforilan mediante una reacción catalizada por una proteína OK1, se describe a continuación en Procedimientos generales, parte 13.

La existencia de una proteína fosforilada, que se produce como un producto intermediario en la fosforilación del almidón-P facilitada por una proteína OK1, se puede demostrar tal como se describe, por ejemplo, por Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171) para una proteína R1.

Para demostrar la presencia de un producto intermediario autofosforilado, primero se incubaba una proteína OK1 en ausencia de almidón con ATP marcado, preferentemente con ATP marcado de manera específica en la posición de fosfato beta, particular y preferentemente, con ATP marcado de manera específica con ³³P en la posición de fosfato beta. En paralelo con esto, una preparación de reacción 2, que en lugar de ATP marcado contiene, sin embargo, las cantidades correspondientes de ATP no marcado, se incubaba en condiciones, por lo demás, idénticas. Posteriormente, un exceso de ATP sin marcar se añade a la mezcla de reacción 1 y una mezcla de ATP sin marcar y ATP marcado (la misma cantidad de ATP marcado que se usó anteriormente en la mezcla de reacción 1, y la misma cantidad de exceso de ATP sin marcar que se añadió a la mezcla de reacción 1) se añade a la mezcla de reacción 2, y esto se incubaba adicionalmente antes de añadir almidón-P a la parte A de la mezcla de reacción 1 (parte 1A) y a la parte A de la mezcla de reacción 2 (parte 2A). La reacción en las restantes partes 1B y 2B de la mezcla de reacción se detienen mediante la desnaturalización de la proteína. La parte B de la mezcla de reacción se puede detener mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, que llevan a la desnaturalización de las proteínas, preferentemente mediante la adición de lauril sulfato de sodio (SDS). La parte 1A y la parte 2A de la mezcla de reacción se incuban durante al menos 10 minutos adicionales antes de que estas reacciones también se detengan. El almidón presente en la parte A y en la parte B de las respectivas mezclas de reacción se separan del resto de la mezcla de reacción. Si el respectivo almidón se separa mediante centrifugación, por ejemplo, entonces, al finalizar la centrifugación, el almidón de la respectiva parte A o parte B de la mezcla de reacción se hallará en el sedimento sedimentado, y las proteínas en la respectiva mezcla de reacción se hallarán en el sobrenadante de la respectiva centrifugación. El sobrenadante de la parte 1A o 2A respectivamente, y la parte 1B o 2B respectivamente de la mezcla de reacción se pueden analizar posteriormente mediante la desnaturalización por electroforesis en gel de acrilamida, por ejemplo, seguido de una autorradiografía del gel de acrilamida obtenido. Para cuantificar la cantidad de proteínas marcadas de manera radiactiva, que se han separado por medio de electroforesis en gel de acrilamida, se puede usar el, así llamado, procedimiento de "imágenes de fósforo", por ejemplo, conocido por el experto en la materia. Si la autorradiografía o el análisis por medio del "generador de imágenes de fósforo" de proteínas en el sobrenadante de la centrifugación de la parte B de la mezcla de reacción 1 muestra un aumento significativo de la señal en comparación con el exceso de centrifugación de la parte A de la mezcla de reacción 1, entonces esto muestra que se da una proteína que facilita la fosforilación del almidón como un producto intermediario autofosforilado. Las partes A y B de la mezcla de reacción 2 sirven como un control y no deben, por tanto, presentar un aumento significativo de la señal en el sobrenadante de la centrifugación en la autorradiografía o en el análisis por medio del "generador de imágenes de fósforo".

Además, se puede estudiar el almidón de las respectivas partes A de las mezclas de reacción 1 y 2 restante en el respectivo sedimento sedimentado, si fuera necesario, tras el posterior lavado de los respectivos almidones, para la presencia de fosfato de almidón, que tiene un marcaje que se corresponde con el ATP marcado usado. Si los almidones de la parte A de la mezcla de reacción 1 contienen restos de fosfato marcados, y si la autorradiografía del sobrenadante de centrifugación de la parte B de la mezcla de reacción 1 presenta un aumento significativo de la señal en la autorradiografía comparado con el sobrenadante de la centrifugación de la parte A de la mezcla de

reacción 1, entonces esto demuestra que está presente una fosforilación de una proteína que facilita almidón como un producto intermediario autofosforilado. Las partes A y B de la mezcla de reacción 2 sirven como un control y no deben, por tanto, presentar un aumento significativo de la señal para los alfa-1,4-glucanos marcados con ³³P en el sedimento sedimentado que contiene alfa-1,4-glucanos. Los procedimientos posibles para demostrar la existencia de un producto intermediario de la proteína OK1 fosforilado se describen a continuación en Procedimientos generales, parte 12 y en el Ejemplo 7.

Se puede demostrar que una proteína OK1 tiene una actividad aumentada de unión a un almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado, mediante la incubación de la proteína OK1 con almidón-P y con almidón no fosforilado en preparaciones separadas.

Todos los almidones no fosforilados son básicamente adecuados para incubar proteínas OK1 con almidón no fosforilado. Preferentemente, un almidón de planta no fosforilado, particular y preferentemente, se usa almidón de trigo, y especial y preferentemente almidón de hoja granular de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*.

Los procedimientos para aislar el almidón a partir de las plantas, por ejemplo, son conocidos por el experto en la materia. Todos los procedimientos conocidos por el experto en la materia son básicamente adecuados para aislar almidón no fosforilado a partir de las especies vegetales apropiadas. Preferentemente, se usan los procedimientos para aislar alfa-1,4-glucanos no fosforilados descritos a continuación (véase Procedimientos generales, parte 2).

Todos los almidones, que contienen fosfato de almidón, son básicamente adecuados para incubar proteínas OK1 con almidón-P. Los almidones fosforilados de manera química también se pueden usar para este fin. Preferentemente, los almidones-P se usan para la incubación con proteínas OK1, particular y preferentemente, un almidón de planta fosforilado de manera enzimática retrospectivamente, especial y preferentemente, un almidón granular de planta fosforilado de manera enzimática retrospectivamente, que se ha aislado de un mutante *sex-1* de *Arabidopsis thaliana*.

Para demostrar una actividad aumentada de unión de proteínas OK1 al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado, las proteínas OK1 se incuban en preparaciones separadas con almidón-P (preparación A) y con almidón no fosforilado (preparación B). Tras una exitosa incubación, las proteínas, que no están unidas a los almidones correspondientes de las preparaciones A y B, se separan de los almidones y las proteínas que están unidos. La unión entre las proteínas y el almidón-P en la preparación A y la unión entre las proteínas y el almidón no fosforilado en la preparación B se retiran posteriormente, es decir, las respectivas proteínas se disuelven. Las proteínas disueltas de la preparación A y la preparación B se pueden separar entonces de los almidones en cuestión, que están presentes en las respectivas preparaciones. Tras esto, las proteínas de unión a almidón-P aisladas de la preparación A y las proteínas de unión a almidón no fosforilado aisladas de la preparación B se pueden separar con la ayuda de procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, filtración en gel, procedimientos cromatográficos, electroforesis, electroforesis en gel de acrilamida con SDS comparando las cantidades de proteínas separadas de la preparación A con las cantidades de las correspondientes proteínas separadas de la preparación B, se puede determinar si una proteína tiene una actividad aumentada de unión con respecto al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado. Los procedimientos, que se pueden usar para demostrar una unión preferente de las proteínas por el almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado, se describen a continuación en (Procedimientos generales, parte 8 y en el Ejemplo 1).

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 codifica una proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 4 codifica una proteína OK1 de *Oryza sativa*.

En una realización adicional de la presente invención, las secuencias de aminoácidos que codifican una proteína OK1 tienen una identidad de al menos el 60 % con la secuencia especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4, en particular de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80 % y particular y preferentemente de al menos el 90 % y especial y preferentemente de al menos el 95 %.

En una realización adicional de la presente invención, la proteína OK1 presenta un dominio de fosfohistidina (Tien-Shin Yu y col., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Las secuencias de aminoácidos que codifican proteínas OK1 contienen un dominio de fosfohistidina, que presenta una identidad preferentemente de al menos el 70 %, particular y preferentemente de al menos el 80 % y más particular y preferentemente de al menos el 90 % de la secuencia de aminoácidos del dominio de fosfohistidina de la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, especificada en la SEQ ID NO 5. El dominio de fosfohistidina preferentemente contiene dos restos de histidinas.

La presente invención describe una célula vegetal modificada genéticamente o una planta modificada genéticamente en la que la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta.

En este contexto, la expresión "modificación genética" significa la introducción de moléculas de ácido nucleico homólogas y/o heterólogas en el genoma de una célula vegetal o en el genoma de una planta, en la que dicha introducción de estas moléculas lleva a un aumento en la actividad de una proteína OK1.

Las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención se modifican con relación a su información genética mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña. La presencia

o la expresión de la molécula de ácido nucleico extraña lleva a un cambio fenotípico. En el presente documento, cambio "fenotípico" significa preferentemente un cambio medible de una o más funciones de las células. Por ejemplo, las células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención y las plantas genéticamente modificadas de acuerdo con la invención presentan un aumento en la actividad de una proteína OK1 debido a la presencia de o en la expresión de la molécula de ácido nucleico introducida.

En relación con la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico extraña" se entiende que significa una molécula tal que no se da de manera natural en las correspondientes células vegetales de tipo silvestre o que no se da de manera natural en la disposición espacial concreta en células vegetales de tipo silvestre o que se localiza en un lugar del genoma de la célula vegetal en el que no se da de manera natural en las células vegetales de tipo silvestre. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico extraña es una molécula recombinante, que consiste en diferentes elementos, la combinación o la disposición espacial específica que no se dan de manera natural en las células vegetales.

En principio, la molécula de ácido nucleico extraña puede ser cualquier molécula de ácido nucleico, que provoca un aumento en la actividad de una proteína OK1 en la célula vegetal o planta.

En relación con la presente invención, el término "genoma" se entiende que significa la totalidad del material genético presente en una célula vegetal. Es sabido por el experto en la materia que, además del núcleo celular, otros orgánulos (por ejemplo, plástidos, mitocondria) también contienen material genético.

Las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención se caracterizan porque la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína OK1, preferentemente una proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* o una proteína OK1 de *Oryza sativa*.

En una realización adicional, la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína OK1 con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4.

Están disponibles un gran número de técnicas para la introducción de ADN en una célula vegetal hospedadora. Estas técnicas incluyen la transformación de células vegetales con ADN-T usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como el medio de transformación, la fusión de protoplastos, la inyección, la electroporación de ADN, la introducción de ADN por medio del enfoque biolístico así como otras posibilidades. El uso de la transformación de células vegetales mediada por agrobacterias se ha investigado de manera exhaustiva y se ha descrito de manera adecuada en el documento EP 120516; Hoekema, EN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanthers B.V., Alblisserdam (1985), Capítulo V; Fraley y col., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 y en An y col. EMBO J. 4, (1985), 277-287. Para la transformación de la patata, véase Rocha-Sosa y col., EMBO J. 8, (1989), 29-33, por ejemplo.

La transformación de plantas monocotiledóneas por medio de vectores basados en la transformación de *Agrobacterium* también se ha descrito (Chan y col., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei y col., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng y col., Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink y col., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May y col., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner y Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie y col., Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Un sistema alternativo para la transformación de plantas monocotiledóneas es la transformación por medio del enfoque biolístico (Wan y Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil y col., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala y col., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer y col., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), transformación de protoplasto, electroporación de células parcialmente permeabilizadas y la introducción de ADN por medio de fibras de vidrio. En particular, la transformación del maíz se ha descrito muchas veces en la bibliografía (véase, por ejemplo, los documentos WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm y col., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm y col., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel y col., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc y col., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

La transformación exitosa de otros tipos de cereales también se ha descrito, por ejemplo, para la cebada (Wan y Lemaux, véase anteriormente; Ritala y col., véase anteriormente; Krens y col., Nature 296, (1982), 72-74) y para el trigo (Nehra y col., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker y col., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Todos los procedimientos anteriores son adecuados en el marco de la presente invención.

Entre otras cosas, las células vegetales y las plantas, que se han modificado genéticamente mediante la introducción de una proteína OK1, se pueden diferenciar de las células vegetales de tipo silvestre y de las plantas de tipo silvestre, respectivamente, en que contienen una molécula de ácido nucleico extraña, que no se da de manera natural en las células vegetales de tipo silvestre o en las plantas de tipo silvestre, o en que tal molécula está presente integrada en un lugar del genoma de la célula vegetal de acuerdo con la invención o en el genoma de la planta de acuerdo con la invención en el que no se da en células vegetales de tipo silvestre o plantas de tipo silvestre, es decir, en un ambiente genómico diferente. Además, las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención de este tipo difieren de las células vegetales de tipo silvestre y las plantas de tipo silvestre, respectivamente, en que contienen al menos una copia de la molécula de ácido nucleico extraña integrada de manera estable en su genoma, posiblemente, además de las copias de tal molécula que se dan de manera natural en las células vegetales de tipo silvestre o en las plantas de tipo silvestre. Si la(s) molécula(s) de ácido nucleico externa introducida en las células vegetales de acuerdo con la invención o en las plantas de acuerdo con la invención es(son) copias adicionales de moléculas que ya se dan de manera natural en las células vegetales

de tipo silvestre o en las plantas de tipo silvestre, respectivamente, entonces las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención se pueden diferenciar de las células vegetales de tipo silvestre o de las plantas de tipo silvestre respectivamente en particular en que esta copia adicional o estas copias adicionales está(n) localizada(s) en lugares en el genoma en los que no se da (o no se dan) en las células vegetales de tipo silvestre o en las plantas de tipo silvestre. Esto se puede verificar, por ejemplo, con la ayuda de un análisis de transferencia de Southern.

Además, las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención se pueden diferenciar, preferentemente, de las células vegetales de tipo silvestre o de las plantas de tipo silvestre, respectivamente, por al menos una de las siguientes características: Si la molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido es heteróloga con respecto a la célula vegetal o planta, entonces las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención tienen transcritos de las moléculas de ácido nucleico introducidas. Esto se puede verificar, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Northern o mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa). Las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención, que expresan un antisentido y/o un transcrito de ARNi, se pueden verificar, por ejemplo, con la ayuda de sondas de ácido nucleico específicas, que son complementarias con el ARN (que se dan de manera natural en la célula vegetal), que es codificante para la proteína. Preferentemente, las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención contienen una proteína, que está codificada por una molécula de ácido nucleico introducida. Esto se puede demostrar mediante procedimientos inmunológicos, por ejemplo, en particular, mediante análisis por transferencia de Western.

Si la molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido es homóloga con respecto a la célula vegetal o planta, las células vegetales de acuerdo con la invención o las plantas de acuerdo con la invención se pueden diferenciar de las células vegetales de tipo silvestre o de las plantas de tipo silvestre, respectivamente, debido a la expresión adicional de la molécula de ácido nucleico extraña introducida, por ejemplo. Las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención preferentemente contienen transcritos de las moléculas de ácido nucleico externas. Esto se puede demostrar mediante análisis por transferencia de Northern, por ejemplo, o con la ayuda de la, así llamada, PCR cuantitativa.

En una realización adicional, las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención son células vegetales transgénicas o plantas transgénicas, respectivamente.

La presente invención se refiere a células vegetales de acuerdo con la invención y plantas de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en:

- a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
- b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, que incluye la secuencia de aminoácidos, que se codifica mediante la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o la inserción en el plásmido pMI50;
- c) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
- d) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos, que está codificada por la región codificante de la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o mediante la región codificante de la inserción en el plásmido pMI50;
- e) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;
- f) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o en el plásmido pMI50;
- g) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en a), b), e) o f);
- h) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en a), b), d), e) o f) bajo condiciones rigurosas;
- i) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en a), b), o f) debido a la degeneración del código genético; y
- j) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en a), b), c), d), e), f), g), h) o i).

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 codifica una proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 4 codifica una proteína OK1 de *Oryza sativa*.

Las proteínas codificadas a partir de diferentes variedades de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención tienen ciertas características comunes. Estas pueden incluir, por ejemplo, actividad biológica, peso molecular, reactividad inmunológica, conformación, etc., así como características físicas tales como, por ejemplo, el comportamiento de marcha en la electroforesis en gel, el comportamiento cromatográfico, los coeficientes de sedimentación, solubilidad, características espectroscópicas, estabilidad; pH óptimo, temperatura óptima, etc.

El peso molecular de la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 es aproximadamente 131 kDa y el peso molecular de la proteína OK1 de *Oryza sativa* derivada de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 4 es aproximadamente 132 kDa. El peso molecular derivado de una proteína de acuerdo con la invención, por tanto, se encuentra en el intervalo de 120 kDa a 145 kDa,

preferentemente en el intervalo de 120 kDa a 140 kDa, particular y preferentemente, desde 125 kDa hasta 140 kDa y especial y preferentemente, desde 130 kDa hasta 135 kDa.

Las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO 2 y en la SEQ ID NO 4 que codifican proteínas OK1 de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, respectivamente, contienen cada una un dominio de fosfohistidina.

5 Preferentemente, una proteína OK1 de acuerdo con la invención, por tanto, contiene un dominio de fosfohistidina, que tiene una identidad de al menos el 50 %, preferentemente de al menos el 60 %, particular y preferentemente, de al menos el 80 % y especial y preferentemente del 90 % con el dominio de fosfohistidina mostrado en la SEQ ID NO 5.

10 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la actividad enzimática de acuerdo con la invención de una proteína OK1, en la que la proteína OK1 codificada tiene una identidad de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80%, particular y preferentemente, de al menos el 90 % y especial y preferentemente del 95 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4.

15 Un plásmido (A.t.-OK1-pGEM) que contiene un ADNc que codifica una proteína de acuerdo con la invención (A.t.-OK1) de *Arabidopsis thaliana* se depositó el 8 de marzo de 2004 con el número DSM16264 y un plásmido (pM150) que contiene un ADNc que codifica proteína adicional de acuerdo con la invención (O.s.-OK1) de *Oryza sativa* se depositó el 24 de marzo de 2004 con el número DSM16302 bajo el Tratado de Budapest en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania.

20 La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 puede derivar de la región codificante de la secuencia de ADNc integrada en el plásmido A.t.-OK1-pGEM y codifica una proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 4 puede derivar de la región codificante de la secuencia de ADNc integrada en el plásmido pM150 y codifica una proteína OK1 de *Oryza sativa*. La presente invención, por tanto, desvela moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la actividad enzimática de una proteína OK1, que incluye la secuencia de aminoácidos, que se codifica mediante la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o mediante la inserción en el plásmido pM150, en el que la proteína codificada tiene una identidad de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80%, particular y preferentemente, de al menos el 90 % y especial y preferentemente del 95 % con la secuencia de aminoácidos, que puede derivar de la inserción en A.t.-OK1-pGEM o pM150.

30 La secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO 1 es una secuencia de ADNc, que incluye la región codificante para una proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* y la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO 3 es una secuencia de ADNc, que incluye la región codificante para una proteína OK1 de *Oryza sativa*.

35 La presente invención, por tanto, se refiere a moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína OK1 y a la región codificante de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o secuencias, que son complementarias a estas, moléculas de ácido nucleico, que incluyen la región codificante de la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o en el plásmido pM150 y las moléculas de ácido nucleico, que tiene una identidad de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80 %, particular y preferentemente, de al menos el 90 % y especial y preferentemente de al menos el 95 % con dichas moléculas de ácido nucleico.

40 Con la ayuda de la información de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención o con la ayuda de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, es posible para el experto en la materia aislar secuencias homólogas de otras especies vegetales, preferentemente de plantas que almacenan almidón, preferentemente de especies vegetales del género *Oryza*, en particular, *Oryza sativa* o de *Arabidopsis thaliana*. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de procedimientos convencionales tales como el examen de ADNc o bibliotecas genómicas con muestras de hibridación adecuadas. El experto en la materia sabe que las secuencias homólogas también se pueden aislar con la ayuda de oligonucleótidos (degenerados) y el uso de procedimientos basados en PCR.

45 El examen de bases de datos, tales como los que están disponibles, por ejemplo, mediante EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) o NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), también se puede usar para identificar secuencias homólogas, que codifican para una proteína OK1. En este caso, se especifican una o más secuencias como una, así llamada, secuencia de entrada. Esta secuencia de entrada se compara después por medio de programas de ordenador estadísticos con las secuencias, que están contenidas en las bases de datos seleccionadas. Tales consultas de base de datos (por ejemplo, búsquedas en blast o fasta) son conocidas por el experto en la materia y se pueden llevar a cabo mediante diversos proveedores.

50 Si se lleva a cabo tal consulta de bases de datos, por ejemplo en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), entonces, se deben usar las configuraciones por defecto, que se especifican para una consulta de comparación particular. Para las comparaciones de la secuencia de la proteína (blastp), estas son las siguientes configuraciones: Limit entrez = not activated; Filter = low complexity activated; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

60 Para las comparaciones de secuencia de ácido nucleico (blastn), se deben establecer los siguientes parámetros: Limit entrez = not activated; Filter = low complexity activated; Expect value = 10; word size = 11.

Con tal búsqueda en las bases de datos, las secuencias descritas en la presente invención se pueden usar como una secuencia de entrada con el fin de identificar moléculas de ácido nucleico adicionales y/o proteínas, que

codifican una proteína OK1.

Con la ayuda de los procedimientos descritos, también es posible identificar y/o aislar moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que hibridan con la secuencia especificada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 y que codifican una proteína OK1.

5 En el marco de la presente invención, la expresión "que hibrida" significa hibridación en las condiciones de hibridación convencionales, preferentemente en condiciones rigurosas tales como, por ejemplo, se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5ª edición (2002), ISBN: 0471250929). Particular y preferentemente, "que hibrida" significa hibridación en las
10 siguientes condiciones:

Tampón de hibridación:

SSC 2x; solución Denhardt 10x (Ficoll 400+PEG+BSA; proporción 1:1:1); SDS al 0,1 %; EDTA 5 mM; Na₂HPO₄ 50 mM;
15 250 µg/ml de ADN de esperma de arenque; 50 µg/ml de ARNt; o
tampón de fosfato de sodio 25 M a pH 7,2; EDTA 1 mM; SDS al 7 %

Temperatura de hibridación:

T=65 hasta 68 °C
Tampón de lavado: SSC 0,1x; SDS al 0,1 %
Temperatura de lavado: T=65 hasta 68 °C.

20 En principio, las moléculas de ácido nucleico, que hibridan con las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, se pueden originar a partir de cualquier especie vegetal, que codifique una proteína apropiada, preferentemente que procedan de plantas que almacenan almidón, preferentemente de especies de la familia (sistemática) Poacea, particular y preferentemente de *Oryza sativa*. Las moléculas de ácido nucleico, que hibridan con las moléculas de acuerdo con la invención, pueden, por ejemplo, aislarse a partir de bibliotecas genómicas o de
25 bibliotecas de ADNc. La identificación y el aislamiento de moléculas de ácido nucleico de este tipo se puede llevar a cabo usando las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención o partes de estas moléculas o los complementos inversos de estas moléculas, por ejemplo, por medio de la hibridación de acuerdo con los procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5ª edición (2002), ISBN: 0471250929) o mediante
30 amplificación usando PCR.

Las moléculas de ácido nucleico, que exactamente o esencialmente tienen la secuencia de nucleótidos especificada en la SEQ ID NO 1 o la SEQ ID NO 3 o partes de estas secuencias, se pueden usar como muestras de hibridación. Los fragmentos usados como muestras de hibridación también pueden ser fragmentos u oligonucleótidos sintéticos,
35 que se han producido usando técnicas de sintetización establecidas y cuya secuencia se corresponde esencialmente con la de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Si se han identificado y aislado los genes, que hibridan con las secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, entonces se debe llevar a cabo una determinación de esta secuencia y un análisis de las características de las proteínas codificadas por esta secuencia para establecer si está implicada una proteína OK1. Las comparaciones de homología a nivel de
40 secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos y una determinación de la actividad enzimática son particularmente adecuadas para este propósito. La actividad de una proteína OK1 puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describa anteriormente, en Procedimientos generales, parte 11. Se puede demostrar una preferente afinidad de unión por el almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado y la autofosforilación de una proteína OK1 usando los procedimientos ya descritos anteriormente y en Procedimientos generales, partes 8 y 12.

45 Las moléculas que hibridan con las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, particularmente incluyen fragmentos, derivados y variantes alélicas de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que codifican una proteína OK1 de plantas, preferentemente de plantas que almacenan almidón, preferentemente de especies vegetales del género *Oryza*, particular y preferentemente de *Oryza sativa* o de *Arabidopsis thaliana*. En relación con la presente invención, el término "derivado" significa que las secuencias de estas moléculas difieren en
50 una o más posiciones de las secuencias de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente y tienen un alto grado de identidad con estas secuencias. En el presente documento, la desviación de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente se puede haber producido, por ejemplo, debido a delección, adición, sustitución, inserción o recombinación.

En relación con la presente invención, el término "identidad" significa una identidad de secuencia sobre la longitud completa de la región codificante de al menos el 60 %, en particular, una identidad de al menos el 70 %, preferentemente mayor del 80 %, particular y preferentemente mayor del 90 % y especialmente de al menos el 95 %. En relación con la presente invención, el término "identidad" debe entenderse que significa el número de aminoácidos/nucleótidos (identidad) que se corresponde con otras proteínas/ácidos nucleicos, expresado como un porcentaje. La identidad se determina preferentemente mediante comparación de los aminoácidos de la SEQ ID NO
60 2 o la SEQ ID NO 4 o de los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO 1 o la SEQ ID NO 3 con otras proteínas/ácidos nucleicos con la ayuda de programas de ordenador. Si las secuencias que se comparan entre sí tienen diferentes

longitudes, la identidad se determina de tal manera que el número de aminoácidos, que tiene la secuencia más corta en común con la secuencia más larga, determina el cociente porcentual de la identidad. Preferentemente, la identidad se determina por medio del programa de ordenador ClustalW, que es bien conocido y está disponible para el público (Thompson y col., *Nucleic Acids Research* 22 (1994), 4673-4680). ClustalW está puesto a disposición del público por Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) y Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemania. ClustalW también se puede descargar de diferentes sitios de Internet, incluyendo el IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, Francia; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) y el EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) así como de todos los sitios de internet reflejados en el EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, Reino Unido).

Preferentemente, La versión 1.8 del programa de ordenador ClustalW se usa para determinar la identidad entre proteínas de acuerdo con la invención y otras proteínas. Al hacerlo, se deben establecer los siguientes parámetros: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOGPAP, NOHGAP.

