



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 698**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/54** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99932877 .6**

96 Fecha de presentación : **12.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1100936**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2001**

54 Título: **Método para producción de plantas tolerantes al estrés.**

30 Prioridad: **17.07.1998 US 118276**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **Bayer BioScience N.V.**  
**Technologiepark 38**  
**9052 Gent, BE**

72 Inventor/es: **Babychuk, Elena;**  
**Kushnir, Sergei y**  
**De Block, Marc**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 317 698 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para producción de plantas tolerantes al estrés.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al uso de proteínas poli(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), particularmente proteínas PARP mutantes o partes de las mismas, y genes que codifican las mismas, para producir células de plantas y plantas, con muerte celular programada modificada. Se proporcionan células de plantas y plantas en las cuales la PCD de las células o de al menos parte de las células en un organismo está inhibida, por modulación del nivel o actividad de las proteínas PARP en dichas células. La invención se refiere también a células de plantas y plantas que expresan tales genes.

**Descripción de la técnica afín**

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

En los animales, la PCD está implicada en la eliminación o muerte de células indeseables tales como las células de la cola del renacuajo en la metamorfosis, las células entre los dedos en desarrollo en los vertebrados, neuronas de vertebrados producidas en exceso, células durante la especialización celular tales como queratocitos, etc. Las células deterioradas, que ya no son capaces de funcionar adecuadamente, pueden ser eliminadas también por PCD, impidiendo que las mismas se multipliquen y/o se propaguen. La PCD, o la falta de la misma, ha sido implicada también en cierto número de condiciones patológicas en humanos (AIDS, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lou Gehring, cánceres).

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

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

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

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

La proteína PARP de los animales es una proteína nuclear de 113-120 kDa, abundante en la mayoría de los tipos de células, que está constituida por tres dominios funcionales principales: un dominio de fijación de DNA amino-terminal que contiene dos dominios de dedos de Zn, un dominio catalítico carboxi-terminal, y un dominio interno que está automodificado (De Murcia y Ménissier, 1994; Kameshita *et al.*, 1984; Lindahl *et al.*, 1995). La actividad enzimática *in vitro* se incrementa notablemente después de fijación a rupturas de una sola cadena en el DNA. La actividad *in vivo* se induce por condiciones que dan eventualmente como resultado rupturas del DNA (Álvarez-González y Althaus, 1989; Ikejima *et al.*, 1990). La automodificación del dominio central sirve aparentemente como regulación negativa de la alimentación de PARP.

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

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

Chen *et al.* (1994) han consignado actividad de PARP en núcleos de maíz y han asociado esta actividad enzimática con la presencia de una proteína de aproximadamente 114 kDa presente en un extracto de núcleos de maíz. O'Farrell (1995) consignó que la amplificación por RT-PCR de RNA aislado de maíz (utilizando iniciadores degenerados basados en las secuencias más altamente conservadas) daba como resultado un fragmento de 300 pb que exhibía 60% de identidad al nivel de aminoácidos con la proteína PARP humana. Lepiniec *et al.* (1995) han aislado y clonado un cDNA de longitud total de *Arabidopsis thaliana* que codifica una proteína de 72 kDa que tiene alta semejanza con el dominio catalítico de la PARP de los vertebrados. El dominio N-terminal de la proteína no revela semejanza alguna de secuencia con el dominio correspondiente de la PARP de los vertebrados, pero se compone de 4 tramos de aminoácidos (designados A1, A2, B y C) que muestran semejanza con el término N de cierto número de proteínas nucleares y de fijación del DNA. La estructura secundaria predicha de A1 y A2 era una estructura hélice-bucle-hélice.

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

La o las funciones de PARP y la ribosilación poli-ADP en células eucariotas no está(n) totalmente claras. PARP está implicada o se cree que está implicada directa o indirectamente en cierto número de procesos celulares tales como reparación, replicación y recombinación del DNA, en la división celular y la diferenciación de las células o en los caminos de señalización que detectan alteraciones en la integridad del genoma. Dado que la actividad de PARP puede reducir significativamente la agrupación celular de  $\text{NAD}^+$ , se ha sugerido también que la enzima puede jugar un papel crítico en la muerte celular programada (Heller *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Adicionalmente, se ha sugerido que la nicotinamida resultante de la hidrólisis de  $\text{NAD}^+$  o los productos del cambio de poli-ADP-ribosa por poli-ADP-ribosa-glicohidrolasa pueden ser señales de respuesta al estrés en los eucariotas.

La información disponible actualmente sobre la función biológica de la PARP en las plantas se ha obtenido por experimentos que implican inhibidores de PARP que sugieren un papel *in vivo* en la prevención de la recombinación homóloga en sitios de deterioro del DNA como las tasas de recombinación intracromosómica homóloga en el tabaco y está aumentando después de la aplicación de 3-aminobenzamida (3ABA) (Puchta, *et al.*, 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que la aplicación de inhibidores de PARP, tales como 3ABA, nicotinamida, y 6(5H)-fenastridinona, a las células de *Zinnia* o de *Helianthus tuberosum* en diferenciación impide el desarrollo de elementos traqueales (Hawkins y Phillips, 1983; Phillips y Hawking, 1985; Shoji *et al.*, 1997; Sugiyama *et al.*, 1995), lo que se considera es un ejemplo de muerte celular programada en las plantas.