Preferentemente, la versión 1.8 del programa de ordenador ClustalW se usa para determinar la identidad entre la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo, y la secuencia de nucleótidos de otras moléculas de ácido nucleico. Al hacerlo, se deben establecer los siguientes parámetros:

KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

Además, identidad significa que existe equivalente funcional y/o estructural entre las moléculas de ácido nucleico en cuestión o las proteínas codificadas por ellas. Las moléculas de ácido nucleico, que son homólogas a las moléculas descritas anteriormente y constituyen derivados de estas moléculas, generalmente son variaciones de estas moléculas, que constituyen modificaciones, que ejecutan la misma función biológica. Al mismo tiempo, las variaciones se pueden dar de manera natural, por ejemplo, pueden ser secuencias de otras especies vegetales o pueden ser mutantes, en los que estos mutantes pueden haberse dado de una manera natural o se pueden haber introducido mediante mutagénesis objetiva. Las variaciones también pueden ser secuencias producidas de manera sintética. Las variantes alélicas pueden ser tanto variantes que se dan de manera natural como variantes producidas de manera sintética o variantes producidas mediante técnicas de ADN recombinante. Las moléculas de ácido nucleico, que se desvían de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención debido a la degeneración del código genético, constituyen una forma especial de derivados.

Las proteínas codificadas a partir de diferentes derivados de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención tienen ciertas características comunes. Estas pueden incluir, por ejemplo, actividad biológica, especificidad de sustrato, peso molecular, reactividad inmunológica, conformación, etc., así como características físicas tales como, por ejemplo, el comportamiento de marcha en la electroforesis en gel, el comportamiento cromatográfico, los coeficientes de sedimentación, solubilidad, características espectroscópicas, estabilidad; pH óptimo, temperatura óptima, etc. Las características preferidas de una proteína OK1 ya se han descrito en detalle anteriormente y, en consecuencia, se van a aplicar en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden ser cualquier molécula de ácido nucleico, en particular, moléculas de ADN o de ARN, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ARNm, etc. Éstas pueden ser moléculas que se dan de manera natural o moléculas producidas mediante procedimientos de síntesis genética o química. Pueden ser moléculas de cadena simple, que bien contienen la hebra codificante o la no codificante, o moléculas de cadena doble.

También se describen en el presente documento células vegetales de acuerdo con la invención y plantas de acuerdo con la invención en las que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en

- a) moléculas de ADN-T, que, debido a la integración en el genoma de la planta, llevan a un aumento en la expresión de al menos un gen OK1 (marcado de activación de ADN-T);
- b) moléculas de ADN que contienen transposones, que llevan a un aumento en la expresión de un gen OK1 por medio de la integración en el genoma de la planta. (marcado de activación de transposón);
- c) moléculas de ADN que codifican una proteína OK1 y que están enlazadas con secuencias reguladoras, que proporcionan las transcripciones en las células vegetales y que llevan a un aumento en la actividad de la proteína OK1 en la célula.
- d) moléculas de ácido nucleico introducidas por medio de mutagénesis *in vivo*, que llevan a una mutación o a una inserción de una secuencia heteróloga en al menos un gen endógeno que codifica una proteína OK1, en las que la mutación o inserción provoca un aumento en la expresión de un gen que codifica una proteína OK1.

En relación con la presente invención, las células vegetales y las plantas de acuerdo con la invención también se pueden crear mediante el uso de la, así llamada, mutagénesis de inserción (artículo general: Thorneycroft et y col., 2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601). La mutagénesis de inserción se entiende que significa de manera particular la inserción de transposones o el, así llamado, ADN de transferencia (ADN-T) en un gen o

cerca de un gen que codifica una proteína OK1, por lo cual, como resultado de esto, aumenta la actividad de una proteína OK1 en la célula en cuestión.

Los transposones pueden ser tanto aquellos que se dan de manera natural en la célula (transposones endógenos) como aquellos que no se dan de manera natural en dicha célula pero que se introducen en la célula (transposones heterólogos) por medio de procedimientos de ingeniería genética, tales como la transformación de la célula, por ejemplo. El cambio de la expresión de genes por medio de transposones es conocido por el experto en la materia. Una visión global del uso de transposones endógenos y heterólogos como herramientas en biotecnología de plantas se presenta en Ramachandran y Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252).

La mutagénesis de inserción de ADN-T se basa en el hecho de que ciertas secciones (ADN-T) de los plásmidos Ti de *Agrobacterium* se pueden integrar en el genoma de las células vegetales. El lugar de integración en el cromosoma de la planta no está definido, pero puede tener lugar en cualquier punto. Si el ADN-T se integra en una parte del cromosoma o cerca de una parte del cromosoma, que constituye una función génica, entonces esto puede llevar a un aumento en la expresión del gen y, por tanto, también a un cambio en la actividad de una proteína codificada mediante el gen en cuestión.

En el presente documento, las secuencias insertadas en el genoma (en particular, transposones o ADN-T) se distinguen por el hecho de que contienen secuencias, que llevan a una activación de las secuencias reguladoras de un gen OK1 ("marcado de activación").

Las células vegetales y las plantas de acuerdo con la invención se pueden producir por medio del, así llamado, procedimiento de "marcado de activación" (véase, por ejemplo, Walden y col., *Plant J.* (1991). 281-288; Walden y col., *Plant Mol. Biol.* 26 (1994), 1521-1528). Estos procedimientos se basan en la activación de promotores endógenos por medio de secuencias "potenciadoras", tales como el potenciador del promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor, o el potenciador de la octopina sintasa.

En relación con la presente invención, la expresión "marcado de activación de ADN-T" se entiende que significa un fragmento de ADN-T, que contiene secuencias "potenciadoras" y que lleva a un aumento en la actividad de al menos una proteína OK1 mediante la integración en el genoma de una célula vegetal.

En relación con la presente invención, la expresión "marcado de activación de transposón" se entiende que significa un transposón, que contiene secuencias "potenciadoras" y que lleva a un aumento en la actividad de al menos una proteína OK1 mediante la integración en el genoma de una célula vegetal.

En otra realización, las moléculas de ADN de acuerdo con la invención, que codifican una proteína OK1, se enlazan con secuencias reguladoras, que inician la transcripción en células vegetales (promotores) y que llevan a un aumento en la actividad de la proteína OK1 en la célula. En este caso, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención están presentes en la orientación "en sentido" a las secuencias reguladoras.

Para expresar las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que codifican una proteína OK1, estas se enlazan preferentemente con secuencias de ADN reguladoras, que garantizan la transcripción en células vegetales. En particular, éstas incluyen promotores. En general, cualquier promotor que está activo en las células vegetales es elegible para la expresión.

El promotor se puede elegir de manera que la expresión tenga lugar de manera constitutiva o solo en un tejido determinado, en una etapa determinada del desarrollo de la planta o en un momento determinado por influencias externas. El promotor puede ser homólogo o heterólogo, tanto con respecto a la planta con respecto a la molécula de ácido nucleico.

Los promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor y el promotor de ubiquitina del maíz para la expresión constitutiva, el promotor B33 de la patatina (Rocha-Sosa y col., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) para la expresión específica de tubérculos en patatas o un promotor, que solo asegura la expresión en tejidos fotosintéticamente activos, por ejemplo, el promotor ST-LS1 (Stockhaus y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus y col., *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451) o, para la expresión específica del endospermo del promotor HMG del trigo, el promotor USP, el promotor de faseolina, los promotores de genes de zeína del maíz (Pedersen y col., *Cell* 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio y col., *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93), el promotor de la glutelina (Leisy y col., *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 41-50; Zheng y col., *Plant J.* 4 (1993), 357-366; Yoshihara y col., *FEBS Lett.* 383 (1996), 213-218) o el promotor shrunken-1 (Werr y col., *EMBO J.* 4 (1985), 1373-1380). Sin embargo, también se pueden usar promotores, que solo se activan en un momento determinado mediante influencias externas (véase, por ejemplo, el documento WO 9307279). Los promotores de proteína de choque térmico, que permiten inducción simple, pueden ser de interés particular en el presente documento. Además, se pueden usar los promotores específicos de semillas, tales como el promotor USP de Vicia faba, que garantiza una expresión específica de semilla en Vicia faba y otras plantas (Fiedler y col., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669-679; Bäumllein y col., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459-467).

Además, puede estar presente una secuencia de terminación (señal de poliadenilación), que se usa para añadir una cola de poli(A) al transcrito. A la cola de poli(A) se le atribuye una función en la estabilización de los transcritos. Los elementos de este tipo se describen en la bibliografía (véase Gielen y col., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) y se pueden intercambiar a voluntad.

Las secuencias de intrones también pueden estar presentes entre el promotor y la región codificante. Tales

secuencias de intrones pueden llevar a la estabilidad de la expresión y a una expresión aumentada en plantas (Callis y col., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, y Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, y col., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose y Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil y col., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU y col., 2003, Science in China Series C Vol.46 N° 6, 561-569). Las secuencias de intrón adecuadas son, por ejemplo, el primer intrón del gen sh1 del maíz, el primer intrón del gen 1 de la poliubiquitina del maíz, el primer intrón del gen EPSPS del arroz o uno de los dos primeros intrones del gen PAT1 de Arabidopsis.

Además, las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención se pueden crear por medio de la, así llamada, "activación *in situ*". En este caso, la modificación genética introducida efectúa un cambio en las secuencias reguladoras de los genes OK1 endógenos, que lleva a una expresión aumentada de genes OK1. Preferentemente, la activación de un gen OK1 tiene lugar mediante mutagénesis "*in vivo*" de un promotor o de secuencias "potenciadoras" de un gen OK1 endógeno. Al hacerlo, un promotor o una secuencia "potenciadora", por ejemplo, se puede cambiar de tal forma que la mutación producida lleva a una expresión aumentada de un gen OK1 en células vegetales de acuerdo con la invención o en plantas de acuerdo con la invención en comparación con la expresión de un gen OK1 en células vegetales de tipo silvestre o en plantas de tipo silvestre. La mutación en un promotor o una secuencia "potenciadora" también puede llevar a genes OK1 en células vegetales de acuerdo con la invención o plantas de acuerdo con la invención que se expresan en un momento en el que no se expresarían en células vegetales de tipo silvestre o en plantas de tipo silvestre.

En relación con la presente invención, la expresión "gen OK1" se entiende que significa una molécula de ácido nucleico (ADNc, ADN), que codifica una proteína OK1, preferentemente una proteína OK1 de plantas que almacenan almidón, más preferentemente de *Arabidopsis thaliana*, y lo más preferentemente de arroz.

Durante la, así llamada, mutagénesis "*in vivo*", un oligonucleótido ARN-ADN híbrido ("quimeroplasto") se introduce en las células vegetales por medio de transformación (Kipp, P.B. y col., Sesión de posters en el "5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21-27 de septiembre, 1997, Singapur; R. A. Dixon y C.J. Arntzen, Informe de la reunión en "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, EE.UU, TIBTECH 15, (1997), 441-447; patente internacional WO 9515972; Kren y col., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss y col., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham y col., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Una parte de los componentes del nucleótido ARN-ADN es homóloga con una secuencia de ácido nucleico de un gen OK1 endógeno, pero, en comparación con la secuencia de ácido nucleico de un gen OK1 endógeno, tiene una mutación o contiene una región heteróloga, que está rodeada por las regiones homólogas.

Por medio de un apareamiento de bases de las regiones homólogas del oligonucleótido ARN-ADN y de la molécula de ácido nucleico endógena, seguido de una recombinación homóloga, la mutación contenida en el componente de ADN del oligonucleótido ARN-ADN o la región heteróloga se pueden transferir en el genoma de una célula vegetal. Esto lleva a un aumento en la actividad de una o más proteínas OK1.

Todos estos procedimientos se basan en la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de una célula vegetal o planta y son, por tanto, básicamente adecuados para la producción de células vegetales de acuerdo con la invención y de plantas de acuerdo con la invención.

De manera sorprendente, se ha descubierto que las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado en comparación con el almidón de las correspondientes células vegetales de tipo silvestre o las plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

Las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado, que en sus características físico-químicas, en particular, el contenido en fosfato de almidón o la distribución del fosfato, hay cambios en comparación con el almidón sintetizado en las células vegetales o las plantas de tipo silvestre, de manera que esto se adecua mejor a las aplicaciones especiales.

Como anteriormente no se han descrito enzimas, que fosforilan almidón-P de manera exclusiva, tampoco ha sido posible anteriormente aumentar el contenido en fosfato de almidón del almidón ya fosforilado en plantas sobre un cierto nivel. Esto es posible en la actualidad mediante el uso de una proteína de acuerdo con la invención o un ácido nucleico de acuerdo con la invención para la modificación genética de plantas.

Tampoco fue posible distribuir fosfatos en el almidón sintetizado por las plantas, debido a la ausencia de medios disponibles. Debido a la obtención de proteínas y ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, en la actualidad también es posible alterar la proporción de fosfato en almidones naturales.

Por lo tanto, la presente invención también incluye células vegetales y plantas de acuerdo con la invención, que sintetizan un almidón modificado en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre y plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

En relación con la presente invención, la expresión "almidón modificado" debería entenderse que significa que el almidón presenta características físico-químicas cambiadas en comparación con el almidón sin modificar, que se puede obtener a partir de las correspondientes células vegetales de tipo silvestre o plantas de tipo silvestre.

En una realización adicional de la presente invención, las células vegetales o las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón, que contiene un alto contenido de fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato

alterada en comparación con el almidón que se ha aislado de las correspondientes células vegetales de tipo silvestre y plantas de tipo silvestre.

5 En relación con la actual invención, la expresión "distribución de fosfato" debería entenderse que significa la proporción de fosfato de almidón unida a una molécula de glucosa en la posición C-2, en la posición C-3 o en la posición C-6, con respecto al contenido total de fosfato de almidón en el almidón.

10 En una realización adicional de la presente invención, las células vegetales o las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón, que presentan una proporción alterada de fosfato en C-3 frente al fosfato en C-6 en comparación con el almidón de plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente. Lo preferente en el presente documento son almidones, que tienen una proporción aumentada de fosfato de almidón unida en la posición C-3 en comparación con el fosfato de almidón unido en la posición C-6 en comparación con los almidones de células vegetales de tipo silvestre y de plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

15 En relación con la presente invención, la expresión "proporción de fosfato en C-3 frente a fosfato en C-6" debería entenderse que significa la cantidad de fosfato de almidón, cuyo fosfato de almidón unido a un alfa-1,4-glucano en la posición C-3 o en la C-6, respectivamente, contribuye al sumatorio del fosfato de almidón unido al alfa-1,4-glucano en la posición C-3 y en la posición C-6 (posición C-3 + posición C-6).

20 Se describen diferentes procedimientos para determinar la cantidad de fosfato de almidón. Preferentemente, se puede usar el procedimiento para determinar la cantidad de fosfato de almidón descrito por Ritte y col. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185. Particular y preferentemente, la determinación de la cantidad de fosfato de almidón por medio de ³¹P-NMR se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Kasemusuan y Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707).

Además, un objeto de la invención son las plantas modificadas genéticamente, que contienen células vegetales de acuerdo con la invención. Estos tipos de plantas se pueden producir a partir de células vegetales de acuerdo con la invención mediante regeneración.

25 En principio, las plantas de acuerdo con la invención pueden ser plantas de cualquier especie vegetal, es decir, tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Preferentemente son plantas útiles, es decir, plantas, que se cultivan por las personas con fines alimenticios o técnicos, en particular, propósitos industriales.

En una realización adicional, la planta de acuerdo con la invención es una planta que almacena almidón.

30 En relación con la presente invención, la expresión "plantas que almacenan almidón" significa todas las plantas con partes de plantas, que contienen un almacenamiento de almidón, tales como, por ejemplo, maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, sagú, frijol mungo, guisante o sorgo.

En relación con la presente invención, la expresión "planta de la patata" o "patata" significa la especie vegetal del género *Solanum*, particularmente especies que producen tubérculos del género *Solanum*, y en particular, *Solanum tuberosum*.

35 En relación con la presente invención, la expresión "planta del trigo" significa especies vegetales del género *Triticum* o plantas que resultan de cruces con plantas del género *Triticum*, particularmente, especies vegetales del género *Triticum* o plantas que resultan de cruces con plantas del género *Triticum*, que se usan en agricultura con fines comerciales y particular y preferentemente *Triticum aestivum*.

40 En relación con la presente invención, la expresión "planta del maíz" significa especies vegetales del género *Zea*, particularmente especies vegetales del género *Zea*, que se usan en agricultura con fines comerciales, particular y preferentemente *Zea mais*.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a plantas de almacenamiento de almidón de acuerdo con la invención de la familia (sistemática) *Poaceae*. Estas son preferentemente plantas del maíz o del trigo.

La presente invención también se refiere a material de propagación de plantas de acuerdo con la invención que contiene una célula vegetal de acuerdo con la invención.

45 En el presente documento, la expresión "material de propagación" incluye aquellos constituyentes de la planta que son adecuados para producir descendencia por medios vegetativos o sexuales. Los esquejes, cultivos de callos, rizomas o tubérculos, por ejemplo, son adecuados para la propagación vegetal. Otro material de propagación incluye, por ejemplo, frutos, semillas, plántulas, protoplastos, cultivos celulares, etc. Preferentemente, el material de propagación son tubérculos y particular y preferentemente, cereales, que contienen endospermos.

50 En una realización adicional, la presente invención se refiere a partes de planta que se pueden cosechar de las plantas de acuerdo con la invención tal como frutos, raíces de almacenamiento, raíces, florecimientos, brotes, rebrotes o vástagos, preferentemente semillas, cereales o tubérculos, en los que estas partes que se pueden cosechar contienen células vegetales de acuerdo con la invención.

Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de una planta modificada genéticamente en la que

a) una molécula de ácido nucleico extraña se introduce en el genoma de una célula vegetal, en la que la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína P-glucan-agua-diquinasa, que significa una proteína que requiere almidón ya fosforilado como sustrato, en la que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en:

i) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;

ii) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, que incluye la secuencia de aminoácidos, que se codifica mediante la inserción en el plásmido DSM16264 o la inserción en el plásmido DSM16302;

iii) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;

iv) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos, que está codificada por la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16264 o mediante la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16302;

v) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;

vi) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido DSM16264 o en el plásmido DSM16302;

vii) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en i), ii), v) o vi);

viii) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en i), ii), iv), v) o vi) bajo condiciones rigurosas;

ix) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en i), ii), v) o vi) debido a la degeneración del código genético; y

x) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en i), ii), iii), iv), v), vi), vii), viii) o ix).

b) una planta se regenera a partir de células vegetales de la etapa a) y

c) en caso necesario, las plantas adicionales se producen con la ayuda de las plantas de acuerdo con la etapa b).

La regeneración de las plantas de acuerdo con la etapa (b) se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, los descritos en "Plant Cell Culture Protocols", 1999, ed. por R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

La producción de plantas adicionales de acuerdo con la etapa (c) del procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante propagación vegetativa (por ejemplo, usando esquejes, tubérculos o por medio de cultivos de callos y regeneración de plantas completas).

En una realización adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para crear una planta modificada genéticamente de acuerdo con la invención para la producción de plantas que almacenan almidón.

En una realización adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se usa para producir plantas de maíz o de trigo de acuerdo con la invención.

En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en

a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;

b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos, que está codificada mediante la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGE o la inserción en el plásmido pM150;

c) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;

d) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % de la secuencia de aminoácidos que está codificada por la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o la inserción en el plásmido pM150;

e) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;

f) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o en el plásmido pM150;

g) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de ácido nucleico tiene una identidad de al menos el 70% con las secuencias de ácido nucleico descritas en a), b), e) o f);

h) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico

descritas en a), b), e), o f) bajo condiciones rigurosas;

i) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en a), b), o f) debido a la degeneración del código genético, y

5 j) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en a), b), c), d), e), f), g), h) o i).

En el procedimiento descrito en el presente documento, la molécula de ácido nucleico extraña también se puede elegir del grupo que consiste en

a) moléculas de ADN-T, que llevan a un aumento en la expresión de un gen OK1 a través de la integración en el genoma de la planta (marcado de activación de ADN-T);

10 b) moléculas de ADN, que contienen transposones que llevan a un aumento en la expresión de un gen OK1 a través de la integración en el genoma de la planta (marcado de activación de transposón);

c) moléculas de ADN, que codifican una proteína OK1 y están enlazadas con secuencias reguladoras que garantizan (inician) las transcripciones en las células vegetales, y que llevan a un aumento en la actividad de una proteína OK1 en la célula;

15 d) moléculas de ácido nucleico introducidas por medio de mutagénesis *in vivo*, que llevan a una mutación o a una inserción en una secuencia heteróloga en al menos un gen OK1 endógeno, en las que la mutación o inserción provoca un aumento en la expresión de un gen OK1.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de acuerdo con la invención, en el que la planta modificada genéticamente sintetiza un almidón modificado en comparación con el almidón de las plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

20 En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado, que tiene un mayor contenido en fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato modificada en comparación con el almidón aislado de las correspondientes plantas de tipo silvestre.

25 En una realización adicional del procedimiento de acuerdo con la invención, las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado, que tiene una proporción modificada de fosfato en C-3 frente al fosfato en C-6 en comparación con el almidón de plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente. Lo particularmente preferido en el presente documento son almidones, que tienen una proporción aumentada de fosfato de almidón unida en la posición C-3 en comparación con el fosfato de almidón unido en la posición C-6 en comparación con los almidones de plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

30 La presente invención también se refiere a las plantas que se pueden obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la invención.

De manera sorprendente, se ha descubierto que el almidón aislado a partir de células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención, que tienen una actividad aumentada de una proteína OK1, sintetizan un almidón modificado.

35 En particular, las elevadas cantidades de fosfato de almidón en los almidones de acuerdo con la invención proporcionan los almidones con propiedades sorprendentes y ventajosas. Los almidones de acuerdo con la invención tienen una elevada proporción de grupos cargados debido a la elevada proporción de fosfato de almidón, que afecta de manera considerable a las propiedades funcionales. El almidón que contiene grupos funcionales cargados se puede usar de manera particular en la industria del papel, en la que se utiliza para el recubrimiento del papel. El papel, que está recubierto con moléculas cargadas que también presentan buenas propiedades adhesivas, es particularmente adecuado para la absorción de pigmentos, tales como colorante, tintas de impresión, etc., por ejemplo.

40 La presente invención también describe almidones modificados que se pueden obtener a partir de células vegetales de acuerdo con la invención o plantas de acuerdo con la invención, a partir del material de propagación de acuerdo con la invención o de partes de la planta que se pueden cosechar de acuerdo con la invención.

La presente invención describe almidón modificado de plantas que almacenan almidón, preferentemente de plantas que almacenan almidón de la familia (sistemática) Poaceae, particular y preferentemente, de plantas de maíz o trigo.

45 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un almidón modificado que incluye la etapa de extracción del almidón de una célula vegetal de acuerdo con la invención o de una planta de acuerdo con la invención, a partir del material de propagación de acuerdo con la invención de tal planta y/o de partes de la planta que se pueden cosechar de acuerdo con la invención, preferentemente de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención de tal planta. Preferentemente, tal procedimiento también incluye la etapa de cosechar las plantas cultivadas o las partes de la planta y/o el material de propagación de estas plantas antes de la extracción del almidón y, además, particular y preferentemente la etapa de cultivar plantas de acuerdo con la invención antes de la cosecha.

55 Los procedimientos para extraer almidones de plantas o de partes de almacenamiento de almidón de las plantas son conocidos por el experto en la materia. Además, los procedimientos para extraer almidón de diferentes plantas que

almacenan almidón se describen, por ejemplo, en Starch: Chemistry and Technology (Publisher: Whistler, BeMiller and Paschall (1994), 2^a Edición, Academic Press Inc. Londres Ltd; ISBN 0-12-746270-8; véase, por ejemplo Capítulo XII, páginas 412-468: Maize and Sorghum Starches: Manufacture; por Watson; Capítulo XIII, páginas 469-479: Tapioca, Arrowroot and Sago Starches: Manufacture; por Corbishley y Miller; Capítulo XIV, páginas 479-490: Potato starch: Manufacture and Uses; por Mitch; Capítulo XV, páginas 491 a 506: Wheat starch: Manufacture, Modification and Uses; por Knight y Oson; y Capítulo XVI, páginas 507 a 528: Rice starch: Manufacture and Uses; por Rohmer y Klem; Maize starch: Eckhoff y col., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, la extracción de almidón de maíz a escala industrial se logra de manera general mediante la, así llamada, "molienda en húmedo"). Los dispositivos, que son de uso común en procedimientos para extraer almidón de material vegetal son separadores, decantadores, hidrociclones, secadores por pulverización y secadores de lecho fluidizado.

En relación con la presente invención, la expresión "partes de almacenamiento de almidón" se entiende que significa tales partes de una planta en las que, en contraste con el almidón transitorio de la hoja, el almidón se almacena como un depósito para la supervivencia durante períodos más largos. Las partes preferidas de la planta que almacenan almidón son, por ejemplo, tubérculos, raíces de almacenamiento y cereales, los particularmente preferidos son cereales que contienen un endospermo, especial y particularmente preferidos son los cereales que contienen un endospermo de plantas de maíz o de trigo.

En una realización, el almidón modificado descrito en el presente documento es almidón natural.

En relación con la presente invención, la expresión "almidón natural" significa que el almidón se aísla de plantas de acuerdo con la invención, plantas de la planta que se puede cosechar de acuerdo con la invención, partes de almacenamiento de almidón de acuerdo con la invención o material de propagación de plantas de acuerdo con la invención mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia.

Además, el uso de células vegetales de acuerdo con la invención o plantas de acuerdo con la invención para la producción de un almidón modificado son la materia objeto de la presente invención.

El experto en la materia sabe que las características del almidón se pueden cambiar mediante derivación térmica, química, enzimática o mecánica, por ejemplo. Los almidones derivados son particularmente adecuados para diferentes aplicaciones en el sector de los productos alimenticios y en el de los productos no alimenticios. Los almidones de acuerdo con la invención se adecuan mejor para ser una sustancia inicial para la producción de almidones derivados que los almidones convencionales, dado que presentan una mayor proporción de grupos funcionales reactivos debido al contenido aumentado en fosfato de almidón.

En relación con la presente invención, la expresión "almidón derivado" se entiende que significa un almidón modificado de acuerdo con la invención, cuyas características se han cambiado tras el aislamiento a partir de células vegetales con la ayuda de procedimientos químicos, enzimáticos, térmicos o mecánicos.

Los almidones derivados descritos en el presente documento son adecuados para diferentes aplicaciones en la industria farmacéutica y en el sector de los productos alimenticios y en el de los productos no alimenticios. Los procedimientos para la producción de almidones derivados son conocidos por el experto en la materia y se describen de manera adecuada en la bibliografía general. Se puede encontrar una visión global de la producción de almidones derivados, por ejemplo, en Orthoefer (en Corn, Chemistry and Technology, 1987, Eds. Watson y Ramstad, Capítulo 16, 479-499).

Las partes de las plantas que almacenan almidón a menudo se transforman en harinas. Los ejemplos de partes de plantas a partir de las cuales se producen harinas, por ejemplo, son los tubérculos de las plantas de la patata y los cereales de plantas de cereal. Para la producción de harinas a partir de plantas de cereales, los cereales que contienen el endospermo de estas plantas se trituran y se debilitan. El almidón es el constituyente principal del endospermo. En el caso de otras plantas, que no contienen endospermo y que contienen otras partes de almacenamiento de almidón en su lugar, como tubérculos o raíces, por ejemplo, la harina se produce con frecuencia mediante troceado, secado y posterior molienda de los órganos de almacenamiento en cuestión. El almidón del endospermo o contenido en las partes de almacenamiento de almidón de las plantas es una parte fundamental de la harina, que se produce a partir de estas partes de la planta, respectivamente. Las características de las harinas están, por tanto, afectadas por el almidón presente en la respectiva harina. Las células vegetales de acuerdo con la invención y las plantas de acuerdo con la invención sintetizan un almidón modificado en comparación con las células vegetales de tipo silvestre y las plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente. Las harinas producidas a partir de células vegetales de acuerdo con la invención, las plantas de acuerdo con la invención, el material de propagación de acuerdo con la invención o las partes que se pueden cosechar de acuerdo con la invención, presentan, por tanto, propiedades modificadas. Las propiedades de las harinas también pueden estar afectadas por la mezcla de almidón con harinas o por la mezcla de harinas con diferentes propiedades.

Por lo tanto, en el presente documento se describen harinas, que contienen un almidón de acuerdo con la invención.

En el presente documento se describen harinas, que se han producido a partir de células vegetales de acuerdo con la invención, las plantas de acuerdo con la invención, a partir de partes de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención, a partir de material de propagación de acuerdo con la invención o de partes de planta que

se pueden cosechar de acuerdo con la invención. Las partes preferidas de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención son tubérculos, raíces de almacenamiento y cereales que contienen un endospermo. Los tubérculos preferentemente provienen de plantas de la patata, y los cereales preferentemente provienen de plantas de la familia (sistemática) Poaceae, mientras que los cereales particular y preferentemente, provienen de plantas de maíz o trigo.

En relación con la presente invención, el término "harina" se entiende que significa un polvo obtenido mediante molienda de partes de plantas. Las partes de las plantas posiblemente se secan antes de la molienda y se trocean y/o debilitan después de la molienda.

Las harinas descritas en el presente documento se caracterizan porque contienen almidón, que presenta un contenido en fosfato modificado y/o una distribución de fosfato modificado particularmente debido a su elevada capacidad de unión al agua. Esto es deseable en el procesado de harinas en la industria de los productos alimenticios para muchas aplicaciones y en particular en la producción de productos horneados, por ejemplo.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para la producción de harinas, incluyendo la etapa de moler células vegetales de acuerdo con la invención, plantas de acuerdo con la invención, partes de plantas de acuerdo con la invención, partes de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención, material de propagación de acuerdo con la invención o material que se puede cosechar de acuerdo con la invención.

Las harinas se pueden producir mediante la molienda de las partes de las plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención. Los procedimientos para la producción de harinas son conocidos por el experto en la materia. Un procedimiento para la producción de harinas preferentemente incluye la etapa de cosechar las plantas cultivadas o partes de la planta y/o el material de propagación o las partes de almacenamiento de almidón de estas plantas antes de la molienda y particular y preferentemente, incluye la etapa adicional de cultivar plantas de acuerdo con la invención antes de cosecharlas.

En relación con la presente invención, la expresión "partes de plantas" debe entenderse que significa todas las partes de las plantas que, como constituyentes, constituyen una planta completa en su totalidad. Las partes de las plantas son vástagos, hojas, rizomas, raíces, protuberancias, tubérculos, vainas, semillas o cereales.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento para la producción de las harinas incluye el procesamiento de las plantas de acuerdo con la invención, de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención, de material de propagación de acuerdo con la invención o material que se puede cosechar de acuerdo con la invención antes de la molienda.

En este caso, el procesamiento puede ser un tratamiento térmico y/o un secado, por ejemplo. El tratamiento térmico seguido de un secado del material tratado con calor se usa en la producción de harinas a partir de raíces de almacenamiento o tubérculos tales como los tubérculos de patata, por ejemplo, antes de la molienda. El troceado de plantas de acuerdo con la invención, de partes de plantas que almacenan almidón de acuerdo con la invención, de material de propagación de acuerdo con la invención o de material que se puede cosechar de acuerdo con la invención antes de la molienda también puede representar al procesamiento en el sentido de la presente invención. La retirada del tejido vegetal antes de la molienda, tal como por ejemplo, las cáscaras de los cereales, también representa el procesamiento antes de la molienda en el sentido de la presente invención.

En una realización adicional de la presente invención, el procedimiento para la producción de las harinas incluye el procesamiento del producto molido tras la molienda.

En este caso, el producto molido se puede trocear tras la molienda, por ejemplo, con el fin de producir diversos tipos de harinas, por ejemplo.

Un tema adicional de la presente invención es el uso de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con la invención o plantas de acuerdo con la invención para la producción de harinas.

También es objeto de la presente invención proporcionar medios tales como moléculas de ADN, por ejemplo, para la producción de células vegetales de acuerdo con la invención y plantas de acuerdo con la invención, que sintetizan un almidón modificado en comparación con células vegetales de tipo silvestre modificadas plantas de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

La presente invención, por tanto, se refiere a moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la actividad enzimática de una proteína OK1, seleccionada entre el grupo que consiste en

- a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
- b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína que incluye la secuencia de aminoácidos, que está codificada mediante la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o la inserción en el plásmido pMI50;
- c) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
- d) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60

% con la secuencia de aminoácidos, que está codificada mediante la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o la inserción en el plásmido DSM pMI50;

e) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos especificada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;

5 f) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o en el plásmido pMI50;

g) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 70% con las secuencias de ácido nucleico descritas en a), b), e) o f);

10 i) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en a), b), e), o f) bajo condiciones rigurosas;

h) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico especificada en a), b), e) o f) debido a la degeneración del código genético; y

j) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico especificadas en a), b), c), d), e), f), g), h) o i).

15 Básicamente, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, se pueden originar a partir de cualquier planta, preferentemente se originan de plantas que almacenan almidón, preferentemente de plantas de patata, cebada, sorgo, trigo o arroz, particular y preferentemente, de plantas de *Arabidopsis* o de plantas del arroz, y más particular y preferentemente de *Oryza sativa*.

20 Además, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico de al menos 21, preferentemente más de 50 y particular y preferentemente, más de 200 nucleótidos de longitud, que hibridan de manera específica con al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En el presente documento, que hibrida de manera específica significa que estas moléculas hibridan con moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína de acuerdo con la invención, pero no con moléculas de ácido nucleico, que codifican otras proteínas. En particular, la invención se refiere a tales moléculas de ácido nucleico, que hibridan con transcritos de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención y, como resultado, pueden obstaculizar su traducción. Tales moléculas de ácido nucleico, que hibridan de manera específica con las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, pueden, por ejemplo, ser constituyentes de ARNi antisentido o construcciones de co-supresión o ribozimas o se pueden usar como cebadores para la amplificación por PCR.

30 Además, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico recombinante que contienen una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

35 En relación con la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se entiende que significa una molécula de ácido nucleico, que contiene secuencias adicionales además de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que no se dan de manera natural en la combinación en la que se dan en los ácidos nucleicos recombinantes de acuerdo con la invención. En el presente documento, las secuencias adicionales mencionadas anteriormente pueden ser cualquier secuencia, preferentemente son secuencias reguladoras (promotores, señales de terminación, potenciadores), particular y preferentemente son secuencias reguladoras que están activas en el tejido vegetal y de manera especial, particular y preferentemente, son secuencias reguladoras que están activas en el tejido vegetal, en el que se sintetiza el almidón de almacenamiento. Los procedimientos para la producción de moléculas de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención son conocidos por el experto en la materia e incluyen procedimientos genéticos tales como la unión de moléculas de ácido nucleico por medio de ligadura, recombinación genética o nuevas síntesis de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo (véase, por ejemplo Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5ª edición (2002), ISBN: 0471250929).

45 Una realización adicional de moléculas de ácido nucleico recombinante de la presente invención son vectores, en particular, plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores habituales en la tecnología genética, que contienen las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención descrita anteriormente.

50 En una realización adicional, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención contenidas en los vectores están enlazadas con secuencias reguladoras, que inician la expresión en células procariontas o eucariotas. En el presente documento, el término "expresión" puede significar tanto transcripción como traducción. Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden tener una orientación en "sentido" y/o una orientación en "antisentido" con respecto a las secuencias reguladoras.

55 Las secuencias reguladoras para la expresión en organismos procariontas, por ejemplo, *E. coli*, y en organismos eucariotas están suficientemente descritas en la bibliografía, en particular, se han descrito aquellas para la expresión en levaduras, tales como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*. Una visión global de diversos sistemas para la expresión de proteínas en diversos organismos hospedadores se puede encontrar, por ejemplo, en Methods in Enzymology 153 (1987), 383-516 y en Bitter y col. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544).

Un aspecto adicional de la presente invención es una célula hospedadora, particularmente, una célula procarionta o eucariota, que está modificada genéticamente con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o

con un vector de acuerdo con la invención, así como células que se originan a partir de estos tipos de células hospedadoras y que contienen la modificación genética de acuerdo con la invención.

5 En una realización adicional, la invención se refiere a células hospedadoras, particularmente, células procariotas o eucariotas, que se transformaron con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o con un vector de acuerdo con la invención, así como células hospedadoras, que se originan a partir de estos tipos de células hospedadoras y que contienen las moléculas de ácido nucleico descritas de acuerdo con la invención o vectores.

10 Las células hospedadoras pueden ser células de bacterias (por ejemplo, *E. coli*, bacterias del género *Agrobacterium*, particularmente *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*) o células fúngicas (por ejemplo, levaduras, particularmente, *S. cerevisiae*, *Agaricus*, en particular *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), así como células vegetales o animales. En el presente documento, la expresión "se transforma" significa que las células de acuerdo con la invención están modificadas genéticamente con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, en la medida en que contienen al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención además de su genoma natural. Esto puede darse libremente en la célula, posiblemente como una molécula que se replica a sí misma, o puede integrada de manera estable en el genoma de la célula hospedadora.

15 Las células hospedadoras de los microorganismos son preferibles. En el marco de la presente solicitud de patente, se entiende que esto incluye a todas las bacterias y todos los protistas (por ejemplo, hongos, en particular, levaduras, y algas), tal como se definen en Schlegel "General Microbiology " (Georg Thieme Publishing House (1985), 1-2), por ejemplo.

20 Las células hospedadoras adicionales de acuerdo con la invención son células vegetales. En principio, éstas pueden ser células vegetales de cualquier especie vegetal, es decir, tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Éstas son preferentemente células vegetales de plantas con utilidad agrícola, es decir, de plantas, que se cultivan por los seres humanos con fines nutricionales, técnicos o particularmente industriales. La invención se refiere preferentemente a células vegetales y plantas a partir de plantas que almacenan almidón (maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, sagú, frijol mungo, guisante o sorgo); en particular, células vegetales de plantas de la familia (sistemática) Poacea, particular y preferentemente, de células vegetales de plantas del maíz y del trigo.

25 Las composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, también son la materia objeto de la presente invención. Las composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, y una célula hospedadora son preferidas. Particular y preferentemente, la célula hospedadora es una célula vegetal, más particular y preferentemente, una célula de plantas de maíz o trigo.

30 Un aspecto adicional de las composiciones de acuerdo con la invención se refiere a composiciones, que se pueden usar para producir células hospedadoras de acuerdo con la invención, preferentemente para producir células vegetales de acuerdo con la invención. Preferentemente, esto es una composición que contiene una moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, y un vehículo biolístico, que es adecuado para la introducción de una moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula hospedadora. Los vehículos biolísticos preferidos son partículas de tungsteno, oro o materiales sintéticos.

35 Una realización adicional de composiciones de acuerdo con la invención se refiere a composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, y una célula vegetal y un medio de cultivo sintético. Preferentemente, tales composiciones también contienen polietilenglicol (PEG) además de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, células vegetales y un medio de cultivo sintético. En el caso de estas composiciones, la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención se da fuera de la célula vegetal, es decir, está localizada fuera del interior celular de la célula vegetal, que está encerrado mediante una membrana citoplasmática.

40 Los medios de cultivo sintéticos, que son adecuados para el cultivo y/o la transformación de células vegetales, son conocidos por el experto en la materia y están suficientemente descritos en la bibliografía, por ejemplo. Muchos medios de cultivo sintéticos también están disponibles para la compra en el comercio especializado (por ejemplo, DUCHEFA Biochemie B.V., Bélgica).

45 Una realización adicional de las composiciones de acuerdo con la invención se refiere a composiciones, que se usan para la identificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Preferentemente, tales composiciones contienen moléculas de ácido nucleico adicionales, además de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención, particularmente, las moléculas de ácido nucleico de origen vegetal, que se pueden dar en la forma de ADN genómico, ARNm o como clones en las, así llamadas, bibliotecas de ADN. Las bibliotecas de ADN, que se dan como cósmidos, fagémidos, plásmidos, YAC o BAC son preferidos. Las bibliotecas de ADN pueden contener tanto ADN genómico como ADNc. Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, moléculas de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la invención, o un vector de acuerdo con la invención se usan en estas

composiciones, preferentemente como una muestra de hibridación.

En el presente documento se desvela una proteína, que presenta actividad fosforilante de almidón y que requiere almidón fosforilado como un sustrato. Preferentemente, ésta es una proteína, que presenta actividad fosforilante de almidón fosforilado y que requiere almidón fosforilado como un sustrato.

- 5 Una realización adicional de la invención se refiere a una proteína, que presenta actividad fosforilante de almidón y requiere almidón fosforilado como un sustrato, en el que la proteína presenta un dominio de fosfohistidina que tiene una identidad de al menos el 70 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 5.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que requiere almidón fosforilado como un sustrato y transfiere un fosfato residual de ATP al almidón fosforilado. Preferentemente, una proteína de acuerdo con la invención transfiere el fosfato beta residual de ATP al almidón fosforilado. Particular y preferentemente, una proteína de acuerdo con la invención transfiere el fosfato beta residual del ATP al almidón fosforilado y el fosfato gamma residual de ATP al agua y por tanto, posee la actividad de una [fosforilado-alfa-1,4-glucan]-agua-diquinasa o una [fosforilado-almidón]-agua-diquinasa.

10

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que se acumula como un producto intermediario fosforilado cuando se transfiere fosfato residual al almidón fosforilado.

15

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que presenta una actividad aumentada de unión a almidón fosforilado en comparación con el almidón no fosforilado.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que introduce más uniones de monoéster de fosfato adicionales en la posición C-3 en comparación con las uniones de monoéster de fosfato en la posición C-6 de las moléculas de glucosa de un almidón fosforilado.

20

Preferentemente, al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 60 %, particular y preferentemente al menos el 90 % y lo más preferentemente al menos el 120 % más de uniones de monoéster de fosfato en la posición C-3 de las moléculas de glucosa de un almidón fosforilado se introducen en comparación con las uniones de monoéster de fosfato en la posición C-6 de las moléculas de glucosa de un almidón fosforilado.

Un tema adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que presenta un peso molecular derivado de la secuencia de aminoácidos de 120 kDa a 145 kDa, preferentemente de 120 kDa a 140 kDa, particular y preferentemente, de 125 kDa a 140 kDa y lo más especial y preferentemente, de 130 kDa a 135 kDa.

25

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que presenta un dominio de fosfohistidina. El dominio de fosfohistidina preferentemente contiene dos histidinas residuales.

30

Un aspecto adicional de la presente invención son proteínas de acuerdo con la invención elegidas del grupo que consiste en

- 35 a) Proteínas, que incluyen la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
 b) Proteínas, que están codificadas por la región codificante del ADN insertado en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o pMI50; o
 c) Proteínas, que presentan una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos de las proteínas especificadas en a) o b).

En una realización adicional, la presente invención se refiere a proteínas de acuerdo con la invención con actividad fosforilante de almidón fosforilado, en la que la proteína codificada presenta una identidad de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, particular y preferentemente al menos el 90 % y más particular y preferentemente al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4 o con la secuencia de aminoácidos de una proteína OK1 codificada por la inserción en el plásmido A.t.-OK1-pGEM o en el plásmido pMI50.

40

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína presenta un dominio de fosfohistidina. Preferentemente, la proteína de acuerdo con la invención presenta un dominio de fosfohistidina, que tiene una identidad de preferentemente al menos el 70 %, particular y preferentemente de al menos el 80 % y más particular y preferentemente, de al menos el 90 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 5.

45

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, en la que la proteína se origina a partir de una planta de *Arabidopsis* o de arroz.

50

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una proteína de acuerdo con la invención, que presenta una actividad aumentada de unión a almidón fosforilado en comparación con el almidón no fosforilado, en la que la actividad de unión a almidón fosforilado se aumenta por al menos tres veces, preferentemente al menos

cuatro veces, particular y preferentemente, al menos cinco veces y más particular y preferentemente al menos seis veces, en comparación con la actividad de unión de un almidón no fosforilado.

En una realización adicional, la invención también se refiere a proteínas, que están codificadas por moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

5 **Descripción de secuencias**

SEQ ID NO 1: Secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de las proteínas A.t.-OK1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia se inserta en los vectores A.t.-OK1-pGEM y OK1-pDEST17.

SEQ ID NO 2: secuencia de aminoácidos que codifica la proteína A.t.-OK1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia puede derivar de la secuencia de ácido nucleico especificada en la SEQ ID NO 1.

10 SEQ ID NO 3: Secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de la proteína O.s.-OK1 de *Oryza sativa*. Esta secuencia se inserta en el vector pMI50.

SEQ ID NO 4: Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína O.s.-OK1 de *Oryza sativa*. Esta secuencia puede derivar de la secuencia de ácido nucleico especificada en la SEQ ID NO 3.

15 SEQ ID NO 5: Secuencia de péptidos que codifica el dominio de fosfohistidina de las proteínas OK1 de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*.

Descripción de las figuras

Fig. 1: Gel de acrilamida desnaturizante para la identificación de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, que preferentemente se unen a almidón no fosforilado en comparación con el almidón fosforilado. Un marcador de peso molecular de proteína convencional se muestra en la traza "M". Las proteínas obtenidas tras la incubación de la preparación control C del Ejemplo 1 d) se muestran en la traza "-". Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos tras la incubación con almidón no fosforilado, aislado a partir de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3* (Preparación B, ejemplo 1 d) se muestran en la traza "K". Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos tras la incubación con almidón, aislado a partir de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3*, que se fosforiló de manera retrospectiva *in vitro* con una proteína R1 (Preparación A, Ejemplo 1 d) se muestran en la traza "P". Al finalizar la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con azul de Coomassie.

Fig. 2: Demostración de la autofosforilación de la proteína OK1. La Fig. 2 A) muestra un gel de acrilamida desnaturizante (SDS) en la finalización de la electroforesis teñido con azul de Coomassie. La Fig. 2 B) muestra la autorradiografía de un gel de acrilamida desnaturizante (SDS). Se aplicaron las mismas cantidades de las mismas muestras en cada uno de los dos geles. M: marcador de peso molecular de proteína convencional; R1: Muestra del recipiente de reacción 1 de acuerdo con el Ejemplo 7 (tras la incubación de una proteína OK1 con ATP); R2: Muestra del recipiente de reacción 2 de acuerdo con el Ejemplo 7 (tras la incubación de una proteína OK1 con ATP, la proteína se calentó a 95 °C); R3: Muestra del recipiente de reacción 3 de acuerdo con el Ejemplo 7 (tras la incubación de una proteína OK1 con ATP, la proteína se incubó en HCl 0,5 M); R4: Muestra del recipiente de reacción 4 de acuerdo con el Ejemplo 7 (tras la incubación de una proteína OK1 con ATP, la proteína se incubó en NaOH 0,5 M).

Fig. 3: Demostración de la actividad fosforilante de almidón de una proteína OK1 (véase el Ejemplo 6). La proteína OK1 se incubó con almidón no fosforilado aislado de hojas del mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3* (preparación A) y el almidón aislado de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3*, que se fosforiló de manera retrospectiva *in vitro* con una proteína R1 (preparación B). La preparación C es la misma que la preparación B, salvo que esta preparación C se incubó sin la proteína OK1. Se llevaron a cabo dos ensayos independientes para cada una de las preparaciones (A, B, C) (Ensayo 1 y Ensayo 2). Las respectivas cantidades se muestran de manera gráfica, medidas en cpm (cuentas por minuto), en fosfato marcado con ³³P, que se introdujeron en almidón no fosforilado (preparación A) y almidón fosforilado (preparación B) mediante la proteína OK1.

Fig. 4: Comparación de las posiciones del átomo de C de las moléculas de glucosa del almidón, que se fosforiló a partir de una proteína R1 y de una proteína OK1, respectivamente (véase Ejemplo 9). La proteína OK1 (preparación A) se incubó en presencia de ATP marcado con ³³P con almidón aislado a partir de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3*, que se fosforiló de manera retrospectiva *in vitro* con una proteína R1. La proteína R1 (preparación B) se incubó en presencia de ATP marcado con ³³P con almidón aislado a partir de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana sex1-3*. Al finalizar la incubación, se llevó a cabo la hidrólisis total del almidón y los productos de la hidrólisis se separaron por medio de cromatografía HPAE. Como patrón, se añadió glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato a los productos de hidrólisis antes de la separación. Los productos de hidrólisis separados por medio de cromatografía HPAE se recolectaron en fracciones individuales. La glucosa-6-fosfato eludida con la fracción 15 y la glucosa-3-fosfato añadida, con la fracción 17. Las fracciones obtenidas se investigaron posteriormente para la presencia de fosfato marcado de manera radiactiva. La cantidad de fosfato marcado con ³³P medida en las fracciones individuales, medidas en cpm (cuentas por minuto), que se introdujo en los productos de hidrólisis del

almidón fosforilado mediante la proteína OK1 o la proteína R1, se muestra de manera gráfica.

Fig. 5 Demostración de la autofosforilación de la proteína OK1. La Fig 5 A) muestra un análisis de transferencia de Western. La Fig. 5 B) muestra la autorradiografía de un gel de acrilamida desnaturalizante (SDS). Se aplicaron las mismas cantidades de las mismas muestras en cada uno de los dos gels. La proteína OK1 se incubó bien con ATP marcado de manera radiactiva al azar o con ATP marcado de manera radiactiva específicamente en la posición gamma. Al finalizar la incubación, las proteínas se calentaron bien a 30 °C a 95 °C o se incubaron en NaOH 0,5 M o en HCl 0,5 M, respectivamente.

Fig. 6 Demostración de la transferencia del resto de fosfato beta del ATP al almidón en una reacción catalizada por una proteína OK1. Bien el ATP marcado de manera específica con ³³P en la posición gama o bien el ATP con ³³P al azar se usó para fosforilar el almidón, que se ha fosforilado *in vitro* por medio de una proteína R1 y aislado a partir de hijas de un mutante *Arabidopsis thaliana* *sex1-3*, por medio de una proteína OK1. No se añadió proteína OK1 en ninguno de los experimentos denominados como "control". Cada preparación se ensayó dos veces, independientemente entre sí. Se muestran los resultados de ambos ensayos.

Fig. 7 Análisis por transferencia de Western de extractos de proteína de plantas que usan un anticuerpo frente a la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los extractos de proteína de hojas de las siguientes plantas: *Ara Arabidopsis thaliana*; 51, 54, 55, 67, 72, 73, 79, 62, 63, 64, 65, 69, 66, 68 son líneas independientes de la transformación 385JH; Tipo silvestre D *Solanum tuberosum* cv Désirée.

Procedimientos generales

En lo sucesivo, se describen procedimientos, que se pueden usar para llevar a cabo procedimientos descritos en la invención. Estos procedimientos constituyen realizaciones específicas de la presente invención pero no restringen la presente invención a estos procedimientos. El experto en la materia sabe que puede implementar la invención del mismo modo mediante modificación de los procedimientos descritos y/o mediante sustitución de partes individuales de los procedimientos mediante partes alternativas de los procedimientos.

1. Producción de extractos de proteína a partir de tejido vegetal

a) Producción de extractos de proteína a partir de tejido vegetal

El material de la hoja se congela en nitrógeno líquido inmediatamente después de su cosechado, y posteriormente se homogeneiza en el mortero en nitrógeno líquido. El material de la hoja reducido se mezcla con aproximadamente 3,5 veces el volumen (con respecto al peso del material de la hoja usado) de tampón de unión frío (4 °C) y se descompone durante 2 x 10 s con un Ultraturax (velocidad máxima). Tras el primer tratamiento con un Ultraturax, el material de hoja reducido se enfría en hielo antes de que se lleve a cabo el segundo tratamiento. El material de hoja tratado se pasa después a través de una malla de nylon de 100 µm y se centrifuga durante 20 min (recipiente de centrifugación de 50 ml, 20.000xg, 4°C).

b) Precipitación de las proteínas contenidas en los extractos de proteína

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación de acuerdo con la etapa a) se retira y se determina su volumen. Para precipitar proteínas, se añade sulfato de amonio de manera continua al sobrenadante durante un período de 30 minutos mientras se agita en hielo hasta una concentración final del 75 % (peso/volumen). El sobrenadante se incubaba posteriormente durante una hora adicional en hielo mientras se agita. Las proteínas precipitadas a partir del sobrenadante se sedimentan a 20.000xg y 4 °C durante 10 min y los sedimentos se absorben posteriormente en 5 ml de tampón de unión, es decir, se disuelven las proteínas presentes en el sedimento.

c) Desalación de las proteínas precipitadas

Las proteínas disueltas se desalan por medio de una columna PD10 rellena con Sephadex G25 (Amersham Bioscience, Freiburg, N.º de prod. de las columnas: 17, -0851-01, N.º de prod. de Sephadex G25-M: 17-0033-01) a una temperatura de 4 °C, es decir, el sulfato de amonio usado en la etapa b) para la precipitación también se separa de la proteína disuelta. La columna PD10 se equilibra con tampón de unión antes de aplicar las proteínas disueltas de acuerdo con la etapa b). A tal fin, se distribuyen 5 ml de tampón de unión en la columna en cada caso. Posteriormente, se añaden 2,5 ml de la solución de proteína obtenida de acuerdo con la etapa b) en cada columna antes de que se eludan las proteínas de la columna con 3,5 ml de tampón de unión.

d) Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determina con un ensayo Bradford (Biorad, Munich, N.º de prod. 500-0006 (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254)).

e) Composición del tampón de unión [

Tampón de unión:	50 mM	HEPES/NaOH (o KOH), pH 7,2
	1 mM	EDTA
	2 mM	Ditioeritritol (DTE)
	2 mM	Benzamidina
	2 mM	Ácido ε-Aminocaprónico
	0,5 mM	PMSF
	0,02 %	Triton X-100

2. Aislamiento del almidón de la hoja

a) Aislamiento de gránulos de almidón a partir de tejidos vegetales

5 El material de la hoja se congela inmediatamente en nitrógeno líquido después del cosechado. El material de la hoja se homogeneiza en porciones en el mortero en nitrógeno líquido y se absorbe en un total de aproximadamente 2,5 veces el volumen (peso/volumen) de tampón de almidón. Además, esta suspensión se homogeneiza de nuevo en el mezclador Waring durante 20 s a máxima velocidad. El homogeneizado se pasa a través de una malla de nylon (ancho de malla de 100 µm) y se centrifuga durante 5 minutos a 1.000xg. El sobrenadante con las proteínas solubles se descarta.