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

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

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

Ding *et al.* (1992), y Smulson *et al.* (1995) han descrito el empobrecimiento de PARP por expresión de RNA antisentido en células de mamífero y han observado un retardo en la reunión de las rupturas de cadena del DNA, así como la inhibición de la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1.

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

Amor *et al.* (1998), FEBS Letters 550:1-7) describe la implicación de la poli(ADP-ribosa)-polimerasa en la respuesta al estrés por oxidación en las plantas.

**Sumario y objetos de la invención**

La invención proporciona un método para producir una planta tolerante al estrés, preferiblemente una planta tolerante al estrés por frío, estrés por sequía o estrés por calor, que comprende los pasos de introducir un gen quimérico en células de dicha planta para obtener células de plantas transgénicas y regenerar una planta a partir de las células de plantas transgénicas, en donde el gen quimérico comprende las regiones del DNA siguientes enlazadas operativamente:

- (a) un promotor expresable en plantas;
- (b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa, que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos que tiene 75 a 100% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa o el complemento del mismo; y
- (c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación.

La región de DNA del gen quimérico que, cuando se transcribe, produce una molécula de DNA capaz de reducir la expresión de los genes endógenos codificantes de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa puede proporcionar una molécula de RNA que comprende

- i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de dicha planta; y
- ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de dicho gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de dicha planta;

en donde la secuencia de nucleótidos de sentido y la secuencia de nucleótidos antisentido son capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario.

La invención proporciona también plantas transgénicas, tales como maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, hortalizas de coles, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavellina, rosa, crisantemo o tulipán que exhiben tolerancia incrementada al estrés cuando se comparan con una planta de control, donde la planta transgénica comprende en sus células un gen quimérico que comprende las regiones de DNA siguientes, enlazadas operativamente:

- a) un promotor expresable en plantas;
- b) una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa en los cuales la molécula de RNA comprende
  - i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa; y
  - ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa, en donde la secuencia de nucleótidos de sentido y antisentido son capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario; y
- c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y poliadenilación.

La invención se refiere adicionalmente al uso de una secuencia de nucleótidos de un gen vegetal codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa o el complemento del mismo para producir una planta tolerante al estrés, por introducción de dicha secuencia de nucleótidos en células de dicha planta, caracterizado porque la secuencia de nucleótidos o su complemento comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos que tiene 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos de un gen PARP endógeno de dicha planta y es capaz de reducir la expresión de los genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Las secuencias de aminoácidos N-terminales deducidas de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de plantas.

Alineación de las secuencias aguas arriba del dominio de fijación de NAD<sup>+</sup> encontrado en *Arabidopsis thaliana* APP (A. Th. APP; número de acceso a EMBL Z48243; SEQ ID No 6) y el homólogo de maíz NAP (Z. m. NAP; número de acceso a EMBL AJ221588; SEQ ID No 4). La división de dominios que se muestra es como se ha propuesto previamente (Lepiniec *et al.*, 1995). La señal de localización nuclear (NLS) localizada en el dominio B se indica por el corchete. La secuencia del dominio B no está muy bien conservada entre las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. El dominio C es probablemente comparable en función al dominio de automodificación de la PARP de los animales. Las repeticiones imperfectas, A1 y A2 están presentes también en NAP de maíz. Para ilustrar la simetría doble e imperfecta internamente dentro de la secuencia de repetición, las propiedades de los residuos de aminoácidos se resaltan bajo las secuencias como sigue: círculos llenos, residuo hidrófobo; círculo vacío, glicina; (+), residuo cargado positivamente; (-), residuo cargado negativamente; o línea ondulada, cualquier residuo. El eje de simetría está indicado por la punta de flecha vertical y las líneas con punta de flecha marcan las regiones con la repetición invertida de las propiedades de las cadenas laterales de aminoácidos.

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

Figura 2. Comparación del dominio de fijación NAD<sup>+</sup> de las proteínas PARP de ratón y PARP de plantas. El intervalo de la "firma PARP" se indica sobre las secuencias. Los nombres y la alineación de las secuencias son como en la Figura 1.

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

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

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

(A) Vista esquemática de la casete de expresión en pV8SPA. La expresión del cDNA de *app* viene dada por un promotor de levadura quimérico, que está constituido por la región promotora mínima que contiene el recuadro TATA del gen *cycl*1 (*CYC1*) y una región promotora de activación aguas arriba del gen *gal10* (*GAL10*), proporcionando el último activación del promotor por galactosa. Las secuencias reguladoras aguas abajo se derivan del gen que codifica la fosfoglicerol-quinasa (3PGK) (Kuge y Jones, 1994). La región codificante de *app* se representa con una división en dominios supuestos como se ha propuesto anteriormente (Lepiniec *et al.*, 1995): A1 y A2 corresponden a repeticiones imperfectas de 27 amino-ácidos, entre los cuales existe una secuencia (dominio B) rica en aminoácidos cargados positivamente y que se asemeja a los dominios de fijación de DNA de cierto número de proteínas de fijación de DNA. La secuencia de fijación de aminoácidos del dominio B se muestra bajo el mapa, y el tramo de residuos arginina y lisina, que pueden funcionar como una NLS, se representa en negrita. Los residuos metionina (M<sup>1</sup>, M<sup>72</sup>), que pueden funcionar como codones de iniciación de la traducción, se indican sobre el mapa. El dominio C es rico en residuos de ácido glutámico, asemejándose en su composición, pero no en su secuencia, al dominio de automodificación de PARP de los animales.