10 b) Limpieza del almidón aislado a partir de tejidos vegetales

Tras retirar el material verde que está encima del almidón mediante el enjuague del material verde con tampón de almidón, el sedimento que contiene el almidón obtenido de la etapa a) se adsorbe en tampón de almidón y se pasa con éxito a través de mallas de nylon con diferentes anchos de malla (del orden de 60 µm, 30 µm, 20 µm). El filtrado se centrifuga usando un amortiguador Percoll de 10 ml (Percoll al 95 % (v/v) (Pharmacia, Uppsala, Suiza), HEPES-KOH 0,5 M al 5 % (v/v) y pH 7,2) (tubo Correx, 15 min, 2.000xg). El sedimento obtenido después de esta centrifugación se resuspende una vez en tampón de almidón y se centrifuga de nuevo (5 min, 1.000xg).

c) Retirada de las proteínas unidas al almidón

20 Después de la etapa b), se obtienen los gránulos de almidón, que contienen proteínas unidas al almidón. Las proteínas unidas a la superficie de los gránulos de almidón se retiran incubando cuatro veces con SDS al 0,5 % (lauril sulfato de sodio) durante 10-15 minutos en cada caso a temperatura ambiente en agitación. Cada una de las etapas de lavado va seguida de una centrifugación (5 min, 5.000xg) con el fin de separar los gránulos de almidón del respectivo tampón de lavado.

d) Purificación del almidón que se ha liberado de las proteínas

25 El almidón obtenido de la etapa c), que se ha liberado de las proteínas unidas a su superficie, se retira posteriormente incubando cuatro veces con tampón de lavado durante 10-15 minutos en cada caso a temperatura ambiente con agitación. Cada una de las etapas de lavado va seguida de una centrifugación (5 min, 5.000xg) con el fin de separar los gránulos de almidón del respectivo tampón de lavado. Estas etapas de lavado sirven principalmente para retirar el SDS usado en las incubaciones en la etapa c).

e) Determinación de la concentración de almidón aislado

30 La cantidad de almidón aislado en la etapa d) se determina mediante fotometría. Tras la dilución adecuada, la densidad óptica de la suspensión de almidón se mide frente a una curva de calibración a una longitud de onda de 600 nm. El intervalo lineal de la curva de calibración se localiza entre 0 y 0,3 unidades de extinción. Para producir las curvas de calibración, el almidón, por ejemplo, aislado a partir de hojas de un mutante *Arabidopsis thaliana* *sex1-3*, se seca al vacío, se pesa y se absorbe en un volumen definido de agua. La suspensión así obtenida se diluye con agua en varias etapas en una proporción de 1 a 1 en cada uno de los casos hasta que se obtiene una suspensión de aproximadamente 5 µg de almidón por ml de agua. Las suspensiones obtenidas mediante las etapas de dilución individual se miden en el fotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los valores de absorción obtenidos para cada suspensión se representan frente a la concentración de almidón en la respectiva suspensión. La curva de calibración obtenida debe seguir una función lineal matemática en el intervalo de 0 µg de almidón por ml de agua hasta 0,3 µg de almidón por ml de agua.

f) Almacenamiento de almidón aislado

El almidón puede usarse bien directamente sin almacenamiento adicional para ensayos adicionales, o bien almacenado en alícuotas en recipientes Eppendorf de 1,5 ml a -20 °C. Tanto el almidón congelado como el no almacenado, y aislado recientemente se puede usar, si es necesario, para los procedimientos descritos en la presente invención que se refieren a la fosforilación *in vitro* y/o al ensayo de unión, por ejemplo.

5 g) Composición de los tampones usados

Tampón de almidón 1x: HEPES-KOH 20 mM, pH 8,0

EDTA 0,2 mM

Triton X-100 al 0,5 %

Tampón de lavado: HEPES/KOH 50 mM, pH 7,2

3. Expresión recombinante de una proteína fosforilante de almidón identificada

a) Producción de un vector de expresión bacteriano que contiene un ADNc, que codifica una proteína fosforilante de almidón

10 El ADNc que codifica una proteína fosforilante de almidón se puede amplificar, por ejemplo, usando ARNm o poli-A-más-ARNm de tejidos vegetales como un "molde", por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A tal fin, se usa primer una transcriptasa inversa para la producción de una hebra de ADNc, que es complementaria con un ARNm, que codifica una proteína fosforilante de almidón, antes de que se amplifique la hebra de ADNc en cuestión por medio de la ADN polimerasa. Los, así llamados, "kits" que contienen sustancias, enzimas e
 15 instrucciones para llevar a cabo reacciones de PCR están disponibles para su compra (por ejemplo, el sistema RT-PCR de una etapa SuperScript™, Invitrogen, N.º de prod.: 10928-034). El ADNc amplificado que codifica una proteína fosforilante de almidón se puede clonar posteriormente en un vector de expresión bacteriano, por ejemplo, pDEST™ (17 (Invitrogen). pDEST™17 contiene el promotor T7, que se usa para iniciar la transcripción de la T7-ARN-polimerasa. Además, el vector de expresión pDEST™17 contiene una secuencia Shine Dalgarno en la
 20 dirección 5' del promotor T7 seguido de un codón de iniciación (ATG) y de un, así llamado, marcador His. Este marcador His consiste en seis codones seguidos directamente entre sí, que cada uno codifica el aminoácido histidina y se localizan en el marco de lectura de dicho codón de iniciación. La clonación de ADNc que codifica una proteína fosforilante de almidón en pDEST™17 se lleva a cabo de tal manera que se da una fusión traslacional entre los codones para el codón de iniciación, el marcador His y el ADNc que codifica una proteína fosforilante de almidón.
 25 Como resultado de esto, tras la transcripción iniciada en el promotor T7 y la posterior traducción, se obtiene una proteína fosforilante de almidón, que contiene aminoácidos adicionales que contienen el marcador His en su extremo N-terminal.

Sin embargo, otros vectores, que son adecuados para la expresión en microorganismos, también se pueden usar para la expresión de una proteína fosforilante de almidón. Los vectores de expresión y las hebras de expresión
 30 asociadas son conocidas por el experto en la materia y están disponibles para su compra por el distribuidor apropiado en las combinaciones adecuadas.

b) Producción de clones de expresión en *Escherichia coli*

En primer lugar, una cepa de *E. coli* competente con la transformación apropiada; que desde un punto de vista cromosómico codifica una polimerasa T7-ARN, se transforma con el plásmido de expresión producido en la etapa a),
 35 y posteriormente se incuba durante toda la noche a 30 °C en medio de cultivo solidificado con agar. Las cepas de expresión adecuadas son, por ejemplo, cepas BL21 (Invitrogen, N.º de prod.: C6010-03, que desde un punto de vista cromosómico codifica una polimerasa T7-ARN bajo el control de un promotor que puede inducir IPTG (lacZ). Las colonias bacterianas resultantes de la transformación se pueden investigar usando procedimientos conocidos por el experto en la materia para ver si contienen el plásmido de expresión requerido que contiene un ADNc que
 40 codifica la proteína fosforilante de almidón. Al mismo tiempo, se obtienen los clones de expresión.

c) Expresión de una proteína fosforilante de almidón en *Escherichia coli*

Primero, se prepara un cultivo preparatorio. Para hacer esto, un clon de expresión obtenido de acuerdo con la etapa b) se cultiva en 30 ml de caldo excelente (medio TB) que contiene un antibiótico para la selección sobre la presencia del plásmido de expresión, y se incuba durante toda la noche a 30 °C en agitación (250 rpm).
 45 A continuación, se prepara un cultivo principal para la expresión de una proteína fosforilante de almidón. Para hacer esto, en cada caso, los matraces de Erlenmeyer de 1 litro, que contienen cada uno 300 ml de medio TB, precalentado a 30 °C y un antibiótico para la selección sobre la presencia del plásmido de expresión se cultiva cada uno con 10 ml de un cultivo preparatorio apropiado y se incuba a 30 °C en agitación (250 rpm) hasta que se alcanza

una densidad óptica (medida a una longitud de onda de 600 nm; DO₆₀₀) de aproximadamente 0,8.

Si, para la expresión de una proteína fosforilante de almidón, se usa un plásmido de expresión, en el que la expresión de la proteína fosforilante de almidón se inicia por medio de un sistema inducible (por ejemplo, el vector de expresión pDEST™17 en cepas BL21 de *E. coli*, inducibles por medio de IPTG), entonces, para alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8, el inductor en cuestión (por ejemplo, IPTG) se añade al cultivo principal. Tras añadir el inductor, el cultivo principal se incuba a 30 °C en agitación (250 rpm) hasta que se alcanza una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,8. El cultivo principal se enfría después durante 30 minutos en hielo antes de que las células del medio de cultivo se separen del medio de cultivo mediante centrifugación (10 minutos a 4.000xg y 4 °C).

4. Purificación de una proteína fosforilante de almidón

10 a) Descomposición de células que expresan una proteína fosforilante de almidón

Las células obtenidas en la etapa c), Procedimientos generales, parte 3, se resuspenden en tampón de lisis. Al hacerlo, se añaden aproximadamente 4 ml de tampón de lisis a aproximadamente 1 g de células. Las células resuspendidas se incuban después durante 30 minutos en hielo antes de que se descompongan con la ayuda de una sonda de ultrasonido (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlín, configuraciones: Ciclo 6, 70 %, 1 minuto) a enfriamiento continuo por medio del hielo. Se debe tener cuidado aquí para asegurar que la suspensión celular no se calienta demasiado durante el tratamiento con ultrasonido. La suspensión obtenida tras el tratamiento con ultrasonido se centrifuga (12 minutos a 20.000xg, 4 °C) y el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se filtra usando un filtro con un tamaño de poro de 45 µm.

b) Purificación de la proteína fosforilante de almidón

20 Si la proteína fosforilante de almidón expresada en células de *E. coli* es una proteína de fusión con un marcador His, entonces la limpieza puede tener lugar con ayuda de iones de níquel, a los que el marcador His se une con mayor afinidad. Para hacer esto, se mezclan 25 ml del filtrado obtenido en la etapa d) con 1 ml de mezcla Ni-agarosa (Qiagen, N.º de prod.: 30210) y se incuba durante 1 hora en hielo. El combinado de la mezcla de Ni-agarosa con el filtrado se distribuye posteriormente en una columna de poliestireno (Pierce, N.º de prod.: 29920). El producto, que corre a través de la columna, se descarta. A continuación, se lava la columna añadiendo 8 ml de tampón de lisis, el producto, que corre a través de la columna, se descarta de nuevo. La elución de la proteína fosforilante de almidón entonces tiene lugar mediante adición fraccionada a la columna de 1 ml de tampón E1 dos veces, seguido de la adición de 1 ml de tampón E2 una vez y posteriormente, 1 ml de tampón E3 cinco veces. El producto, que corre a través de la columna, que se produce mediante la adición de la fracción individual del tampón de elución apropiado (tampón E1, E2, E3) a la columna, se recoge en fracciones separadas. Las alícuotas de estas fracciones se analizan posteriormente por medio de electroforesis en gel de acrilamida SDS desnaturalizante seguida de una coloración en azul de Coomassie. Las fracciones, que contienen la proteína fosforilante de almidón en cantidad suficiente y pureza satisfactoria, se limpian y se concentran con la ayuda de una filtración presurizada a 4 °C. La filtración presurizada se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de una célula Amicon (célula de ultrafiltración Amicon, Modelo 8010, N.º de prod.: 5121) usando una membrana Diaflo PM30 (Millipore, N.º de prod.: 13212) a 4 °C. Otros procedimientos conocidos por el experto en la materia también se pueden usar, sin embargo, para la concentración.

g) Composición de los tampones usados

Tampón de lisis:	50 mM	HEPES
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	pH 8,0 (ajuste con NaOH)	
1 mg/ml	Lisozima (añadir inmediatamente antes de usar el tampón)	

¼ de comprimido por 10 ml de inhibidores de proteasa completamente libres de EDTA, (Roche N.º de producto: 1873580, añadir inmediatamente antes de usar el tampón)

Tampón de elución E1:	50 mM	HEPES
	300 mM	NaCl
	50 mM	Imidazol
	pH 8,0 (ajuste con NaOH)	

Tampón de elución E2: 50 mM HEPES
 300 mM NaCl
 75 mM Imidazol
 pH 8,0 (ajuste con NaOH)

Tampón de elución E3: 50 mM HEPES
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol
 pH 8,0 (ajuste con NaOH)

5. Expresión recombinante de una proteína R1

La expresión recombinante de una proteína R1 se describe en la bibliografía (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), pero también se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos relacionados con la expresión recombinante de una proteína fosforilante de almidón descrita anteriormente en Procedimientos generales, parte 3.

6. Purificación de una proteína R1

La purificación de una proteína R1 se describe en la bibliografía (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen y col., Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), pero también se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos relacionados con la limpieza de una proteína fosforilante de almidón descrita anteriormente en Procedimientos generales, parte 4 si se produce una proteína de fusión R1 que contiene un marcador His mediante la expresión de R1 en células de *E. coli*.

7. Producción *in vitro* de almidón fosforilado sobre la base de almidón no fosforilado

a) Fosforilación *in vitro* de almidón no fosforilado

El almidón, que no contiene fosfato de almidón (por ejemplo, aislado de hojas de mutantes *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* con la ayuda de procedimientos descritos anteriormente en Procedimientos generales, parte 2) se mezcla con tampón R1 y con proteína R1 purificada (aproximadamente 0,25 µg de proteína R1 por mg de almidón) con el fin de producir un contenido en almidón de 25 mg por ml. Esta preparación de la reacción se incuba durante toda la noche (aproximadamente 15 horas) a temperatura ambiente en agitación. La R1 unida al almidón presente en la preparación de la reacción se retira al completarse la reacción mediante lavado de cuatro veces con aproximadamente 800 µl de SDS al 0,5 % en cada caso. Posteriormente, el SDS aún presente en el almidón fosforilado *in vitro* se retira mediante el lavado de cinco veces con 1 ml de tampón de lavado en cada caso. Todas las etapas de lavado tienen lugar a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos en agitación. Cada una de las etapas de lavado va seguida de una centrifugación (2 min, 10.000xg) con el fin de separar los gránulos de almidón del respectivo tampón SDS o tampón de lavado.

b) Composición de los tampones usados

Tampón de R1: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5
 1 mM EDTA
 6 mM MgCl₂
 0,5 mM ATP

Tampón de lavado: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

8. Unión de las proteínas a almidón fosforilado y a almidón no fosforilado

a) Aislamiento de complejos de proteína almidón-P o de complejos proteína almidón no fosforilado

Aproximadamente 50 mg de almidón-P o aproximadamente 50 mg de almidón no fosforilado respectivamente se resuspenden en preparaciones separadas en aproximadamente 800 µl de extracto de proteína en cada caso. La concentración de proteína de los extractos de proteína debería ser de aproximadamente 4 mg a 5 mg por ml en cada

caso. La incubación se lleva a cabo en el almidón-P o en el almidón no fosforilado con extractos de proteína durante 15 minutos en agitación a 4 °C. Al finalizar la incubación, las preparaciones de la reacción se centrifugan usando un amortiguador Percoll (4 ml) (15 minutos, 3500 rpm, 4°C). Las proteínas, que no se han unido al almidón no fosforilado o al almidón-P, se localizan en el sobrenadante tras la centrifugación y se pueden retirar usando una pipeta Pasteur. El sobrenadante se descarta. El sedimento sedimentado que contiene almidón-P y almidón no fosforilado, incluyendo las proteínas unidas a los respectivos almidones (complejos proteína almidón-P o complejos proteína almidón no fosforilado, respectivamente), obtenido tras la centrifugación se lava dos veces con 1 ml de tampón de lavado en cada caso (véase anteriormente, Procedimientos generales, en la parte 7b) mediante incubación durante 3 minutos a 4 °C en agitación. Cada etapa de lavado va seguida por una centrifugación (5 minutos, 8000 rpm, a 4 °C en una centrifugadora de mesa, Hettich EBA 12R) con el fin de separar el almidón-P o el almidón no fosforilado respectivamente del tampón de lavado.

b) Disolución de las proteínas unidas en los complejos almidón-P proteína o en los complejos almidón no fosforilado proteína, respectivamente

Los complejos almidón-P proteína o los complejos almidón no fosforilado proteína obtenidos de acuerdo con la etapa a) se resuspenden en aproximadamente 150 µl de tampón de ensayo SDS en cada caso y se incuban durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. El almidón-P o el almidón no fosforilado respectivamente se retira posteriormente de las proteínas disueltas mediante centrifugación (1 minuto, 13.000 rpm, a temperatura ambiente, centrifugadora de mesa de Eppendorf). El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se centrifuga de nuevo con el fin de retirar todo el resto de almidón-P o almidón no fosforilado (1 minuto, 13.000 rpm, a temperatura ambiente, centrifugadora de mesa de Eppendorf), y entonces se retira. Como resultado, las proteínas disueltas, que se unen al almidón-P o al almidón no fosforilado, respectivamente, se obtienen.

g) Composición de los tampones usados

Tampón de ensayo SDS:	187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	6 %	SDS
	30 %	Glicerina
	~ 0,015 %	Azul de bromofenol
	60 mM	Ditioeritritol (DTE, ¡añadir reciente!)

Percoll: El Percoll se dializa durante toda la noche frente a una solución que consiste en [¿palabra perdida?] y HEPES / KOH 25 mM, pH 7,0

25 9. Separación de proteínas unidas a almidón fosforilado y a almidón no fosforilado

Las proteínas disueltas obtenidas en la etapa c) en Procedimientos generales, parte 8, referidas a la unión de proteínas a almidón-P o a almidón no fosforilado respectivamente se incuban durante 5 minutos a 95 °C en cada caso y posteriormente se separan con la ayuda de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. Al hacerlo, se aplica un volumen igual al gel de acrilamida en cada caso para las proteínas disueltas obtenidas mediante unión a almidón-P y para las obtenidas mediante unión a almidón no fosforilado. El gel obtenido al finalizar la electroforesis se tiñe al menos durante toda la noche con Comassie coloidal (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. N.º: A152.1), y posteriormente se destiña en metanol al 30 %, ácido acético al 5 % o en metanol al 25 %.

10. Identificación y aislamiento de proteínas unidas a almidón-P y/o a almidón no fosforilado

a) Identificación de proteínas con actividad aumentada de unión con respecto a almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado

Las proteínas, que, tras la separación por medio de electroforesis en gel de acrilamida y posterior visualización mediante coloración (véase anteriormente, Procedimientos generales, parte 9), presentan una señal aumentada tras la unión al almidón-P en comparación con una correspondiente señal tras la unión a almidón no fosforilado, tienen una actividad aumentada de unión con respecto al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado. Mediante este medio, es posible identificar proteínas, que tiene una actividad aumentada de unión con respecto al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado. Las proteínas, que tienen una actividad aumentada de unión con respecto al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado, se retiran del gel de acrilamida.

La identificación de la secuencia de aminoácidos de proteínas, que tienen actividad aumentada de unión con respecto al almidón-P en comparación con las proteínas del almidón no fosforilado identificadas de acuerdo con la etapa a) se digieren con tripsina y los péptidos obtenidos se analizan por medio de MALDI-TOF para determinar las masas de los péptidos obtenidos. La tripsina es una proteasa específica de secuencia, es decir, la tripsina solo divide proteínas en una posición específica cuando las proteínas en cuestión contienen ciertas secuencias de aminoácidos. La tripsina siempre divide uniones peptídicas cuando los aminoácidos arginina y lisina se suceden comenzando desde el extremo N-terminal. De esta forma, es posible determinar teóricamente todos los péptidos que

se producirían tras la digestión con tripsina de una secuencia de aminoácidos. A partir del conocimiento de los aminoácidos que codifican los péptidos determinados de manera teórica, las masas de los péptidos, que se obtienen tras la teórica digestión con tripsina, también se pueden determinar. Las bases de datos (por ejemplo, NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>), que contienen información referente a las masas de péptidos tras la teórica digestión con tripsina, se pueden comparar, por tanto, con las masas reales de péptidos de proteínas desconocidas obtenidas con MALDI-TOF-MS. Las secuencias de aminoácidos, que tienen las mismas masas de péptidos tras la digestión teórica y/o real con tripsina, deben considerarse como idénticas. Las bases de datos en cuestión contienen ambas masas de péptidos de proteínas, cuya función ya se ha demostrado, y también masas de péptidos de proteínas, que hasta ahora solo existen hipotéticamente por derivación de secuencias de aminoácidos a partir de secuencias de ácido nucleico obtenidas en proyectos de secuenciación. La existencia real y la función de tales proteínas hipotéticas, por tanto, raramente se ha demostrado y, si realmente existe una función, entonces esta se basa solo normalmente en predicciones y no en una demostración real de la función.

Las bandas que contiene proteínas identificadas de acuerdo con la etapa a) se retiran del gel de acrilamida; la parte de acrilamida retirada se reduce y se destiñe mediante incubación durante aproximadamente media hora a 37 °C en aproximadamente 1 ml de NH₄ 50 mM al 60 %, acetonitrilo al 40 %. La solución decolorante se retira posteriormente y el gel restante se seca al vacío (por ejemplo, Speedvac). Tras el secado, se añade la solución de tripsina para digerir las proteínas contenidas en la parte del gel en cuestión. La digestión tiene lugar durante toda la noche a 37 °C. Tras la digestión, se añade un poco de acetonitrilo (hasta que el gel de acrilamida se tiñe de blanco) y la preparación se seca al vacío (por ejemplo, Speedvac). Cuando se ha completado el secado, se añade suficiente ácido fórmico al 5 % como para cubrir los componentes secos y se incuban durante unos pocos minutos a 37 °C. El tratamiento con acetonitrilo seguido del secado se repite una vez más. Los constituyentes secos se absorben posteriormente en TFA al 0,1 % (ácido trifluoroacético, 5 µl a 10 µl) y se administran por goteo en un vehículo en porciones de aproximadamente 0,5 µl. También se aplican cantidades iguales de matriz (ácido ε-ciano-4-hidroxicinámico) al vehículo. Después de que la matriz cristalice, las masas de los péptidos se determinan por medio de MALDI-TOF-MS-MS (por ejemplo, Burker Reflex™ II, Bruker Daltonic, Bremen). Con las masas obtenidas, se busca en las bases de datos secuencias de aminoácidos, que dan las mismas masas tras la digestión teórica con tripsina. De esta forma, se pueden identificar secuencias de aminoácidos, que codifican proteínas, que preferentemente se unen a alfa-1,4-glucanos fosforilados y/o que necesitan P-alfa-1,4-glucanos como sustrato.

30 **11. Procedimiento para demostrar la actividad fosforilante de almidón de una proteína**

a) Incubación de proteínas con almidón-P y/o almidón no fosforilado

Con el fin de demostrar si una proteína tiene actividad fosforilante de almidón, las proteínas a investigar se pueden incubar con almidón y ATP marcado de manera radiactiva. Para hacer esto, se incuban aproximadamente 5 mg de almidón-P o aproximadamente 5 mg de almidón no fosforilado con la proteína a investigar (de 0,01 µg a 5,0 µg por mg de almidón usado) en 500 µl de tampón de fosforilación durante 10 minutos a 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. La reacción posteriormente se detiene mediante la adición de SDS hasta una concentración del 2 % (peso/volumen). Los gránulos de almidón en la respectiva mezcla de reacción se centrifugan (1 minuto, 13.000xg) y se lavan una vez con 900 µl de una solución de SDS del 2 % y cuatro veces cada uno con 900 µl de una solución de ATP 2 mM. Todas las etapas de lavado se llevaron a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Tras cada etapa de lavado, los gránulos de almidón se separaron del respectivo tampón de lavado mediante centrifugación (1 min, 13.000xg).

Además, cuando se llevó a cabo un experimento para demostrar la actividad fosforilante de una proteína, las preparaciones de reacción adicionales, que no contienen proteína o contienen proteína inactiva, pero que de otro modo se tratan de la misma manera que las preparaciones de la reacción descritas, se deben procesar como los, así llamados, controles.

b) Determinación de la cantidad de restos fosfato incorporados en el almidón-P y/o almidón no fosforilado debido a la actividad enzimática

Los gránulos de almidón obtenidos de acuerdo con la etapa a) se pueden investigar para la presencia de restos de fosfato marcados de manera radiactiva. Para hacer esto, el respectivo almidón se resuspende en 100 µl de agua y se mezcla con 3 ml de mezcla de centelleo en cada caso (por ejemplo, Ready Safe™, BECKMANN Coulter) y posteriormente se analiza con la ayuda de un contador de centelleo (por ejemplo Contador de Centelleo Multifunción LS 6500, BECKMANN COULTER™).

c) Identificación de proteínas, que preferentemente usan almidón-P como un sustrato

Si una proteína se incuba en preparaciones separadas, una vez con almidón-P y una vez con almidón no fosforilado, de acuerdo con el procedimiento descrito en a), entonces, mediante la comparación de los valores de presencia de fosfato de almidón obtenidos de acuerdo con la etapa b), se puede determinar si la proteína en cuestión ha incorporado más fosfato en almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado. De esta forma, también se pueden identificar proteínas, que pueden introducir fosfato en almidón-P pero no en almidón no fosforilado. Esto significa que se pueden identificar proteínas, que requieren almidón ya fosforilado como sustrato para una reacción de fosforilación adicional.

d) Composición de los tampones usados

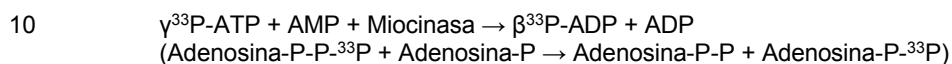
Tampón	de 50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
fosforilación:		
	1 mM	EDTA
	6 mM	MgCl ₂
	de 0,01 a 0,5 mM	ATP
	de 0,2 a 2 2 μCi por ml de ³³ P-ATP aleatorizado (como alternativa, el ATP, que contiene un resto fosfato, que está marcado de manera específica en la posición beta, también puede usarse)	

5 En relación con la presente invención, la expresión "ATP aleatorizado" se entiende que significa ATP, que contiene restos de fosfato marcados tanto en la posición gamma como en la posición beta (Ritte y col. 2002, PNAS 99, 7166-7171). El ATP aleatorizado también se describe en la bibliográfica científica como ATP beta/gamma. Un procedimiento para crear ATP aleatorizado se describe en lo siguiente.

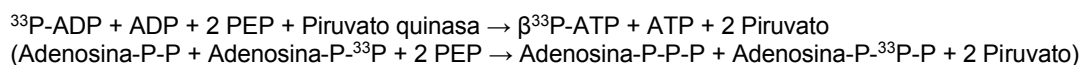
i) Producción de ATP aleatorizado

El procedimiento descrito en el presente documento para crear ATP aleatorizado con la ayuda de reacciones catalizadas por enzimas se basa en los siguientes mecanismos de reacción:

1ª etapa de la reacción:



2ª etapa de la reacción:



15 Los equilibrios de reacción se encuentran en el lado del producto, pero, a pesar de esto, esta reacción produce una mezcla que consiste principalmente en β³³P-ATP y algo de γ³³P-ATP.

ii) Realización de la primera etapa de la reacción

20 El ATP (100 μCi, 3000 Ci por mmol), que contiene un resto de fosfato marcado con ³³P en la posición gamma (Hartmann Analytic, 10 μCi/μl), se incuba con 2 μl de miocinasa (AMP-fosfotransferasa, de músculo de conejo; SIGMA, N.º de prod.: M3003 3,8 mg/ml, 1.626 unidades/mg) en 90 μl de tampón de aleatorización durante 1 hora a 37 °C. La reacción se detiene posteriormente mediante incubación durante 12 minutos a 95 °C antes de que la preparación de la reacción se limpie por medio de una filtración centrífuga que usa un filtro Microcon YM 10 (Amicon, Millipore Prod. No. 42407) a 14.000xg durante al menos 10 minutos.

ii) Realización de la segunda etapa de la reacción

25 Se añaden 2 μl de piruvato quinada (véase a continuación cómo crear una solución apropiada) y 3 μl de PEP 50 mM (fosfoenolpiruvato) al filtrado obtenido en la etapa ii). Esta mezcla de reacción se incuba durante 45 minutos a 30 °C antes de detener la reacción mediante incubación a 95 °C durante 12 minutos. La mezcla de reacción se centrifuga posteriormente (2 minutos, 12.000 rpm en una centrifugadora de mesa de Eppendorf). El sobrenadante que contiene ATP aleatorizado obtenido tras la centrifugación se retira, se crean alícuotas que se pueden almacenar a -20 °C.

30 Producción de la solución de piruvato quinasa

Se centrifugaron 15 μl de piruvato quinasa (de músculo de conejo, Roche, N.º de prod. 12815), 10 mg/ml, 200 unidades/mg a 25 °C), el sobrenadante se descarta y el sedimento se absorbe en 27 μl de tampón de piruvato quinasa.

iv) Tampones usados

Tampón de piruvato quinasa:	50 mM	HEPES/KOH a pH 7,5
	1 mM	EDTA

Tampón de aleatorización:	100 mM	HEPES/KOH a pH 7,5
	1 mM	EDTA
	10 %	Glicerol
	5 mM	MgCl ₂
	5 mM	KCl
	0,1 mM	ATP
	0,3 mM	AMP

12. Demostración de la autofosforilación de una proteína

Con el fin de demostrar si una proteína tiene actividad autofosforilante, las proteínas a investigar se pueden incubar con ATP marcado de manera radiactiva. Para hacer esto, las proteínas a investigar (de 50 µg a 100 µg) se incuban en 220 µl de tampón de fosforilación (véase anteriormente, parte 12 d), de Procedimientos generales) durante 30 minutos a 90 minutos a temperatura ambiente en agitación. La reacción se detiene posteriormente mediante la adición de EDTA hasta una concentración final de Ca de 0,11 M. De 2 µg a 4 µg de proteína se separa con la ayuda de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (gel de acrilamida al 7,5 %). El gel sometido tras la electroforesis en gel de poliacrilamida se somete a autorradiografía. Las proteínas, que presentan una señal en la autorradiografía, llevan un resto de fosfato radiactivo.

13. Identificación de las posiciones del átomo de C de moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano, en la que los fosfatos residuales se introducen a través de una proteína fosforilante de almidón

Se puede demostrar qué posiciones de átomos de carbono de las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano se fosforilan por una proteína mediante hidrólisis del glucano fosforilado obtenida por medio de una proteína apropiada *in vitro*, la posterior separación de los monómeros de glucosa obtenidos tras la hidrólisis, seguido de la medición del fosfato incorporado mediante una proteína apropiada en determinadas fracciones de las moléculas de glucosa.

a) Hidrólisis total de los alfa-1,4-glucanos

Se centrifugan las suspensiones en agua que contienen alfa-1,4-glucano, el sedimento sedimentado posteriormente se resuspende en HCl 0,7 M (Baker, para análisis) y se incuba durante 2 horas a 95 °C con agitación. Al finalizar la incubación, las muestras se enfrían brevemente y se centrifugan (por ejemplo, 2 minutos a 10.000xg). El sobrenadante obtenido se transfiere a un nuevo recipiente de reacción y se neutraliza mediante la adición de NaOH 2 M (Baker, para análisis). Si permanece un sedimento, se resuspende en 100 µl de agua y la cantidad de fosfato marcado presente en él se determina como un control.

El sobrenadante neutralizado se centrifuga posteriormente sobre un filtro de 10 kDa. Midiendo una alícuota del filtrado obtenido, la cantidad de fosfato marcado en el filtrado se determina con la ayuda de un contador de centelleo, por ejemplo.

b) Separación de los productos de hidrólisis y determinación de las posiciones de átomos de C fosforiladas

Los filtrados neutralizados de los productos de hidrólisis obtenidos por medio de la etapa a) se pueden separar (cuando se usa ATP marcado de manera radiactiva aproximadamente 3000 cpm) con la ayuda de cromatografía de intercambio aniónico a alta presión (HPAE), por ejemplo. El filtrado neutralizado se puede diluir con H₂O para obtener el volumen requerido para la HPAE. Además, se añaden glucosa-6-fosfato (aproximadamente 0,15 mM) y glucosa-3-fosfato (aproximadamente 0,3 mM) a los filtrados apropiados en cada caso como un control interno. Se lleva a cabo la separación por medio de HPAE, por ejemplo, con la ayuda de un sistema Dionex DX 600 Bio Lc que usa una columna CarboPac PA 100 (con la apropiada precolumna) y un detector amperométrico por pulso (ED 50). Al hacerlo, antes de inyectar la muestra, la columna primero se enjuaga durante 10 minutos con el 99 % de eluente C y el 1 % del eluente D. Un volumen de muestra de 60 µl se inyecta después. La elución de la muestra tiene lugar en las siguientes condiciones:

Caudal: 1 ml por minuto

Gradiente: aumento de manera lineal desde 0 minutos hasta 30 minutos

	Eluente C	Eluente D
0 minutos	99 %	1 %
30 minutos	0 %	100 %
35 minutos	0 %	100 %
Marcha terminada		

Los productos de hidrólisis eluidos a partir de la columna se recogen en fracciones individuales de 1 ml cada una. Como, en cada caso, la glucosa-3-fosfato no marcada (Ritte y col. 2002, PNAS 99, 7166-7171) y la glucosa-6-fosfato no marcada (Sigma, N.º de prod.: G7879) se han añadido a las muestras inyectadas de productos de hidrólisis como patrones internos, las fracciones, que contienen bien glucosa-3-fosfato o bien glucosa-6-fosfato, se pueden determinar por medio de detección amperométrica de pulso. Midiendo la cantidad de fosfatos marcados en las fracciones individuales y comparando posteriormente con las fracciones, que contienen glucosa-3-fosfato o glucosa-6-fosfato, esto se puede usar para determinar esas fracciones, en las que contiene glucosa-6-fosfato marcada o glucosa-3-fosfato marcada. La cantidad de fosfato marcado en la fracción en cuestión se determina. A partir de las proporciones de las cantidades de glucosa-3-fosfato frente a glucosa-6-fosfato medidas por fosfato marcado en los productos de hidrólisis individuales, se puede determinar ahora qué posición de fosfato está preferentemente fosforilada por una enzima fosforilante de alfa-1,4-glucano.

c) Tampones usados:

Eluente C: NaOH 100 mM

Eluente D: NaOH 100 mM

acetato de sodio 500 mM

14. Transformación de plantas de arroz

Las plantas de arroz se transformaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Hiei y col. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282).

15. Transformación de plantas de patata

Las plantas de patata se transfirieron con la ayuda de agrobacterium, tal como se describe por Rocha-Sosa y col. (EMBO J. 8, (1989), 23-29).

16. Transformación de plantas de trigo

Las plantas de trigo se transformaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Becker y col. (1994, Plant Journal 5, 299-307).

17. Transformación de plantas de maíz

Las plantas de maíz de la línea A188 se transformaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Ishida y col. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750).

25 18. Determinación del contenido en fosfato de almidón

Determinación del contenido en fosfato en C-6

En el almidón, las posiciones C2, C3 y C6 de las unidades de glucosa se pueden fosforilar. Para la determinación del contenido C6-P del almidón, se hidrolizaron 50 mg de almidón en 500 µl de HCl 0,7 M durante 4 h a 95 °C. Posteriormente, las preparaciones se centrifugan durante 10 minutos a 15500 g y se retira el sobrenadante. Se mezclan 7 µl de sobrenadante con 193 µl de tampón de imidazol (imidazol 100 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y NAD 0,4 mM). La medida se tomó en el fotómetro a 340 nm. Después de establecer una absorción de base, la reacción enzimática se inicia añadiendo dos unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (de Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim). El cambio en la absorción es directamente proporcional a la concentración del contenido en G-6-P en el almidón.

35 b) Determinación del contenido total en fosfato

La determinación del contenido total en fosfato se da de acuerdo con el procedimiento Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118). Aproximadamente se mezclan 50 mg de almidón con 30 µl de solución de nitrato de magnesio etanólico y se incinera durante tres horas a 500 °C en el horno de mufla. El resto se mezcla con 300 µl de ácido clorhídrico 0,5 M y se incuba durante 30 minutos a 60 °C. Posteriormente, se rellena una alícuota hasta 300 µl con ácido clorhídrico 0,5 M, se vertieron en una mezcla de 100 µl de ácido ascórbico al 10 % y 600 µl de molibdato de amonio al 0,42 % en ácido sulfúrico 2 M y se incubó durante 20 minutos a 45 °C.

c) Determinación del contenido de fosfato en C-6 y de fosfato en C-3

Para la determinación del contenido en fosfato, que se une en la posición C-6 y en la posición C-3 de las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano, los respectivos glucanos se pueden separar usando la hidrólisis total de acuerdo con los procedimientos HPAE enumerados en Procedimientos generales 13. Las cantidades de glucosa-6-fosfato y de glucosa-3-fosfato se pueden determinar mediante la integración de las áreas de pico individuales obtenidas

después de la separación por HPEA. Mediante la comparación de las superficies del pico obtenidas para la glucosa-6-fosfato en muestras desconocidas con superficies de pico que se obtuvieron tras la separación por HPEA, habiendo conocido las cantidades de glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato, se puede determinar la cantidad de glucosa-6-fosfato y de glucosa-3-fosfato en las muestras a examinar.

5 Ejemplos

1. Aislamiento de una proteína a partir de *Arabidopsis thaliana*, que presenta actividad aumentada de unión al almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado

a) Producción de extractos de proteína a partir de *Arabidopsis thaliana*

10 Se produjeron extractos de proteína a partir de aproximadamente 7 g de hojas (peso fresco) de *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) de acuerdo con Procedimientos generales, parte 1.

b) Aislamiento de gránulos de almidón a partir de hojas de mutantes *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*

Los gránulos de almidón se aislaron a partir de aproximadamente 20 g (peso fresco) de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo con el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 2.

15 c) Fosforilación de almidón *in vitro*, aislado a partir de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* con proteína R1 purificada

Aproximadamente 30 mg de almidón no fosforilado, aislado a partir de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*, se fosforilaron por medio de una proteína R1 expresada de manera recombinante y purificada en *E. coli* de acuerdo con el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 7. Para la expresión de la proteína R1 en *E. coli* y para la posterior purificación, se usó el procedimiento descrito por Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171).

20 d) Aislamiento de proteínas, que se unen a almidón-P y/o a almidón no fosforilado

Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos de acuerdo con la etapa a), se incubaron y se lavaron en una preparación A con 50 mg del almidón fosforilado *in vitro* producido de acuerdo con la etapa c), usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 8a.

25 En una segunda preparación B, los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos de acuerdo con la etapa a), se incubaron y se lavaron con 50 mg del almidón no fosforilado producido de acuerdo con la etapa b), usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 8a.

Posteriormente, las proteínas unidas al almidón-P de la preparación A y al almidón no fosforilado de la preparación B se disolvieron de acuerdo con el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 8b.

30 En una tercera preparación C, se incubaron 50 mg del almidón fosforilado *in vitro* producido de acuerdo con la etapa c) y se lavaron usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 8a. Sin embargo, la preparación C no contenía extractos de proteína.

e) Separación de las proteínas obtenidas de acuerdo con la etapa d) por medio de electroforesis en gel de acrilamida

35 Las proteínas de las preparaciones A, B y C obtenidas en la etapa d) se separaron por medio de un gel de acrilamida al 9 % en condiciones desnaturizantes (SDS) usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 9 y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie. El gel teñido se muestra en la Fig. 1. Se puede ver claramente que una proteína, que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa en gel de acrilamida desnaturizante en relación con un marcador convencional de proteína (Traza M), se une preferentemente a almidón fosforilado (Traza P) en comparación con el almidón no fosforilado (K).

40 f) Identificación de la proteína, que preferentemente se une a almidón-P en comparación con el almidón no fosforilado

45 La banda de la proteína con un peso molecular de aproximadamente 130 kDa identificada en la etapa e) se retiró del gel. La proteína se liberó posteriormente de la acrilamida tal como se describe en Procedimientos generales, parte 10b, se digirió con tripsina y las masas de los péptidos obtenidos se determinaron por medio de MALDI-TOF-MS. La, así llamada, "huella digital" obtenida mediante MALDI-TOF-MS se comparó con las huellas dactilares de moléculas de aminoácidos digeridas de manera teórica en las bases de datos (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html; ProFound: http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>). Como tal huella digital es muy específica de una proteína, fue posible identificar una molécula de aminoácido. Con la ayuda de la secuencia de esta molécula de aminoácido, fue posible aislar una secuencia de ácido nucleico de *Arabidopsis thaliana* que codifica una proteína OK1. La proteína identificada con este procedimiento se denominó A.t.-OK1. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* mostró que esta desviación de la secuencia estaba presente en la base de datos (NP 198009, NCBI). La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 codifica la proteína A.t.-OK1. La SEQ ID NO 2 contiene desviaciones cuando se compara con la

secuencia en la base de datos (Acc.: NP 198009.1, NCBI). Los aminoácidos 519 a 523 (WRLCE) y 762 a 766 (VRARQ) contenidos en la SEQ ID NO 2 no están en la secuencia, que está presente en la base de datos (ACC.: NP 198009.1). En comparación con la Versión 2 de la secuencia de la base de datos (Acc.: NP 198009.2), la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO 2 también contiene los aminoácidos adicionales 519 a 523 (WRLCE).

5 2. Clonación de un ADNc, que codifica la proteína OK1 identificada

El ADNc de la A.t.-OK1 se aisló con la ayuda de PCR inversa usando ARNm aislado a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Para hacer esto, se sintetizó una hebra de ADNc por medio de transcriptasa inversa (Sistema de síntesis de primera cadena SuperScript™ para RT PCR, Invitrogen N.º de prod.: 11904-018), que después se amplificó usando ADN polimerasa (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche N.º de prod.: 1732641). El producto amplificado obtenido a partir de esta reacción de PCR se clonó en el vector pGEM®-T (Invitrogen N.º de prod.: A3600). El plásmido obtenido se denomina A.t.-OK1-pGEM, se determinó la secuencia de ADNc que codifica la proteína A.t.-OK1 y se muestra en la SEQ ID NO. 1.

La secuencia mostrada en la SEQ ID NO 1 no es la misma que la secuencia, que están contenidas en las bases de datos. Esto ya se ha tratado para la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína A.t.-OK1.

15 Condiciones usadas para la amplificación del ADNc que codifica la proteína A.t.OK1

Síntesis de la primera hebra:

Se usaron las condiciones y el tampón especificado por el fabricante. Además, la preparación de la reacción para la síntesis de la primera hebra contenía las siguientes sustancias:

3 µg	ARN total
5 µM	3'-cebador (OK1 rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)
0,83 µM	mezcla dNTP

20 La preparación de la reacción se incubó durante 5 minutos a 75 °C y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente.

El tampón de la primera hebra, el inhibidor de la RNasa y el DTT se añadieron después y se incubaron durante 2 minutos a 42 °C antes de que se añadiese 1 µl de RT ADN polimerasa Superscript y la preparación de la reacción se incubase durante 50 minutos a 42 °C.

Condiciones para la amplificación de la primera hebra por medio de PCR:

1 µl	de la preparación de la reacción de la síntesis de la primera hebra
0,25 µM	3'cebador (OK1 rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)
0,25 µM	5'cebador (OK1 fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

25 Condiciones de la reacción:

Etapa 1	2 min a 95 °C
Etapa 2	20 s a 94 °C
Etapa 3	30 s a 62°C (Temp. por ciclo-0,67 °C) (30 s), 68 °C (
Etapa 4	4 minutos a 68 °C
Etapa 5	20 s a 94 °C
Etapa 6	30 s a 56°C
Etapa 7	4 minutos a 68 °C
Etapa 8	10 minutos a 68 °C

30 La reacción se llevó a cabo en primer lugar de acuerdo con las etapas 1 a 4. Se llevaron a cabo 10 repeticiones (ciclos) entre la etapa 4 y la etapa 2, reduciendo la temperatura de la etapa 3 por 0,67 °C tras cada ciclo. Esto fue seguido posteriormente de la reacción de acuerdo con las condiciones especificadas en las etapas 5 a 8. Se llevaron a cabo 25 repeticiones (ciclos) entre la etapa 7 y la etapa 5, aumentando el tiempo de la etapa 7 por 5 s en cada ciclo. Al finalizar la reacción, la reacción se enfrió a 4 °C.

3. Producción de un vector para la expresión recombinante del ADNc de la proteína OK1

Tras la amplificación por medio de PCR usando el plásmido A.t.-OK1-pGEM como un molde que usa la tecnología Gateway (Invitrogen), la secuencia que codifica la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* se clonó a continuación en

el vector pDONOR™ 201 (Invitrogen, N.º de prod.: 11798-014). pDONOR™ 201. Posteriormente, la región codificante de la proteína OK1 del vector obtenido se clonó mediante recombinación específica de secuencia en el vector de expresión pDEST17™ (Invitrogen N.º de prod.: 11803-014). El vector de expresión obtenido se denominó A.t.-OK1-pDES™17. La clonación dio como resultado una fusión translacional del ADNc que codifica la proteína A.t.-OK1 con los nucleótidos presentes en el vector de expresión pDEST™17. Los nucleótidos que se originan a partir del vector pDEST™17, que están fusionados de manera translacional con el ADNc que codifica la proteína A.t.-OK1, codifica 21 aminoácidos. Estos 21 aminoácidos incluyen, entre otros, el codón de iniciación (ATG) y el, así llamado, marcador His (6 restos de histidina directamente uno tras otro). Tras la traducción de estas secuencias fusionadas de manera translacional, esto da como resultado una proteína A.t.-OK1, que tiene los 21 aminoácidos adicionales codificados por nucleótidos que se originan a partir del vector como su extremo N-terminal. La proteína A.t.-OK1 recombinante resultante a partir de este vector, por lo tanto, contiene 21 aminoácidos adicionales que se originan a partir del vector pDEST™17 en su extremo N-terminal.

4. Expresión heteróloga de la proteína OK1 en E. coli

El vector de expresión A.t.-OK1-pDEST™17 obtenido de acuerdo con el Ejemplo 3 se transformó en la cepa de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, N.º de prod.:C6010-03). Ya se ha dado anteriormente una descripción de este sistema de expresión (véase Procedimientos generales, parte 3). Los clones de bacterias, que contienen el vector A.t.-OK1-pDEST™17, resultante de la transformación se usaron a continuación para crear un cultivo preparatorio, que se usó posteriormente para inocular un cultivo principal (véase Procedimientos generales, parte 3c). El cultivo preliminar y el medio de cultivo se incubaron cada uno a 30 °C en agitación (250 rpm). Cuando el cultivo principal había alcanzado una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8, la expresión de la proteína A.t.-OK1 recombinante se indujo mediante la adición de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) hasta que se alcanzó una concentración final de 1 mM. Tras la adición de IPTG, el cultivo principal se incubó a 30 °C con agitación (250 rpm) hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,8. El cultivo principal se enfrió después durante 30 minutos en hielo antes de que las células del medio de cultivo se separasen del medio de cultivo mediante centrifugación (10 minutos a 4.000xg y 4 °C).

5. Purificación de la proteína OK1 expresada de manera recombinante

La purificación y la concentración de la proteína A.t.-OK1 de células obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 4 se llevó a cabo usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 4.

6. Demostración de la actividad fosforilante de almidón de la proteína Ok1

La actividad fosforilante de almidón de la proteína A.t.-OK1 se demostró de acuerdo con el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 11. Al hacerlo, se incubaron 5 µg de proteína A.t.-OK1 producida de acuerdo con el Ejemplo 5 en cada caso en una preparación A con 5 mg de almidón aislado de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* de acuerdo con el Ejemplo 1 b) y en una preparación B con 5 mg de almidón obtenido mediante fosforilación enzimática de acuerdo con el Ejemplo 1c), en cada caso en 500 µl de tampón de fosforilación que contienen ATP aleatorizado marcado radiactivamente (³³P) 0,05 mM (en total, 1.130,00 cpm, aproximadamente 0,55 µCi) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se usó una preparación C como un control, que fue la misma que la preparación B, excepto en que no contenía proteína OK1, pero se trató de otro modo en la misma manera que las preparaciones A y B. Se llevaron a cabo dos ensayos que fueron independientes entre sí, para todas las preparaciones (A, B, C).

Usando un contador de centelleo, los almidones de las preparaciones A, B y C se investigaron para la presencia de fosfato marcado de manera radiactiva (véase Procedimientos generales, parte 11 b). Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Fig. 3.

Tabla 1: Demostración de la actividad fosforilante de almidón de la proteína Ok1

	Radiactividad medida [cpm]	
	Ensayo 1	Ensayo 2
Preparación A (almidón no fosforilado + OK1)	42	47
Preparación B (almidón fosforilado + OK1)	7921	8226
Preparación C (almidón fosforilado sin proteína)	56	53

A partir de los resultados obtenidos, se puede ver que la proteína OK1 no transfiere grupos fosfato a partir de ATP cuando el almidón no fosforilado se proporciona como un sustrato, ya que la proporción de grupos fosfato transferidos al almidón no fosforilado por medio de una proteína OK1, medida en cpm, no excede la proporción de grupos fosfato marcados de manera radiactiva en la preparación C (control). Si, por otra parte, se proporciona almidón-P como un sustrato, la proporción de grupos fosfato radiactivos, medida en cpm, que se transfieren desde el ATP al almidón-P, es significativamente más alta. A partir de esto, se puede ver que la proteína OK1 requiere

almidón-P como un sustrato y que el almidón no fosforilado no se acepta como un sustrato por la proteína OK1. Si el ensayo descrito anteriormente se lleva a cabo con ATP marcado de manera específica en la posición gamma con ^{33}P , entonces no es posible establecer una incorporación de fosfato marcado de manera radiactiva en el almidón. A partir de esto, se puede ver que el resto de fosfato beta de ATP se transfiere de una proteína OK1 al almidón. Los resultados de tal ensayo se muestran en la Fig. 6.

7. Demostración de autofosforilación

La autofosforilación de la proteína A.t.-OK1 se demostró por medio de los procedimientos descritos anteriormente (véase Procedimientos generales, parte 12). En el presente documento, se incubaron 50 μg de proteína A.t.-OK1 purificada con ATP aleatorizado marcado de manera radiactiva en 220 μl de tampón de fosforilación (véase anteriormente, Procedimientos generales, parte 12d) a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación. Posteriormente, se retiraron en cada caso 100 μl de las preparaciones de la incubación y se transfirieron a cuatro recipientes de reacción frescos. En el recipiente de reacción 1, la reacción se detuvo mediante la adición de 40 μl de EDTA 0,11 M. El recipiente de reacción 2 se incubó a 95 °C durante 5 minutos. Se añadió HCl al recipiente de reacción 3 hasta una concentración final de 0,5 M, y el NaOH se añadió a un recipiente de reacción 4 hasta una concentración final de 0,5 M. Los recipientes de reacción 3 y 4 se incubaron cada uno durante 25 minutos a 30 °C. Posteriormente, en cada caso, se retiraron 50 μl de los recipientes de reacción 1, 2, 3 y 4, se mezclaron con tampón de ensayo SDS y se separaron por medio de electroforesis en gel de acrilamida SDS (gel de acrilamida al 7,5 %). A tal fin, las muestras de los recipientes de reacción se aplicaron a cada uno de dos geles de acrilamida idénticos. Uno de los geles obtenidos al finalizar la electroforesis se sometió a autorradiografía, mientras que el segundo gel se tiñó con azul de Coomassie.

En el gel teñido con azul de Coomassie (véase Fig. 2A) se puede ver claramente que el tratamiento con NaOH 0,5 M lleva a una degradación de la proteína OK1. La proteína OK1 se debe describir, por tanto, como inestable en comparación con el NaOH. Las incubaciones a 30 °C, 95 °C y con HCl 0,5 M muestran que la proteína OK1 es relativamente estable en las condiciones de incubación indicadas. Esto se puede deducir del hecho de que, en estas condiciones de incubación, en cada caso, se puede demostrar la existencia de aproximadamente las mismas cantidades de proteína OK1 en el gel e n cuestión tras la coloración con azul de Coomassie.

En la autorradiografía (véase Fig. 2B) se puede ver mediante comparación con la proteína OK1 fosforilada incubada a 30 °C que una incubación de la proteína OK1 fosforilada a 95 °C lleva a una reducción significativa en el fosfato, que se ha unido a la proteína OK1. La unión entre el resto de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 se puede describir por tanto como inestable al calor. Además, una leve reducción del fosfato unido a la proteína OK1 también se puede ver para la incubación con HCl 0,5 M y NaOH 0,5 M en comparación con la proteína OK1 fosforilada incubada a 30 °C. Si se tiene en cuenta el hecho de que la cantidad de proteína OK1 en la autorradiografía ras el tratamiento con NaOH 0,5 M es significativamente menor que en las muestras tratadas con calor y ácido debido a la inestabilidad de la proteína OK1 comparada con NaOH, entonces se puede concluir que la unión entre el resto fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 será relativamente estable con respecto a bases. Dado que la muestra tratada con ácido contiene aproximadamente las mismas cantidades de proteína que la muestra incubada a 30 °C y a 95 °C, y todavía tiene una señal significativamente más baja en la autorradiografía que en la muestra tratada a 30 °C, se debe asumir que las condiciones de incubación con ácido también dividen la unión entre un resto de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 para un determinado grado. Una inestabilidad en la unión entre un resto de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 podría, por tanto, establecerse en los ensayos llevados a cabo. Al mismo tiempo, la inestabilidad con respecto a los ácidos está significativamente menos marcada que la inestabilidad con respecto al calor.

Las uniones entre los aminoácidos de histidina y fosfato son inestables al calor, inestables al ácido, pero estables con bases (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Los resultados descritos anteriormente son, por tanto, una indicación de que se produce una fosfohistidina mediante la autofosforilación de una proteína OK1.

Si la proteína OK1 expresada de manera recombinante, tal como se describe anteriormente, se incuba con ATP marcado de manera específica con ^{33}P en la posición gamma, entonces no se puede detectar autofosforilación. La Fig. 5A muestra la cantidad de proteína en la respectiva preparación de reacción que aún se puede demostrar por medio de análisis de transferencia de Western tras las apropiadas etapas de incubación. La Fig. 5B muestra una autorradiografía de la proteína de las preparaciones de reacción individuales. Se puede ver que, cuando se usa el ATP marcado de manera específica en la posición gamma, no tiene lugar la autofosforilación de la proteína Ok1, mientras que, cuando se usa ATP aleatorizado, se puede demostrar la autofosforilación. Esto significa que cuando una proteína OK1 se autofosforila, el resto de fosfato de la posición beta del ATP está unido de manera covalente a un aminoácido de la proteína OK1.

8. Demostración de las posiciones del átomo de C de las moléculas de glucosa del almidón fosforilado por una proteína OK1

a) Producción de almidón fosforilado

El almidón fosforilado se creó de acuerdo con Procedimientos generales, parte 7. A tal fin, se puso a reaccionar 5 mg de almidón no fosforilado, aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* con 25 μg de proteína A.t.-OK1 purificada en una preparación A, y 5 mg de almidón fosforilado *in vitro*, aislado originalmente a partir de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*, se pusieron a reaccionar con 5 μg de proteína R1 purificada en

una segunda preparación B. En cada caso, la reacción tuvo lugar en 500 µl de tampón de fosforilación, que contenían ATP marcado con ³³P en cada caso (aproximadamente 2,5 x 10⁶ cpm) por medio de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación. Además, se usó una preparación de control, que contenía 5 mg de almidón aislado a partir de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* y dicho tampón de fosforilación, pero sin proteína. La preparación de control se trató exactamente del mismo modo que las preparaciones A y B. Las reacciones individuales se detuvieron mediante la adición de 125 µl de SDS al 10 % en cada caso y se lavaron con 900 µl en cada caso, una vez con SDS al 2 %, cinco veces con ATP 2 mM y dos veces con H₂O. Se llevó a cabo una centrifugación tras cada etapa de lavado (2 minutos en una centrifugadora de mesa de Eppendorf a 13.000 rpm en cada caso). Los sedimentos de almidón obtenidos se resuspendieron en 1 ml de H₂O en cada caso, se mezclaron 100 µl de cada preparación tras añadir 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) y posteriormente se midieron las preparaciones con la ayuda de un contador de centelleo (Contador de centelleo multifunción LS 6500, BECKMANN COULTER™).

La medición proporcionó los siguientes resultados:

Control:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Preparación A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Preparación B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

b) Hidrólisis total del almidón-P

Las suspensiones de las preparaciones A, B y C obtenidas de acuerdo con la etapa a) se centrifugaron de nuevo (5 minutos en una centrifugadora de mesa de Eppendorf a 13.000 rpm), los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 90 µl de HCl 0,7 M (Baker, para análisis) y posteriormente se incubaron durante 2 horas a 95 °C. Las preparaciones A, B y C se centrifugaron entonces de nuevo (5 minutos en una centrifugadora de mesa de Eppendorf a 13.000 rpm) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo recipiente de reacción. Los restos sedimentados de las preparaciones se resuspendieron en 100 ml de H₂O en cada caso y tras la adición de 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) se midieron con la ayuda de un contador de centelleo (Contador de centelleo multifunción LS 6500, BECKMANN COULTER™). No se pudo demostrar la existencia de cantidades significativas de radiactividad en ninguno de los restos, lo que significa que todos los productos de hidrólisis marcados con fosfato radiactivo se localizaban en el sobrenadante.

Esto fue seguido de una neutralización de los sobrenadantes individuales que contenían los productos de hidrólisis mediante la adición en cada caso de 30 µl de NaOH 2 M (la cantidad de NaOH requerida para la neutralización se ensayó con antelación en muestras enmascaradas): Los productos de hidrólisis neutralizados se colocaron en un filtro Microcon de 10 kDa, que se había enjuagado previamente dos veces con 200 µl de H₂O en cada caso y se centrifugaron durante aproximadamente 25 minutos a 12.000 rpm en una centrifugadora de mesa de Eppendorf. Se tomaron 10 µl del filtrado obtenido (aproximadamente 120 µl en cada caso) y, tras la adición de 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN), se midieron con la ayuda de un contador de centelleo (Contador de centelleo multifunción Ls 6500, BECKMANN COULTER™). La determinación de la actividad presente en las preparaciones individuales dio los siguientes resultados:

Preparación A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
Preparación B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

c) Separación de los productos de hidrólisis

Los productos de hidrólisis obtenidos de acuerdo con la etapa b) se separaron por medio de HPAE usando un sistema Dionex en las condiciones indicadas anteriormente (véase Procedimientos generales, parte 13c). Las muestras para la separación de los sobrenadantes filtrados de las preparaciones A y B obtenidas de acuerdo con la etapa b) estaban compuestas tal como sigue:

Preparación A (OK1): 43 µl del sobrenadante de la preparación A obtenido de acuerdo con la etapa b) (equivalente a aproximadamente 4.000 cpm), 32 µl de H₂O, 2,5 µl de glucosa-6-fosfato 2,5 mM y 2,5 µl de glucosa-3-fosfato 5 mM (Σ Volumen = 80 µl).

Preparación B (R1): 16 µl del sobrenadante de la preparación B obtenido de acuerdo con la etapa b) (equivalente a aproximadamente 4.000 cpm), 59 µl de H₂O, 2,5 µl de glucosa-6-fosfato 2,5 mM y 2,5 µl de glucosa-3-fosfato 5 mM (Σ Volumen = 80 µl).

En cada caso, 60 µl que contienen aproximadamente 3.000 cpm, de las muestras apropiadas se inyectaron para la separación por medio de HPAE. La HPAE se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones especificadas en la parte 23c. Tras pasar a través de la columna HPAE, el tampón de elución se recogió en fracciones, cada una de 1 ml. La recogida de las fracciones comenzó 10 minutos después de inyectar la muestra. Basándose en la señal recibida a partir del detector PAD usad, la elución de glucosa-6-fosfato se asignó a la fracción 15 y la elución de glucosa-3-fosfato a la fracción 17. En cada caso, se mezclaron 500 µl de fracciones individuales con 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) y se midieron posteriormente con la ayuda de un contador de centelleo (Contador de centelleo multifunción LS 6500, BECKMANN COULTER™). Las siguientes mediciones se obtuvieron

para las fracciones individuales:

Tabla 4: Cantidades de radiactividad medidas [cpm] en las fracciones individuales de los productos de hidrólisis obtenidos mediante la hidrólisis del almidón fosforilado por medio de una proteína OK1 o de una proteína R1.

	Total de cpm por fracción	
	Preparación A (OK1)	Preparación B (R1)
Fr 13	8,7	3,3
Fr 14	13,1	32,2
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
Fr 16	399,8	112,3
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
Fr 18	196,7	17,3
Fr 19	6,7	18,9
Total	2581,5	2938,3
Depósito	3000,0	3000,0
Recuperación	86,0 %	97,9 %

Los resultados también se muestran de manera gráfica en la Fig. 5.

- 5 Tras la fosforilación del almidón catalizado por la proteína R1, aproximadamente el 66 % del fosfato marcado de manera radiactiva, con respecto al total de fosfato radiactivo medido en las fracciones analizadas, se eluyó tras la hidrólisis del almidón con la fracción, que contenía glucosa-6-fosfato como patrón, y aproximadamente el 27 % con la fracción, que contenía glucosa-3-fosfato como patrón. Tras la fosforilación del almidón catalizado por la proteína OK1, aproximadamente el 67% del fosfato marcado de manera radiactiva, con respecto al total de fosfato radiactivo medido en las fracciones analizadas, se eluyó tras la hidrólisis del almidón con la fracción, que contenía glucosa-3-fosfato como patrón, y aproximadamente el 8% con la fracción, que contenía glucosa-6-fosfato como patrón. A partir de esto, se puede concluir que las moléculas de glucosa del almidón de las proteínas R1 están preferentemente fosforiladas en la posición C-6, mientras que las moléculas de glucosa del almidón de las proteínas OK1 están preferentemente fosforiladas en la posición C-3.

15 9. Identificación de una proteína OK1 en el arroz

El uso de los procedimientos descritos en Procedimientos generales, partes 1 a 13, también fue posible para identificar una proteína de *Oryza sativa* (variedad M202) que transfiere un resto de fosfato desde el ATP al almidón-P. La proteína se denominó O.s.-OK1. El almidón no fosforilado no se usa por la proteína O.s.-OK1 como un sustrato, es decir, la proteína O.s.-OK1 tampoco necesita almidón-P como un sustrato. La secuencia de ácido nucleico que define la proteína O.s.-OK1 identificada se muestra en la SEQ ID NO 3 y la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína O.s.-OK1 se muestra en la SEQ ID NO. 4. La secuencia de aminoácidos que codifica la proteína O.s.-OK1 mostrada en la SEQ ID NO 4 tiene una identidad del 57 % con la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína A.t.-OK1 mostrada en la SEQ ID NO 2. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína O.s.-OK1 mostrada en la SEQ ID NO 3 tiene una identidad del 61% con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína A.t.-OK1 mostrada en la SEQ ID NO 1.

Producción del plásmido pMI50 que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína OK1 de *Oryza sativa*

El vector pMI50 contiene un fragmento de ADN, que codifica la proteína OK1 completa del arroz de la variedad M202.

30 La amplificación del ADN del arroz se llevó a cabo en cinco subetapas.

La parte del marco de lectura abierto desde la posición 11 hasta la posición 288 de la secuencia especificada en la SEQ ID NO 3 se amplificó con la ayuda de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa usando el oligonucleótido sintético Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) y Os_Ok1-F6 (AAAACCTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) como un cebador en el ARN de las semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pML123.

35 La parte del marco de lectura abierto desde la posición 250 hasta la posición 949 de la secuencia especificada en la SEQ ID NO 3 se amplificó con la ayuda de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa usando

el oligonucleótido sintético Os_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) y Os_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) como un cebador en el ARN de las semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pML120.

5 La parte del marco de lectura abierto desde la posición 839 hasta la posición 1761 de la secuencia especificada en la SEQ ID NO 3 se amplificó con la ayuda de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa usando el oligonucleótido sintético Os_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) y Os_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) como un cebador en el ARN de las semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pML121.

10 La parte del marco de lectura abierto desde la posición 1571 hasta la posición 3241 de la secuencia especificada en la SEQ ID NO 3 se amplificó con la ayuda de la transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa usando el oligonucleótido sintético Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) y Os_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) como un cebador en el ARN de las semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pML119.

La parte del marco de lectura abierto desde la posición 2777 hasta la posición 3621 se amplificó con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa usando el oligonucleótido sintético Os_OK1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) y Os_OK1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) como un cebador en el ADN genómico de arroz. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pML122.

La clonación conjunta de las subpartes del marco de lectura abierto de OK1 se llevó a cabo como sigue.

700 pares de bases a lo largo del fragmento *Apal* de pML120, que contienen parte del marco de lectura abierto de la OK1, se clonaron en el sitio de *Apal* de pML121. El plásmido obtenido se denominó pMI47.

25 Un fragmento de 960 pares de bases que contienen las áreas de vectores de pML120 y pML123 que codifican OK1 se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Al hacerlo, los cebadores Os_ok1-F4 (véase anteriormente) y Os_ok1-R9 (véase anteriormente), cada uno en una concentración de 50 nM, y los cebadores Os_ok1-F6 y Os_ok1-R6, cada uno en una concentración de 500 nM, se usaron. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pMI44.

30 Un fragmento de 845 pares de bases de longitud de pML122 se volvió a amplificar para la introducción de un sitio *XhoI* tras el codón de parada con los cebadores Os_ok1-F3 (véase anteriormente) y Os_ok1-R2Xho (AAAACGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) y se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20). El plásmido obtenido se denominó pMI45.

35 Un fragmento de 1671 pares de bases de longitud que contiene parte del marco de lectura abierto de OK1 se obtuvo a partir de pML119 mediante digestión con las enzimas de restricción *SpeI* y *PstI*. El fragmento se clonó en pBluescript II SK+ (GenBank Acc.: X52328). El plásmido obtenido se denominó pMI46.

Un fragmento de 1706 pares de bases de longitud que contiene parte del marco de lectura abierto de la OK1 se retiró con las enzimas de restricción *SpeI* y *XhoI* de pMI46 y se clonó en el vector pMI45, que se había retirado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se denominó pMI47.

40 Un fragmento de 146 pares de bases de longitud que contiene parte del marco de lectura abierto de la OK1 se retiró con las enzimas de restricción *AflI/NotI* de pMI43 y se clonó en el vector pMI44, que se había retirado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se denominó pMI49.

45 Un fragmento de 1657 pares de bases de longitud que contiene parte del marco de lectura abierto de la OK1 se retiró con las enzimas de restricción *NotI* y *NarI* del vector pMI49 y se clonó en el vector pMI47, que se había retirado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se denominó npMI50 y contiene la región codificante completa de la proteína OK1 identificada en el arroz.

10. Producción de un anticuerpo, que reconoce específicamente una proteína OK1

50 Como un antígeno, aproximadamente 100 µg de proteína A.t.-OK1 se separó por medio de electroforesis en gel SDS, las bandas de proteína que contienen la proteína A.t.-OK1 se retiraron y se enviaron a la compañía EUROGENTEC S.A. (Bélgica), que llevaron a cabo la producción del anticuerpo bajo contrato. A continuación, los sueros preinmunes de conejos se investigaron para ver si ya detectaban una proteína del extracto total se A. t. antes de la inmunización con OK1 recombinante. Los sueros preinmunes de dos conejos no detectaron proteínas en el intervalo de 100-150 kDa y fueron, por tanto, elegidos para la inmunización. Se pusieron 4 inyecciones de 100 µg (marcador 0, 14, 28, 56) a cada conejo. Se tomaron 4 muestras de sangre de cada conejo: (Marcador 38, Marcador 66, Marcador 87 y el sangrado final). El suero, obtenido tras el primer sangrado, ya mostraba una reacción específica con antígeno de OK1 en el análisis por transferencia de Western. Sin embargo, en todos los ensayos adicionales, se usó el último sangrado de un conejo.

11. Producción de plantas de arroz transgénicas, que presentan una actividad aumentada de una proteína OK1

60 a) Producción del plásmido pGlo-A.t.-OK1

El plásmido pIR94 se obtuvo mediante la amplificación del promotor del gen de la globulina del arroz por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (30 x 20 s a 94 °C, 20 s a 62 °C, 1 min a 68 °C, con Mg₂SO₄ 4 mM) con los cebadores glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) y glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) en el ADN genómico del arroz de la variedad M202 con marcador de polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen, número de catálogo 11304-011) y se clonó en pCR2.1 (Invitrogen, número de catálogo K2020-20).

El plásmido pIR115 se obtuvo mediante clonación de una parte sintética de ADN que consiste en los dos oligonucleótidos X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACTAGTAAGCTTAATTAAGATATCATTTAC) y X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCTCTGCAGCCTGCA) en el vector pGSV71 retirado con SdaI y MunI.

El plásmido pIR115 obtenido se retiró con SdaI, Los extremos 3' sobresalientes suavizados con T4 ADN polimerasa y un fragmento HindIII / SphI de pBinAR (Höfgen and Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) con un tamaño de 197 pares de bases, suavizado por medio de T4 ADN polimerasa y que contiene la señal de terminación del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, se insertó. El plásmido obtenido se denominó pIR96.

El plásmido pIR103 se obtuvo por clonación de un fragmento de ADN de 986 pares de bases de longitud de pIR94 que contiene el promotor del gen de la globulina del arroz, que se clonó en el plásmido pIR96.

El pGSV71 es un derivado del plásmido pGSV7, que deriva del vector intermediario pGSV1. pGSV1 constituye un derivado de pGSC1700, cuya construcción se ha descrito por Cornelissen y Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25). pGSV1 se obtuvo de pGSC1700 mediante delección del gen de la resistencia a la carbenicilina y delección de las secuencias de ADN-T de la región de ADN-TL del plásmido pTiB6S3.

pGSV7 contiene el origen de replicación del pBR322 (Bolívar y col., Gene 2, (1977), 95-113) así como el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh y col., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 también contiene el gen marcador seleccionable *aadA*, del transposón Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae*, que da resistencia frente a los antibióticos espectinomicina y estreptomycin (Tolmashy, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmashy and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40).

El plásmido pGSV71 se obtuvo mediante clonación de un gen *bar* quimérico entre las regiones de borde de pGSV7. El gen *bar* contiene la secuencia promotora del virus del mosaico de la coliflor para la iniciación de la transcripción (Odell y col., Nature 313, (1985), 180), el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson y col., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) y el área 3' sin traducir del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. El gen *bar* proporciona tolerancia frente al herbicida glufosinato de amonio.

Un fragmento de ADN, que contiene la secuencia de todo el marco de lectura abierto de la proteína OK1 de *Arabidopsis*, se retiró del vector A.t.-OK1-pGEM y se clonó en el vector pIR103. A tal fin, se retiró el plásmido A.t.-OK1-pGEM con la enzima de restricción Bsp120I, los extremos se suavizaron con T4 ADN polimerasa y se volvió a retirar con Sall. El fragmento de ADN que codifica la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* se clonó en el vector pIR103, que se retiró con Ecl136II y XhoI. El plásmido obtenido se denominó pGlo-A.t.-OK1.

b) Transformación de plantas de arroz

Las plantas de arroz (variedad M202) se transformaron con *Agrobacterium* (que contiene el plásmido pGlo-A.t.-OK1), usando el procedimiento descrito por Hiei y col. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282).

c) Análisis de las plantas de arroz transgénicas y el almidón sintetizado por éstas

Por medio de análisis por RT-PCR, fue posible identificar proteínas, que presentan una expresión de ARNm que codifica la proteína A.t.-OK1. Las plantas, que presentan una cantidad detectable de ARNm que codifica la proteína A.t.-OK1 en comparación con las correspondientes plantas de tipo silvestre, se cultivaron en el invernadero. Se cosecharon los cereales de estas plantas. El almidón, aislado de estos cereales maduros, mostró un contenido aumentado de fosfato unido de manera covalente con el respectivo almidón en comparación con el almidón, que se ha aislado de cereales de las correspondientes plantas de tipo silvestre.

12. Producción de plantas de patata transgénicas, que presentan una actividad aumentada de una proteína OK1

a) Producción del plásmido pBinB33-Hyg

Comenzando con el plásmido pBinB33, el fragmento EcoRI-HindIII que contiene el promotor B33, una parte del polienlazador y el terminador de ocs se retiraron y se cortaron y empalmaron en el correspondiente vector retirado pBIB-Hyg (Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203). El plásmido pBinB33 se obtuvo mediante corte y empalme del promotor del gen B33 de la patatina de *Solanum tuberosum* (Rocha y col., 1989) como un fragmento DraI (nucleótido - 1512 - +14) en el vector pUC19 retirado con SstI, cuyos extremos se habían suavizado con la ayuda de la T4 ADN polimerasa. Esto dio como resultado el plásmido pUC19-B33. El promotor B33 se retiró de este plásmido con EcoRI y SmaI y se cortó y empalmó en el correspondiente vector retirado pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230). Esto dio como resultado el vector de expresión en plantas pBinB33.

b) Producción del vector A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

La secuencia codificante de la proteína A.t.-OK1 se retiró con las endonucleasas de restricción Bsp120I y Sall del plásmido A.t.-OK1-pGEM y se cortó y empalmó en el vector pBinB33-Hyg retirado con *SmaI* y *Sall*. El plásmido obtenido se denominó A.t.-OK1-pBinB33-Hyg.

c) Transformación de plantas de patata

5 *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV2260) se transformó con el plásmido A.t.-OK1-pBinB33-Hyg. Posteriormente, las plantas de patata de la variedad Désirée se transformaron con la ayuda de la *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plasmido A.t.-OK1-pBinB33-Hyg de acuerdo con el procedimiento descrito por Rocha-Sosa y col. (EMBO J. 8, (1989), 23-29), y se regeneraron las plantas. Las plantas obtenidas a partir de este evento de transformación se denominaron 385JH.

10 d) Análisis de las plantas de patata transgénicas y el almidón sintetizado por éstas

Por medio de análisis de transferencia de Northern, fue posible identificar plantas del evento de transformación 385JH, que presentan una expresión de ARNm, que codifica la proteína A.t.-OK1.

Un análisis por transferencia de Western, que se realizó con el anticuerpo descrito en el Ejemplo 10, confirmó, que las plantas del evento de transformación 385JH, en las que el ARNm de la proteína OK1 expresada de manera heteróloga se detectó, también presentaban una cantidad aumentada de proteína OK1 en comparación con las plantas de tipo silvestre que no se habían transformado. La Fig. 7 muestra de manera ejemplar la detección de proteína A.t.-OK1 en plantas únicas del evento de transformación 385JH por medio del análisis de transferencia de Western. Para la inducción del promotor B33 en líneas únicas de tejido de hoja del evento de transformación 385JH se cultivaron en medio Musharige Skoog que contiene sacarosa 100 mM en cultivo tisular durante dos días. Después de la cosecha, se produjeron extractos proteicos a partir de tejido de hoja de estas plantas de acuerdo con el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 1a). Tras la separación de las proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante, se analizaron 40 µg de extracto de proteína por medio de análisis por transferencia de Western usando el anticuerpo descrito en Ejemplos, parte 10. Como muestras de control, los extractos de proteína de plantas de *Arabidopsis* y de plantas de patata de tipo silvestre (cv Désirée) también se analizaron. Las plantas, que presentaban una cantidad aumentada de proteína OK1 y una cantidad detectable de ARNm que codifica la proteína A.t.-OK1, se cultivaron en el invernadero. El almidón, que se aisló de tubérculos de esas plantas, mostró un contenido aumentado en fosfato unido de manera covalente al correspondiente almidón.

30 **13. Producción de plantas de maíz transgénicas, que presentan una actividad aumentada de una proteína OK1**

a) Producción del plásmido pUbi-A.t.-OK1

En primer lugar, se creó el plásmido pIR96. El plásmido pIR96 se obtuvo mediante clonación de una parte sintética de ADN que consiste en los dos oligonucleótidos X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) y X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) en el vector pGSV7 retirado con *SdaI* y *MunI*. El plásmido obtenido se retiró con *SdaI* y los extremos 3' sobresalientes se suavizaron con T4 ADN polimerasa. El plásmido obtenido se retiró con *SdaI*, los extremos 3' sobresalientes se suavizaron con T4 ADN polimerasa y un largo fragmento *HindIII* / *SphI* de 197 pares de bases de pBinAR, suavizado con T4 ADN polimerasa (Höfgen y Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), y que contiene la señal de terminación del gen de la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, se insertó. El plásmido obtenido se denominó pIR96.

El pGSV7 es un derivado del plásmido pGSV1, que deriva del vector intermediario pGSV1. pGSV1 constituye un derivado de pGSC1700, cuya construcción se ha descrito por Cornelissen y Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25). pGSV1 se obtuvo de pGSC1700 mediante delección del gen de la resistencia a la carbenicilina y delección de las secuencias de ADN-T de la región de ADN-TL del plásmido pTiB6S3.

pGSV7 contiene el origen de replicación del pBR322 (Bolívar y col., Gene 2, (1977), 95-113) así como el origen de replicación del plásmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh y col., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 también contiene el gen marcador seleccionable *aadA*, del transposón Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae*, que da resistencia frente a los antibióticos espectinomina y estreptomina (Tolmasy, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasy and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40). El plásmido pGSV7 se obtuvo mediante clonación de un gen *bar* quimérico entre las regiones de borde de pGSV7. El gen *bar* contiene la secuencia promotora del virus del mosaico de la coliflor para la iniciación de la transcripción (Odell y col., Nature 313, (1985), 180), el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson y col., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) y el área 3' sin traducir del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 para la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

El gen *bar* proporciona tolerancia frente al herbicida glufosinato de amonio. Un fragmento de 1986 pares de bases de longitud que contiene el promotor del gen de la poliubiquitina del maíz (Genes from Maize (Gens aus Mais) (EMBL Acc.: 94464, Christensen y col., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) se clonó como un fragmento de PstI en pBluescript II SK+. El plásmido obtenido se denominó pSK-ubq.

Se retiró el plásmido A.t.-OK1-pGEM con la enzima de restricción Bsp120I, los extremos se suavizaron con T4 ADN polimerasa y se volvió a retirar con *SacI*. El fragmento de ADN que codifica la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana*

se clonó en el plásmido pSK-ubq, que se retiró con *SmaI* y *SacI*. El plásmido obtenido se denominó pSK-ubq-ok1. Se aisló un fragmento del plásmido pSK-ubq-ok1, que contiene el promotor de la ubiquitina del maíz y todo el marco de lectura abierto para la proteína A.t-OK1 de *Arabidopsis thaliana*. A tal fin, se retiró el plásmido con la enzima de restricción *Asp718I*, los extremos se suavizaron con T4 ADN polimerasa y se volvió a retirar con *SdaI*. El fragmento de 5799 pares de bases de longitud se clonó en el plásmido pIR96 retirado con *EcoRV* y *PstI*. El plásmido obtenido de esta clonación se denominó pUbi-A.t.-OK1.

b) Transformación de plantas de maíz

Las plantas de maíz se transformaron el plásmido pUbi-A.t.-OK1 usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, parte 17.

c) Análisis de las plantas de maíz transgénicas y el almidón sintetizado por éstas

Usando análisis por transferencia de Northern, se pudieron identificar plantas, que presentan una expresión de ARNm, que codifica la proteína A.t-OK1.

Las plantas del maíz, que presentan una cantidad detectable de ARNm que codifica la proteína A.t-OK1 en comparación con las correspondientes plantas de tipo silvestre, se cultivaron en el invernadero. Se cosecharon los cereales únicos de estas plantas. El almidón, aislado de estos cereales maduros, mostró un contenido aumentado de fosfato unido de manera covalente con el respectivo almidón en comparación con el almidón, que se ha aislado de cereales de las correspondientes plantas de tipo silvestre.

14. Producción de plantas de maíz transgénicas, que presentan una actividad aumentada de una proteína OK1

a) Producción de un plásmido para la transformación de plantas de trigo

El pMCS5 (Mobitec, www.mobitec.de) se digirió con *BglII* y *BamHI* y se reinsertó. El plásmido contenido se denominó pML4.

El terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker y col., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) se amplificó con los cebadores P9 (ACTTCTgCAGcGgCCgCgATCgTTC AACATTTggCAATAAAgTTTC) y P10 (TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAGATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC) (25 ciclos, 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C), se digirió con *HindIII* and *PstI*, y se clonó en el plásmido pML4 que se ha retirado con las mismas enzimas. El plásmido contenido se denominó pML4-nos. Un fragmento de 1986 pares de bases de longitud que contiene el promotor del gen de la poliubiquitina del maíz (Genbank Acc.: 94464, Christensen y col., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) y el primer intrón del mismo gen, se acortó mediante digestión con *Clal* y re inserción, se clonaron en este vector. El plásmido contenido se denominó pML8.

Todo el marco de lectura abierto de OK1 de *Arabidopsis thaliana* se clonó en el plásmido pML8. Para hacer esto, se retiró el correspondiente fragmento con *Bsp120I/NotI* de A.t.-OK1-pGEM y se cortó y empalmó en el sitio *NotI* de pML8 en una orientación "en sentido".

Se puede retirar un fragmento para la transformación del vector pML8-A.t.-OK1 obtenido con las enzimas de restricción *AvrII* and *SwaI*, que contiene el promotor del gen de la ubiquitina del maíz, Todo el marco de lectura abierto de OK1 de *Arabidopsis thaliana* y el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens*.

b) Transformación de plantas de trigo

Las plantas de trigo de la variedad Florida se transformaron con un fragmento purificado a partir de un gel de agarosa, que se retiró con las enzimas de restricción *AvrII* y *SwaI* del plásmido pML8-A.t.-OK1 y que contiene el promotor del gen de la poliubiquitina del maíz, todo el marco de lectura abierto de OK1 de *Arabidopsis thaliana* y el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens*, y con el plásmido pGSV71 que usa el procedimiento biolístico de acuerdo con el procedimiento descrito por Becker y col. (1994, Plant Journal 5, 299-307).

c) Análisis de las plantas de maíz transgénicas y el almidón sintetizado por éstas

El almidón se aisló de cereales maduros de plantas t0 obtenidas de la transformación y se determinó el contenido de fosfato unido de manera covalente al almidón. El contenido de fosfato del almidón, que se aisló de los cereales individuales, era claramente más alto que en el caso del almidón, que se ha aislado de cereales de las correspondientes plantas de tipo silvestre.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Plantas con actividad aumentada de una enzima fosforilante de almidón

<130> BCS 04-5002-PCT

ES 2 635 250 T3

<150> EP04090086.2
<151> 05-03-2004

5 <150> US60/549.945
<151> 05-03-2004

<150> US60/549.945 provisional
<151> 05-03-2004

10 <150> EP04090121.7
<151> 29-03-2004

<160> 5

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 3591
<212> ADN

20 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3591)

25 <223>

<400> 1

ES 2 635 250 T3

atg Met 1	gag Glu	agc Ser	att Ile	ggc Gly 5	agc Ser	cat His	tgt Cys	tgc Cys	agc Ser 10	tct Ser	cct Pro	ttc Phe	acc Thr	ttc Phe 15	atc Ile	48
act Thr	aga Arg	aac Asn	tca Ser 20	tca Ser	tca Ser	tca Ser	ctt Leu	cct Pro 25	aga Arg	ctc Leu	gtt Val	aac Asn	atc Ile 30	act Thr	cac His	96
aga Arg	gtt Val	aat Asn 35	ctc Leu	agc Ser	cac His	caa Gln 40	tct Ser 40	cac His	cga Arg	ctc Leu	aga Arg	aac Asn 45	tcc Ser	aat Asn	tct Ser	144
cgt Arg	ctc Leu 50	act Thr	tgc Cys	act Thr	gct Ala 55	act Thr 55	tct Ser	tct Ser	tcc Ser	acc Thr	att Ile 60	gag Glu	gaa Glu	caa Gln	cgg Arg	192
aag Lys 65	aag Lys	aaa Lys	gat Asp	gga Gly 70	tca Ser 70	gga Gly	acg Thr	aaa Lys	gtg Val 75	agg Arg 75	ttg Leu	aat Asn	gtg Val	agg Arg	tta Leu 80	240
gat Asp	cat His	caa Gln	gtt Val	aat Asn 85	ttt Phe	ggt Gly	gac Asp	cat His	gtg Val 90	gct Ala	atg Met	ttt Phe	gga Gly	tca Ser 95	gct Ala	288
aaa Lys	gag Glu	att Ile	ggt Gly 100	tca Ser	tgg Trp	aaa Lys	aag Lys	aaa Lys 105	tcg Ser	cct Pro	ttg Leu	aat Asn	tgg Trp 110	agt Ser	gag Glu	336
aat Asn	gga Gly	tgg Trp 115	gtt Val	tgt Cys	gag Glu	ttg Leu	gaa Glu 120	ctt Leu	gac Asp	ggt Gly	ggt Gly	cag Gln 125	gtt Val	ttg Leu	gag Glu	384
tat Tyr	aag Lys 130	ttt Phe	gtc Val	att Ile	gtt Val	aag Lys 135	aat Asn	gat Asp	ggt Gly	tca Ser	ctt Leu 140	tca Ser	tgg Trp	gaa Glu	tct Ser	432
ggt Gly 145	gat Asp	aat Asn	cgt Arg	gtc Val	ctt Leu 150	aag Lys	gtt Val	cca Pro	aat Asn	tct Ser 155	ggg Gly	aat Asn	ttt Phe	tct Ser	gtt Val 160	480
gtt Val	tgt Cys	cat His	tgg Trp	gat Asp 165	gct Ala	act Thr	aga Arg	gaa Glu	acc Thr 170	ctt Leu	gat Asp	ttg Leu	cct Pro	cag Gln 175	gag Glu	528
gtt Val	ggt Gly	aat Asn	gat Asp 180	gat Asp	gat Asp	gtt Val	ggt Gly	gat Asp 185	ggt Gly	ggg Gly	cat His	gag Glu	agg Arg 190	gat Asp	aat Asn	576
cat His	gat Asp	gtt Val 195	ggt Gly	gat Asp	gat Asp	aga Arg	gta Val 200	gtg Val	gga Gly	agt Ser	gaa Glu	aat Asn 205	ggt Gly	gcg Ala	cag Gln	624
ctt Leu	cag Gln 210	aag Lys	agt Ser	aca Thr	ttg Leu	ggt Gly 215	ggg Gly	caa Gln	tgg Trp	caa Gln 220	ggt Gly 220	aaa Lys	gat Asp	gcg Ala	tcc Ser	672
ttt Phe 225	atg Met	cgt Arg	tct Ser	aat Asn 230	gat Asp	cat His	ggt Gly	aac Asn	aga Arg	gaa Glu 235	gtt Val	ggt Gly	aga Arg	aat Asn	tgg Trp 240	720
gat Asp	act Thr	agt Ser	ggt Gly	ctt Leu 245	gaa Glu	ggc Gly	aca Thr	gct Ala	ctt Leu 250	aag Lys	atg Met	gtt Val	gag Glu	ggt Gly 255	gat Asp	768
cgc Arg	aac Asn	tct Ser	aag Lys 260	aac Asn	tgg Trp	tgg Trp	aga Arg	aag Lys 265	ctt Leu	gaa Glu	atg Met	gta Val	cgc Arg 270	gag Glu	gtt Val	816

ES 2 635 250 T3

ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac	864
Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr	
275 280 285	
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt	912
Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe	
290 295 300	
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga	960
Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg	
305 310 315 320	
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act	1008
Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr	
325 330 335	
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct	1056
Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser	
340 345 350	
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac	1104
Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp	
355 360 365	
ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag	1152
Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys	
370 375 380	
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta	1200
His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu	
385 390 395 400	
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa	1248
Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys	
405 410 415	
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt	1296
Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu	
420 425 430	
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg	1344
Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met	
435 440 445	
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct tct gcg ctc aat ttg ttt ttt	1392
Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe	
450 455 460	
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg	1440
Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu	
465 470 475 480	
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att	1488
Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile	
485 490 495	
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc	1536
Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala	
500 505 510	
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac	1584
Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp	
515 520 525	
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg	1632
Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met	
530 535 540	

ES 2 635 250 T3

gga Gly 545	gga Gly	gct Ala	gat Asp	caa Gln	ctg Leu 550	gca Ala	aaa Lys	gat Asp	gtg Val	gga Gly 555	tca Ser	aga Arg	aac Asn	gtt Val	gcc Ala 560	1680
tca Ser	tgg Trp	aat Asn	gat Asp	cca Pro 565	cta Leu	gat Asp	gct Ala	ttg Leu	gtg Val 570	ttg Leu	ggt Gly	gtt Val	cac His	caa Gln 575	gta Val	1728
ggt Gly	cta Leu	tct Ser	ggt Gly 580	tgg Trp	aag Lys	caa Gln	gaa Glu	gaa Glu 585	tgt Cys	tta Leu	gcc Ala	att Ile	gga Gly 590	aat Asn	gaa Glu	1776
ctc Leu	ctt Leu	gct Ala 595	tgg Trp	cga Arg	gaa Glu	agg Arg	gac Asp 600	cta Leu	ctt Leu	gaa Glu	aaa Lys	gaa Glu 605	ggg Gly	gaa Glu	gag Glu	1824
gat Asp	gga Gly 610	aaa Lys	aca Thr	att Ile	tgg Trp	gcc Ala 615	atg Met	agg Arg	ctg Leu	aaa Lys	gca Ala 620	act Thr	ctt Leu	gat Asp	cga Arg	1872
gca Ala 625	cgc Arg	aga Arg	tta Leu	aca Thr	gca Ala 630	gaa Glu	tat Tyr	tct Ser	gat Asp	ttg Leu 635	ctt Leu	ctt Leu	caa Gln	ata Ile	ttt Phe 640	1920
cct Pro	cct Pro	aat Asn	gtg Val	gag Glu 645	att Ile	tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gct Ala 650	cta Leu	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu 655	aat Asn	1968
agt Ser	gtc Val	aag Lys	acc Thr 660	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gag Glu 665	att Ile	cgt Arg	gct Ala	gga Gly	att Ile 670	att Ile	ttc Phe	2016
cag Gln	atc Ile	tca Ser 675	aag Lys	ctc Leu	tgc Cys	act Thr	gtt Val 680	ctt Leu	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	gta Val 685	aga Arg	aat Asn	tca Ser	2064
ctt Leu	ggt Gly 690	tct Ser	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	gat Asp 695	gtc Val	gtt Val	gta Val	cct Pro	gga Gly 700	tcg Ser	acg Thr	tct Ser	ggg Gly	2112
aca Thr 705	tta Leu	gtt Val	cag Gln	gtt Val	gag Glu 710	agc Ser	att Ile	gtt Val	ccg Pro	gga Gly 715	tca Ser	ttg Leu	cca Pro	gca Ala	act Thr 720	2160
tct Ser	ggt Gly	ggt Gly	cct Pro	att Ile 725	att Ile	ctc Leu	ttg Leu	gtc Val	aat Asn 730	aaa Lys	gct Ala	gat Asp	ggc Gly 735	gat Asp 735	gaa Glu	2208
gag Glu	gta Val	agt Ser	gct Ala 740	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	aac Asn	ata Ile 745	gct Ala	gga Gly	gtc Val	atg Met 750	ctt Leu 750	ctg Leu	cag Gln	2256
gag Glu	ctg Leu	cct Pro 755	cac His	ttg Leu	tct Ser	cac His	ctt Leu 760	ggc Gly	gtt Val	aga Arg	gcg Ala	cgg Arg 765	cag Gln	gag Glu	aaa Lys	2304
att Ile 770	gtc Val	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	tgt Cys	gat Asp 775	gat Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys	gtt Val 780	gct Ala	gat Asp	ata Ile	cga Arg	2352
cga Arg 785	ctt Leu	gtg Val	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe 790	gtg Val	agg Arg	ttg Leu	gaa Glu	gca Ala 795	tct Ser	cca Pro	agt Ser	cat His	gtg Val 800	2400
aat Asn	ctg Leu	ata Ile	ctt Leu	tca Ser 805	act Thr	gag Glu	ggt Gly	agg Arg	agt Ser 810	cgc Arg	act Thr	tcc Ser	aaa Lys	tcc Ser 815	agt Ser	2448

ES 2 635 250 T3

gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat	2496
Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp	
	820
	825
	830
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca	2544
Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser	
	835
	840
	845
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga	2592
Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly	
	850
	855
	860
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct	2640
Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser	
	865
	870
	875
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg	2688
Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val	
	885
	890
	895
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt	2736
His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val	
	900
	905
	910
gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg	2784
Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser	
	915
	920
	925
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct	2832
Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro	
	930
	935
	940
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg	2880
Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met	
	945
	950
	955
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg	2928
Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala	
	965
	970
	975
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag	2976
Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu	
	980
	985
	990
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac	3024
Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn	
	995
	1000
	1005
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa	3069
Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln	
	1010
	1015
	1020
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga	3114
Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg	
	1025
	1030
	1035
gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt	3159
Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val	
	1040
	1045
	1050
caa gaa atg ctt tcg ccg gac tta tca ttc gtt ctg cac aca gtg	3204
Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val	
	1055
	1060
	1065
agt cca gct gat ccg gac agt aac ctt gtg gaa gcc gag atc gct	3249
Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala	
	1070
	1075
	1080

ES 2 635 250 T3

cct ggt tta ggt gag act tta gct tca gga aca aga gga aca cca 3294
 Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro
 1085 1090 1095

tgg aga ctc gct tcg ggt aag ctc gac ggg att gta caa acc tta 3339
 Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu
 1100 1105 1110

gct ttc gca aac ttc agc gaa gag ctt ctt gtg tca gga aca ggt 3384
 Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly
 1115 1120 1125

cct gct gat gga aaa tac gtt cgg ttg acc gtg gac tat agc aaa 3429
 Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys
 1130 1135 1140

aaa cgt tta act gtt gac tcg gtg ttt aga cag cag ctc ggt cag 3474
 Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln
 1145 1150 1155

aga ctc ggt tcg gtt ggt ttc ttc ttg gaa aga aac ttt ggc tgt 3519
 Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys
 1160 1165 1170

gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att 3564
 Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
 1175 1180 1185

ggt cag tca agg cca caa cct ctg tag 3591
 Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
 1190 1195

<210> 2
 <211> 1196
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*
 <400> 2

5

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile
 1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His
 20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser
 35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg
 50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu
 65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala
 85 90 95

10

ES 2 635 250 T3

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu
 100 105 110
 Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu
 115 120 125
 Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser
 130 135 140
 Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val
 145 150 155 160
 Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu
 165 170 175
 Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn
 180 185 190
 His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln
 195 200 205
 Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser
 210 215 220
 Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp
 225 230 235 240
 Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp
 245 250 255
 Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val
 260 265 270
 Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr
 275 280 285
 Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe
 290 295 300
 Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr
 325 330 335
 Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser
 340 345 350
 Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp
 355 360 365

ES 2 635 250 T3

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys
 370 375 380
 His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu
 385 390 400
 Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu
 420 425 430
 Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met
 435 440 445
 Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe
 450 455 460
 Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu
 465 470 475 480
 Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile
 485 490 495
 Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala
 500 505 510
 Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp
 515 520 525
 Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met
 530 535 540
 Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala
 545 550 555 560
 Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val
 565 570 575
 Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu
 580 585 590
 Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu
 595 600 605
 Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg
 610 615 620
 Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe
 625 630 635 640

ES 2 635 250 T3

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn
 645 650 655
 Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe
 660 665 670
 Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser
 675 680 685
 Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly
 690 695 700
 Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr
 705 710 715
 Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu
 725 730 735
 Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln
 740 745 750
 Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys
 755 760 765
 Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg
 770 775 780
 Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val
 785 790 795 800
 Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser
 805 810 815
 Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp
 820 825 830
 Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser
 835 840 845
 Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly
 850 855 860
 Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser
 865 870 875 880
 Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val
 885 890 895
 His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val
 900 905 910

ES 2 635 250 T3

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser
 915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro
 930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met
 945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala
 965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu
 980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro
 995 1000 1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln
 1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg
 1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val
 1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val
 1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala
 1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro
 1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu
 1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly
 1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys
 1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln
 1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys
 1160 1165 1170

ES 2 635 250 T3

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
 1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
 1190 1195

5 <210> 3
 <211> 3644
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(3633)
 <223>

<400> 3

	cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata	51
	Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile	
	1 5 10	
	ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt	99
	Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Gly Val Gly	
	15 20 25	
	gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc	147
	Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg	
	30 35 40 45	
	ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca	195
	Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr	
	50 55 60	
	aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc	243
	Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu	
	65 70 75	
	cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att	291
	Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile	
	80 85 90	
	atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg	339
	Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu	
	95 100 105	
	gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa	387
	Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu	
	110 115 120 125	
	aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat	435
	Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp	
	130 135 140	
15	aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctg ccg aag gat	483

ES 2 635 250 T3

Lys	Ile	Trp	Glu 145	Asp	Gly	Asn	Asn	Arg 150	Val	Val	Glu	Leu	Pro 155	Lys	Asp		
ggt	aag	ttt	gat	ata	gta	tgc	cac	tgg	aat	aga	aca	gaa	gag	cca	tta	531	
Gly	Lys	Phe 160	Asp	Ile	Val	Cys	His 165	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu 170	Glu	Pro	Leu		
gaa	ctt	tta	gga	aca	cca	aag	ttt	gag	ttg	gtc	gga	gaa	gct	gaa	aag	579	
Glu	Leu 175	Leu	Gly	Thr	Pro	Lys 180	Phe	Glu	Leu	Val	Gly 185	Glu	Ala	Glu	Lys		
aat	act	ggc	gag	gat	gct	tca	gca	tct	gta	act	ttt	gca	cct	gaa	aaa	627	
Asn	Thr	Gly	Glu	Asp	Ala 195	Ser	Ala	Ser	Val	Thr 200	Phe	Ala	Pro	Glu	Lys 205		
gtt	caa	gat	att	tca	gtt	ggt	gag	aat	ggt	gat	cca	gca	cca	gag	gcc	675	
Val	Gln	Asp	Ile	Ser 210	Val	Val	Glu	Asn	Gly 215	Asp	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala 220		
gag	tca	agc	aaa	ttt	ggt	ggg	caa	tgg	caa	gga	agt	aaa	act	gtt	ttc	723	
Glu	Ser	Ser	Lys 225	Phe	Gly	Gly	Gln	Trp 230	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr 235	Val	Phe		
atg	aga	tca	aat	gag	cat	ctg	aat	aag	gag	gct	gat	agg	atg	tgg	gat	771	
Met	Arg	Ser 240	Asn	Glu	His	Leu	Asn 245	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg 250	Met	Trp	Asp		
aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819	
Thr	Thr 255	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile 260	Ala	Leu	Lys	Leu	Val 265	Glu	Gly	Asp	Lys		
gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867	
Ala	Ser	Arg	Asn	Trp 275	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val 280	Val	Arg	Gly	Ile	Leu 285		
tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915	
Ser	Glu	Ser	Phe	Asp 290	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu 295	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr 300	Ser		
gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggt	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963	
Ala	Ile	Tyr	Leu 305	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr 310	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys 315	Phe	Glu		
gat	ggt	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011	
Asp	Gly	Gly 320	His	His	Arg	Pro	Asn 325	Lys	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	Gln		
ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059	
Ile	Phe 335	Arg	Glu	Leu	Glu	Met 340	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys 345	Thr	Thr	Ser	Ala		
aag	gat	gtt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107	
Lys	Asp	Val	Leu	Val 355	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro 360	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe 365		
aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155	
Lys	Ser	Glu	Phe 370	Thr	Ala	Ser	Val	Pro	Leu 375	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp 380	Ile		
gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203	
Ala	His	Arg	Asn 385	Asp	Ile	Pro	His	Asp 390	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile 395	Lys	His		
act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251	
Thr	Ile	Gln 400	Asn	Lys	Leu	His	Arg 405	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu 410	Asp	Leu	Ile		
gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	tac	1299	

ES 2 635 250 T3

Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr		
	415					420					425						
agt	gaa	aca	ttt	ggt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347	
Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	445	
430					435					440							
gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395	
Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	460	
				450					455					460			
gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	ggt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443	
Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu		
			465					470					475				
acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491	
Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys		
		480					485					490					
aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539	
Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser		
	495					500					505						
cta	aga	tcg	ggt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587	
Leu	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	525	
510				515						520							
gcg	cct	gat	aat	gct	ata	gca	atg	cga	caa	aag	tgg	cgc	ctt	tgt	gaa	1635	
Ala	Pro	Asp	Asn	Ala	Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu		
				530					535					540			
att	agt	ctt	gag	gat	tat	tca	ttt	ggt	ctg	tta	agc	aga	ttc	atc	aat	1683	
Ile	Ser	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Ile	Asn		
			545					550					555				
act	ctt	gaa	gcc	tta	ggt	gga	tca	gct	tca	ctt	gca	aag	gat	gta	gct	1731	
Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Ala		
		560				565						570					
aga	aat	act	act	cta	tgg	gat	act	act	ctt	gat	gcc	ctt	gtc	att	ggc	1779	
Arg	Asn	Thr	Thr	Leu	Trp	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Ile	Gly		
	575					580					585						
atc	aat	caa	ggt	agc	ttt	tca	ggt	tgg	aaa	aca	gat	gaa	tgt	att	gcc	1827	
Ile	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Trp	Lys	Thr	Asp	Glu	Cys	Ile	Ala	605	
590					595					600							
ata	ggg	aat	gag	att	ctt	tcc	tgg	aag	caa	aaa	ggt	cta	tct	gaa	agt	1875	
Ile	Gly	Asn	Glu	Ile	Leu	Ser	Trp	Lys	Gln	Lys	Gly	Leu	Ser	Glu	Ser	620	
				610					615					620			
gaa	ggt	tgt	gaa	gat	ggg	aaa	tat	att	tgg	tca	cta	aga	ctt	aaa	gct	1923	
Glu	Gly	Cys	Glu	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ile	Trp	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ala		
			625					630					635				
aca	ctg	gac	aga	gca	cgg	aga	tta	acg	gaa	gag	tac	tct	gaa	gca	ctt	1971	
Thr	Leu	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu		
		640					645						650				
ctt	tct	ata	ttc	cct	gaa	aaa	gta	atg	ggt	att	ggg	aaa	gcc	ctt	gga	2019	
Leu	Ser	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Val	Met	Val	Ile	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly		
	655					660					665						
ata	cca	gat	aac	agt	gtg	aga	act	tac	aca	gag	gca	gaa	att	cgt	gct	2067	
Ile	Pro	Asp	Asn	Ser	Val	Arg	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	685	
670					675					680							
ggc	att	ggt	ttt	cag	gta	tct	aaa	cta	tgc	aca	gta	ctt	cag	aaa	gca	2115	

ES 2 635 250 T3

Gly	Ile	Val	Phe	Gln	Val	Ser	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Lys	Ala	
				690					695					700		
att	cga	gaa	gta	ctt	gga	tca	act	ggc	tgg	gat	gtt	ctt	gtt	cct	gga	2163
Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Thr	Gly	Trp	Asp	Val	Leu	Val	Pro	Gly	
			705					710					715			
gtg	gcc	cat	gga	act	ctg	atg	cgg	gtg	gaa	aga	att	ctt	cct	gga	tca	2211
Val	Ala	His	Gly	Thr	Leu	Met	Arg	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	
		720					725					730				
tta	cct	tca	tct	gtc	aaa	gaa	cct	gtg	gtt	cta	att	gta	gat	aag	gct	2259
Leu	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Glu	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Val	Asp	Lys	Ala	
	735					740					745					
gat	gga	gat	gaa	gag	gtc	aaa	gct	gct	ggg	gat	aat	ata	gtt	ggt	gtt	2307
Asp	Gly	Asp	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Asn	Ile	Val	Gly	Val	
	750			755					760					765		
att	ctt	ctt	cag	gaa	cta	cct	cac	ctt	tca	cat	ctt	ggt	gtt	aga	gct	2355
Ile	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	
			770						775					780		
cgt	caa	gag	aat	gtt	gta	ttt	gta	act	tgt	gaa	tat	gat	gac	aca	gtt	2403
Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	
			785				790						795			
aca	gat	gtg	tat	ttg	ctt	gag	gga	aaa	tat	atc	aga	tta	gaa	gca	tca	2451
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	
		800					805					810				
tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	gtt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	2499
Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala	
	815					820					825					
gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	2547
Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	
	830				835					840					845	
caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	2595
Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met	
			850						855					860		
tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggt	agt	ttt	gct	gct	ctt	2643
Ser	Lys	Gln	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	
			865				870						875			
gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggt	gca	aaa	gct	gct	gca	2691
Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	
		880				885						890				
tgc	aga	act	ctt	tct	gtt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	2739
Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	
	895				900						905					
gat	caa	gga	gtt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggt	gct	gtg	ata	2787
Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	
				915						920				925		
cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcg	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	2835
Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	
				930					935					940		
tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	2883
Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	
			945					950					955			
ggt	gaa	gtt	gat	agc	ctg	gcg	ttg	gag	cta	caa	gca	ata	att	tca	cat	2931

ES 2 635 250 T3

Gly	Glu	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	His	
		960					965					970				
ctt	tcc	cca	ccg	gag	gag	act	att	ata	ttt	ctc	aaa	aga	atc	ttc	cca	2979
Leu	Ser	Pro	Pro	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Phe	Pro	
	975					980				985						
cag	gat	gtc	cgg	ttg	att	ggt	aga	tct	agt	gct	aat	gtg	gag	gat	ttg	3027
Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Asp	Leu	
990					995					1000					1005	
gct	ggt	atg	tca	gct	gct	ggt	ctc	tat	gat	tca	att	ccc	aat	gtc		3072
Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ile	Pro	Asn	Val		
				1010					1015					1020		
agt	ctc	atg	gac	cca	tgt	gcc	ttt	gga	gct	gcg	ggt	ggg	aag	ggt		3117
Ser	Leu	Met	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Val		
				1025					1030					1035		
tgg	gct	tct	tta	tac	aca	agg	aga	gcc	atc	cta	agc	cgt	cga	gcc		3162
Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala		
				1040					1045					1050		
gct	ggt	ggt	tat	cag	aga	gac	gcg	aca	atg	gct	ggt	ctt	gtc	caa		3207
Ala	Gly	Val	Tyr	Gln	Arg	Asp	Ala	Thr	Met	Ala	Val	Leu	Val	Gln		
				1055					1060					1065		
gaa	ata	ctg	cag	cca	gat	ctc	tcc	ttc	gtg	ctt	cat	act	ggt	tgc		3252
Glu	Ile	Leu	Gln	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val	Cys		
				1070					1075					1080		
ccc	gct	gac	cat	gac	ccc	aag	ggt	gtc	cag	gct	gag	gtc	gcc	cct		3297
Pro	Ala	Asp	His	Asp	Pro	Lys	Val	Val	Gln	Ala	Glu	Val	Ala	Pro		
				1085					1090					1095		
ggg	ctg	ggt	gaa	acg	ctt	gct	tca	gga	acc	cgt	ggc	acc	ccg	tgg		3342
Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro	Trp		
				1100					1105					1110		
agg	ctg	tca	tgt	aac	aaa	ttc	gat	gga	aaa	ggt	gcc	act	ctt	gcc		3387
Arg	Leu	Ser	Cys	Asn	Lys	Phe	Asp	Gly	Lys	Val	Ala	Thr	Leu	Ala		
				1115					1120					1125		
ttt	tca	aat	ttc	agt	gag	gag	atg	gtg	gtg	cac	aac	tct	ggt	cct		3432
Phe	Ser	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Met	Val	Val	His	Asn	Ser	Gly	Pro		
				1130					1135					1140		
gcc	aat	gga	gaa	gta	att	cgt	ctt	act	gtt	gat	tac	agc	aag	aag		3477
Ala	Asn	Gly	Glu	Val	Ile	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys		
				1145					1150					1155		
cca	ttg	tcg	ggt	gat	aca	acc	ttt	agg	aag	cag	ttt	ggt	cag	cga		3522
Pro	Leu	Ser	Val	Asp	Thr	Thr	Phe	Arg	Lys	Gln	Phe	Gly	Gln	Arg		
				1160					1165					1170		
ctg	gct	gcg	att	ggc	cag	tat	ctg	gag	cag	aag	ttc	ggg	agt	gca		3567
Leu	Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Tyr	Leu	Glu	Gln	Lys	Phe	Gly	Ser	Ala		
				1175					1180					1185		
cag	gat	gtg	gaa	ggt	tgc	ctg	ggt	ggg	aaa	gat	att	ttt	ata	gtg		3612
Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Gly	Lys	Asp	Ile	Phe	Ile	Val		
				1190					1195					1200		
caa	agc	agg	cca	cag	cca	tag	aagccgaatt	c								3644
Gln	Ser	Arg	Pro	Gln	Pro											
				1205												

<210> 4
 <211> 1206
 <212> PRT
 <213> *Oryza sativa*

5

<400> 4

ES 2 635 250 T3

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

ES 2 635 250 T3

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser
 225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly
 245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg
 260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser
 275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr
 290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly
 305 310 315 320

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg
 325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val
 340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu
 355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg
 370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln
 385 390 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu
 405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr
 420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe
 435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu
 450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg
 465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr
 485 490 495

ES 2 635 250 T3

Ile Gln Ile Leu₅₀₀ Met Thr Thr Leu Gln₅₀₅ Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 Val Leu Met₅₁₅ Lys Gly Leu Glu Ser₅₂₀ Gly Leu Arg Asn Asp₅₂₅ Ala Pro Asp
 Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln₅₃₅ Lys Trp Arg Leu Cys₅₄₀ Glu Ile Ser Leu
 Glu₅₄₅ Asp Tyr Ser Phe Val₅₅₀ Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu₅₆₀
 Ala Leu Gly Gly Ser₅₆₅ Ala Ser Leu Ala Lys₅₇₀ Asp Val Ala Arg Asn Thr
 Thr Leu Trp Asp₅₈₀ Thr Thr Leu Asp Ala₅₈₅ Leu Val Ile Gly Ile₅₉₀ Asn Gln
 Val Ser Phe₅₉₅ Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala₆₀₅ Ile Gly Asn
 Glu Ile₆₁₀ Leu Ser Trp Lys Gln₆₁₅ Lys Gly Leu Ser Glu₆₂₀ Ser Glu Gly Cys
 Glu₆₂₅ Asp Gly Lys Tyr Ile₆₃₀ Trp Ser Leu Arg Leu₆₃₅ Lys Ala Thr Leu Asp₆₄₀
 Arg Ala Arg Arg Leu₆₄₅ Thr Glu Glu Tyr Ser₆₅₀ Glu Ala Leu Leu Ser Ile₆₅₅
 Phe Pro Glu Lys₆₆₀ Val Met Val Ile Gly₆₆₅ Lys Ala Leu Gly Ile₆₇₀ Pro Asp
 Asn Ser Val₆₇₅ Arg Thr Tyr Thr Glu₆₈₀ Ala Glu Ile Arg Ala₆₈₅ Gly Ile Val
 Phe Gln₆₉₀ Val Ser Lys Leu Cys₆₉₅ Thr Val Leu Gln Lys₇₀₀ Ala Ile Arg Glu
 Val₇₀₅ Leu Gly Ser Thr Gly₇₁₀ Trp Asp Val Leu Val₇₁₅ Pro Gly Val Ala His₇₂₀
 Gly Thr Leu Met Arg₇₂₅ Val Glu Arg Ile Leu₇₃₀ Pro Gly Ser Leu Pro₇₃₅ Ser
 Ser Val Lys Glu₇₄₀ Pro Val Val Leu Ile₇₄₅ Val Asp Lys Ala Asp₇₅₀ Gly Asp
 Glu Glu Val₇₅₅ Lys Ala Ala Gly Asp₇₆₀ Asn Ile Val Gly Val₇₆₅ Ile Leu Leu

ES 2 635 250 T3

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu
 770 775 780
 Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val
 785 790 795 800
 Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn
 805 810 815
 Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr
 820 825 830
 Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu
 835 840 845
 Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln
 850 855 860
 Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser
 865 870 875 880
 Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr
 885 890 895
 Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly
 900 905 910
 Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly
 915 920 925
 Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr
 930 935 940
 Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val
 945 950 955 960
 Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro
 965 970 975
 Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val
 980 985 990
 Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met
 995 1000 1005
 Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met
 1010 1015 1020
 Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser
 1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val
 1040 1045 1050
 Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu
 1055 1060 1065
 Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp
 1070 1075 1080
 His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly
 1085 1090 1095
 Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser
 1100 1105 1110
 Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn
 1115 1120 1125
 Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly
 1130 1135 1140
 Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser
 1145 1150 1155
 Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala
 1160 1165 1170
 Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
 1175 1180 1185
 Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg
 1190 1195 1200
 Pro Gln Pro
 1205

5 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*
 <400> 5

10 Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Célula vegetal modificada genéticamente, **caracterizada porque** presenta actividad aumentada en una proteína P-glucan-agua-diquinasa, en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente, en la que la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta y en la que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en:
- a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
 - b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, que incluye la secuencia de aminoácidos, que está codificada mediante la inserción en el plásmido DSM16264 o la inserción en el plásmido DSM16302;
 - c) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
 - d) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos, que está codificada por la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16264 o mediante la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16302;
 - e) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;
 - f) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido DSM16264 o en el plásmido DSM16302;
 - g) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en a), b), e) o f);
 - h) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en a), b), d), e) o f) bajo condiciones rigurosas;
 - i) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en a), b), e) o f) debido a la degeneración del código genético; y
 - j) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en a), b), c), d), e), f), g), h) o i).
2. Célula vegetal de acuerdo con la Reivindicación 1, que sintetiza un almidón modificado en comparación con las correspondientes células vegetales de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.
3. Célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que el almidón modificado **se caracteriza porque** tiene un contenido aumentado en fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato modificada.
4. Célula vegetal modificada genéticamente de acuerdo con la Reivindicación 3, en la que el almidón modificado **se caracteriza porque** tiene una proporción modificada de fosfato C-3 respecto a fosfato C-6.
5. Planta que contiene células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 4.
6. Planta de acuerdo con la Reivindicación 5, que es una planta que almacena almidón.
7. Planta de acuerdo con la Reivindicación 6, que es una planta de maíz o una planta de trigo.
8. Material de propagación de plantas de acuerdo con una de las Reivindicaciones 5, 6, 7, que contiene células vegetales de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 4.
9. Partes de plantas cosechables de plantas de acuerdo con una de las Reivindicaciones 5, 6 o 7, que contienen células vegetales de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 4.
10. Procedimiento de producción de una planta modificada genéticamente, en el que
- a) una molécula de ácido nucleico extraña se introduce en el genoma de una célula vegetal, en el que la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína P-glucan-agua-diquinasa, que significa una proteína que requiere almidón ya fosforilado como sustrato, en el que la molécula de ácido nucleico extraña se elige del grupo que consiste en:
 - i) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
 - ii) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, que incluye la secuencia de aminoácidos, que se codifica mediante la inserción en el plásmido DSM16264 o la inserción en el plásmido DSM16302;
 - iii) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO 2 o en la SEQ ID NO 4;
 - iv) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína, cuya secuencia tiene una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos, que está codificada por la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16264 o mediante la región codificante de la inserción en el plásmido DSM16302;

- v) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o una secuencia complementaria;
- vi) Moléculas de ácido nucleico, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la inserción contenida en el plásmido DSM16264 o en el plásmido DSM16302;
- 5 vii) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en i), ii), v) o vi);
- viii) Moléculas de ácido nucleico, que hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en i), ii), iv), v) o vi) bajo condiciones rigurosas;
- 10 ix) Moléculas de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos se desvía de la secuencia de moléculas de ácido nucleico identificada en i), ii), v) o vi) debido a la degeneración del código genético; y
- x) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico identificadas en i), ii), iii), iv), v), vi), vii), viii) o ix).
- b) una planta se regenera a partir de células vegetales de la etapa a).
11. Procedimiento de producción de un almidón modificado que incluye la etapa de extraer el almidón de una célula vegetal de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 4.
- 15 12. Procedimiento de producción de un almidón modificado que incluye la etapa de extraer el almidón de una planta de acuerdo con una de las Reivindicaciones 5, 6 o 7.
13. Procedimiento de producción de un almidón modificado que incluye la etapa de extraer el almidón de partes de plantas cosechables de acuerdo con la Reivindicación 9.
- 20 14. Uso de plantas modificadas genéticamente de acuerdo con una de las Reivindicaciones 5, 6 o 7 para la producción de un almidón modificado.
15. Procedimiento de producción de harinas que incluye la etapa de moler partes de plantas de acuerdo con las Reivindicaciones 5, 6 o 7 o de material de propagación de acuerdo con la Reivindicación 8 o de material cosechable de acuerdo con la Reivindicación 9.
- 25 16. Uso de células vegetales modificadas genéticamente de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 4 o de plantas de acuerdo con una de las Reivindicaciones 5, 6 o 7 para la producción de harinas.
17. Molécula de ácido nucleico que codifica una proteína con la actividad enzimática de una proteína P-glucan-agua-diquinasa, seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 a) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2 o en la SEQ ID NO 4;
- b) Moléculas de ácido nucleico, que codifican una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2 o en la SEQ ID NO 4;
- 35 c) Moléculas de ácido nucleico, que contienen la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 o en la SEQ ID NO 3 o que contienen una secuencia complementaria a estas secuencias;
- d) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una identidad de al menos el 60 % con las secuencias de ácido nucleico descritas en a) o c);
- 40 e) Moléculas de ácido nucleico, que, en condiciones rigurosas, hibridan con al menos una hebra de las moléculas de ácido nucleico descritas en a) o c);
- f) Moléculas de ácido nucleico, que tienen una secuencia de nucleótidos divergente de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en a) o c), debido a la degeneración del código genético; y
- g) Moléculas de ácido nucleico, que representan fragmentos, variantes alélicas y/o derivados de las moléculas de ácido nucleico especificadas en a), b), c), d), e) o f).
- 45 18. Molécula de ácido nucleico recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 17.
19. Vector que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 18.
20. Vector de acuerdo con la Reivindicación 19, en el que la molécula de ácido nucleico se enlaza con secuencias reguladoras, que inician la transcripción en células procariotas o eucariotas.
- 50 21. Célula hospedadora, que se modifica genéticamente con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 17, con una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la Reivindicación 18, o un vector de acuerdo con las Reivindicaciones 19 o 20.
22. Composición que contiene moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 17, una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con 18, o un vector de acuerdo con una de las Reivindicaciones 19 o 20.
23. Uso de una composición de acuerdo con la Reivindicación 22 para la identificación de células vegetales, que

tienen actividad aumentada de una proteína P-glucan-agua-diquinasa en comparación con las células vegetales de tipo silvestre que no se han modificado genéticamente.

5 24. Proteína, que presenta actividad fosforilante de almidón y requiere almidón fosforilado como un sustrato en la que la proteína presenta un dominio de fosfohistidina que tiene una identidad de al menos el 70 % con la secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID NO 5.

25. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 24, que necesita almidón fosforilado como un sustrato y transfiere el fosfato residual de ATP al almidón fosforilado.

10 26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende una etapa adicional c), en la que las plantas adicionales se producen con la ayuda de las plantas de acuerdo con la etapa b), en el que la etapa c) se lleva a cabo mediante propagación vegetativa.

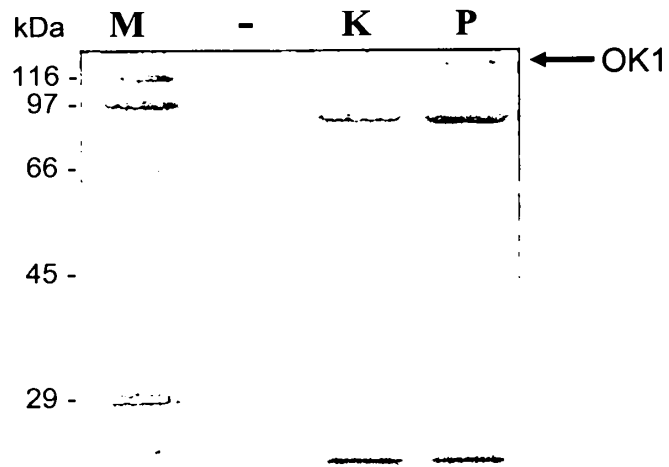


Fig. 1

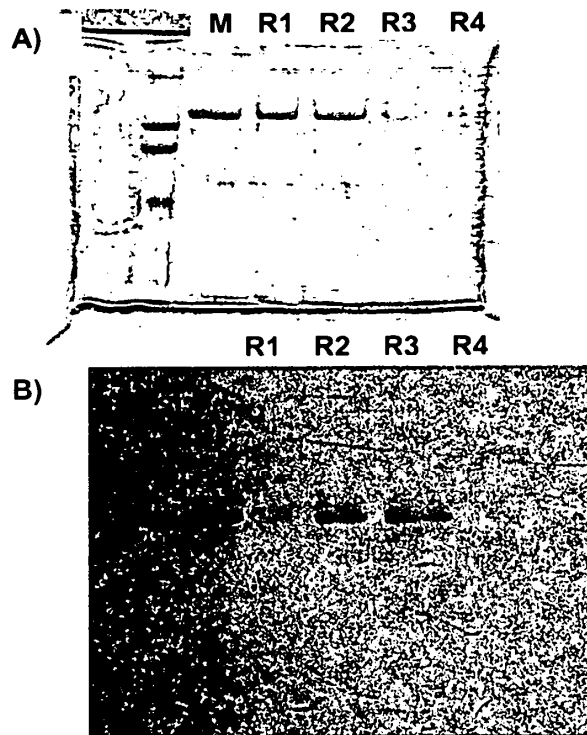


Fig. 2

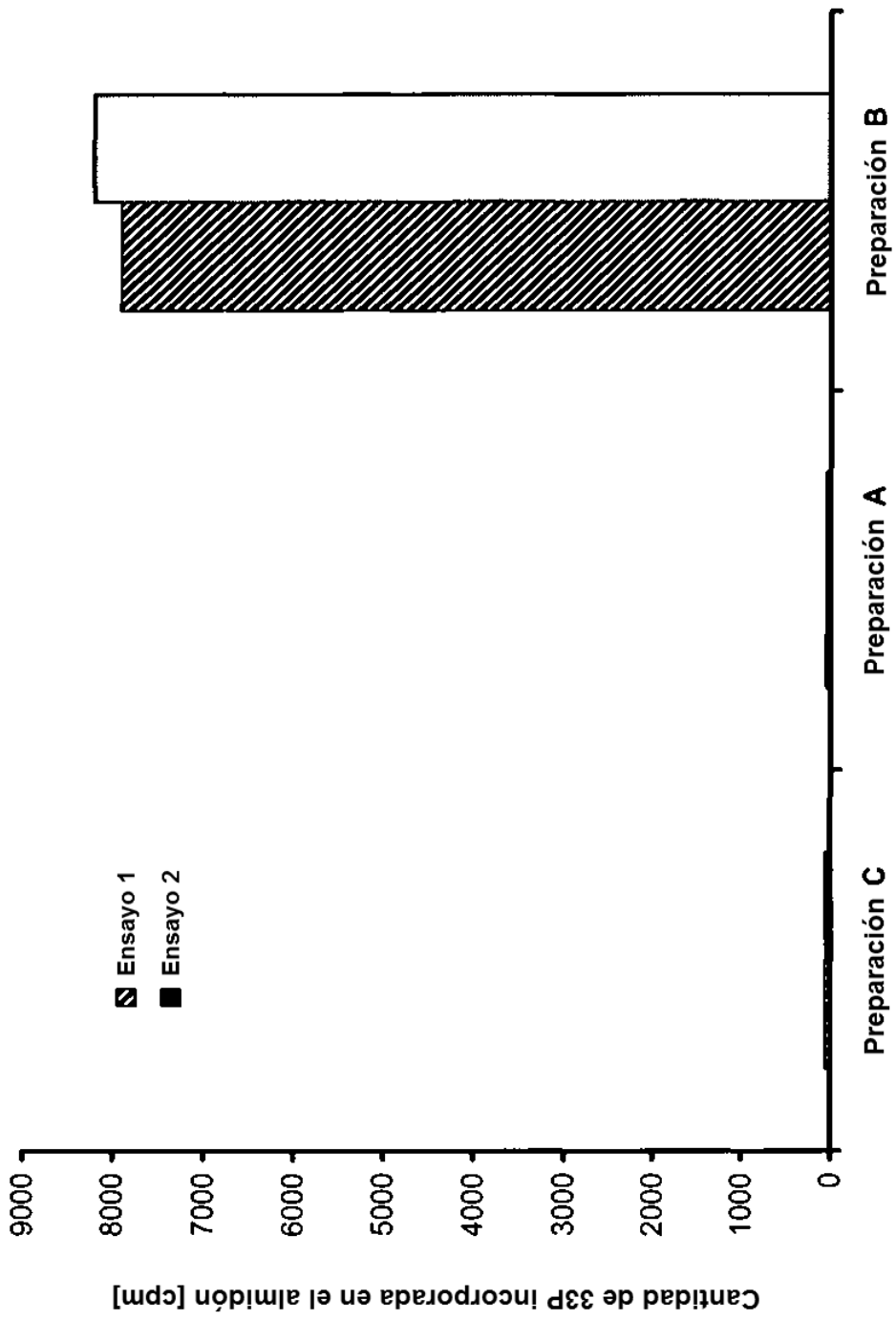


Fig.: 3

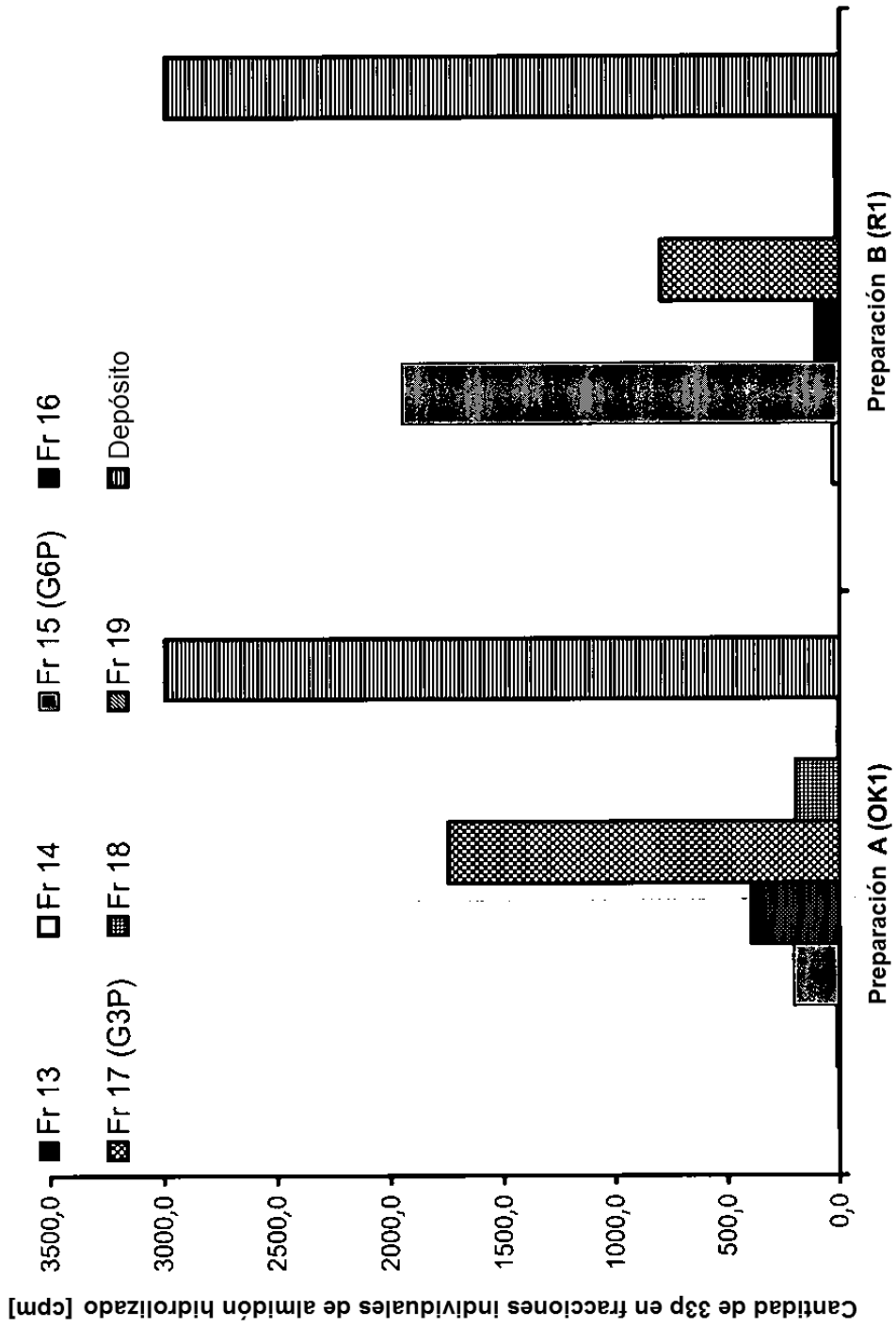


Fig. 4

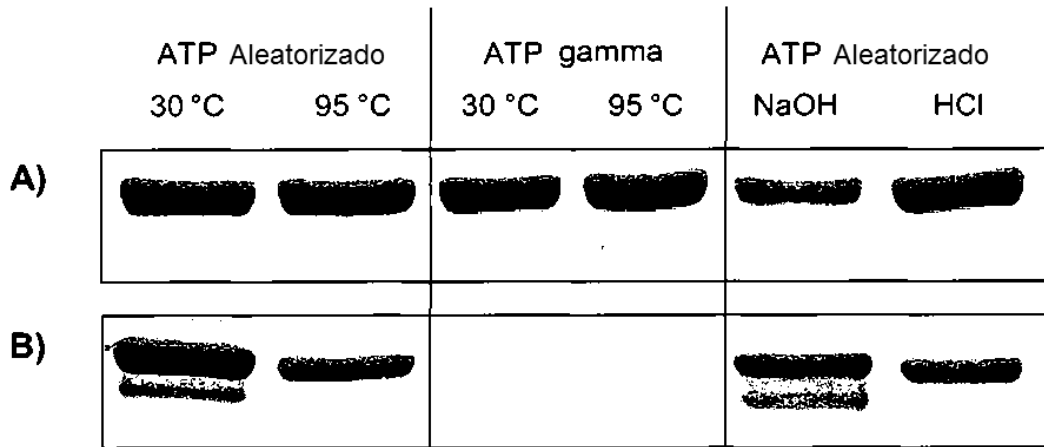


Fig. 5

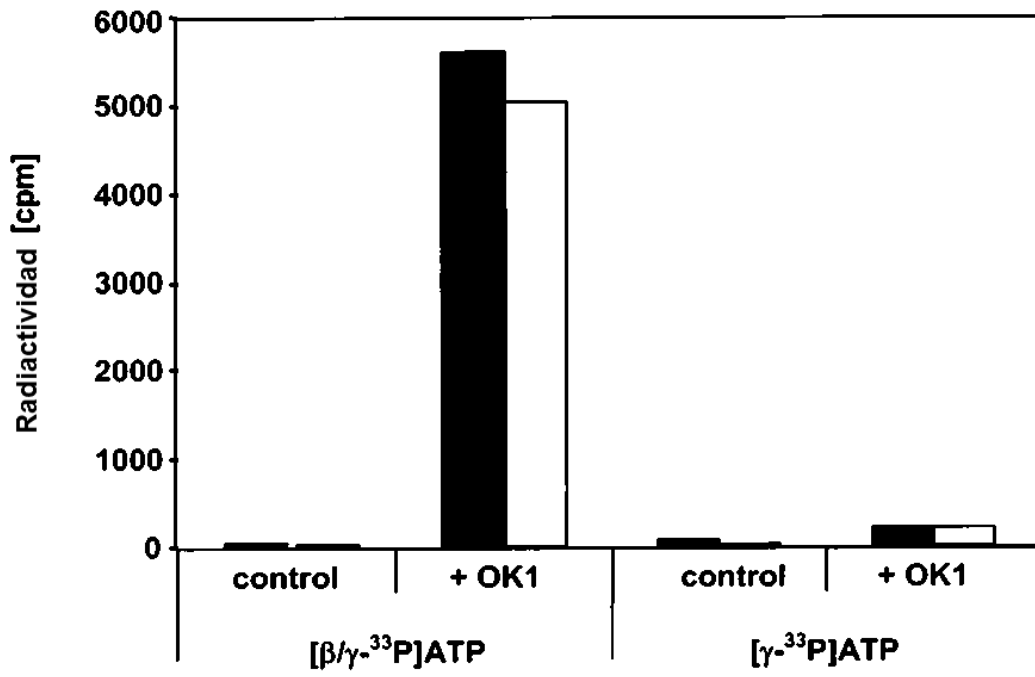


Fig. 6

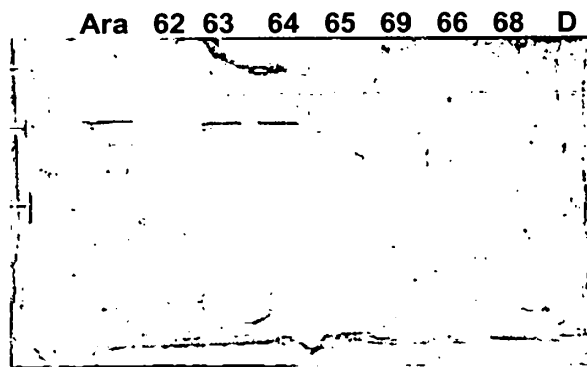
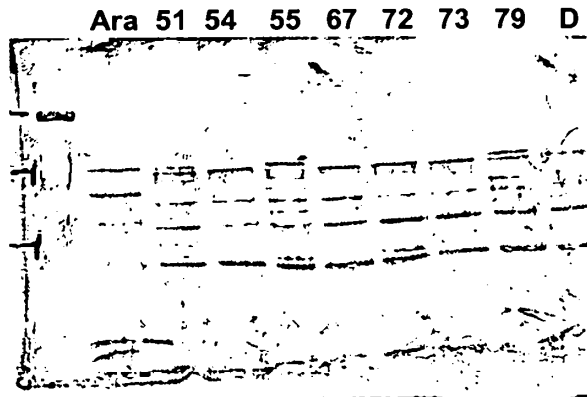


Fig. 7