(B) Análisis por inmunotransferencia (transferencia Western) y por transferencia Northern de las variedades DY (pYeDP1/8-2) y DY(pV8SPA), indicadas como (vector) y (*app*), respectivamente. Las cepas se dejaron crecer en medio SDC suplementado con glucosa (GLU), galactosa (GAL), galactosa y 3 mM de 3ABA (GAL+3ABA), o galactosa y nicotinamida 5 mM (GAL+NIC). El RNA total o la proteína total se extrajeron de los mismos cultivos. Se fraccionaron 10 microgramos de proteína total por electroforesis en SDS-PAGE al 10%, se sometieron a electrotransferencia, y se sondaron con antisueros anti-APP. Se resolvieron 5 microgramos de RNA total por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, se transfirieron a membranas de nailon, y se hibridaron con fragmentos de DNA marcados con <sup>32</sup>P derivados

del cDNA de app. Las posiciones de las bandas marcadoras de peso molecular se indican a la izquierda en kilobases (kb) y kilodaltons (kDa).

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

(A) Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de DY(pYeDP1/8-2) cultivado en SDC con 2% de galactosa (vector GAL) y DY(pV8SPA) cultivado en SDC con 2% de glucosa (app GLU), en SDC con 2% de galactosa (app GAL), o en SDC con 2% de galactosa y 3ABA 3 mM (app GAL+3ABA). Para detectar la síntesis de la poli(ADP-ribosa) en estos extractos, se incubaron muestras con  $^{32}\text{P}$ -NAD<sup>+</sup> durante 40 min a la temperatura ambiente. Se efectuaron dos reacciones de control: se incubaron 100 ng de la PARP humana purificada en un tampón de reacción solo (PARP) (pista 5), o con extracto de proteína producido a partir de cultivo DI(pYeDP1/8-2) desarrollado en glucosa (vector GLU+PARP) (pista 6). Se muestra la autorradiografía obtenida después de la exposición del gel seco a película Kodak X-Omat. ORi corresponde al comienzo del gel de secuenciación.

(B) Estimulación de la síntesis de poli(ADP-ribosa) por DNA en extractos de proteínas de DI(pV8SPA). Se indican las cantidades de DNA de espermatozoides de salmón tratado por ultrasonidos añadidas a los extractos de levadura empobrecidos en ácido nucleico en  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ . La síntesis de la poli(ADP-ribosa) está bloqueada por 3ABA, que se añadió en una de las reacciones a una concentración de 3 mM (pista 5). Para asegurar la recuperación máxima de la poli(ADP-ribosa), se incluyeron 20  $\mu\text{g}$  de glucógeno como vehículo durante los pasos de precipitación; esto, como puede verse, dio como resultado sin embargo un arrastre importante del marcador no incorporado.

Figura 6. Representación esquemática de los vectores T-DNA que comprenden los genes quiméricos moduladores de la PCD de la invención. P35S: promotor CaMV35S; L: conductor cab22; ZAP: región codificante de un gen PARP de la clase ZAP; 5'ZAP: parte N-terminal de la región codificante de un gen PARP de la clase ZAP en orientación invertida; 3' 35S: señal de terminación de la transcripción del extremo 3' de CaMV35S y señal de poliadenilación; pACT2: región promotora del gen actina; pNOS: promotor del gen nopalina-sintasa; gal: gentamicina-acetil-transferasa; bar: fosfotricina-acetil-transferasa; 3'NOS: señal de terminación de la transcripción del extremo 3' y señal de poliadenilación del gen de nopalina-sintasa; APP: región codificante de un gen PARP de la clase NAP; 5'APP: parte N-terminal de la región codificante de un gen PARP de la clase NAP en orientación invertida; LB: borde izquierdo del T-DNA; RB: borde derecho del T-DNA; pTA29: promotor específico de tapete; pNTP303: promotor específico de polen.

### Descripción detallada

Para el propósito de la invención, el término “promotor expresable en plantas” significa un promotor que es capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal. Esto incluye cualquier promotor de origen vegetal, pero también cualquier promotor de origen no vegetal que sea capaz de dirigir la transcripción en una célula vegetal, v.g., ciertos promotores de origen viral o bacteriano tales como los promotores CAMV35S o los promotores del gen T-DNA.

El término “expresión de un gen” hace referencia al proceso en el cual una región de DNA bajo control de regiones reguladoras, particularmente el promotor, se transcribe en un RNA que es biológicamente activo, es decir, que o bien es capaz de interacción con otro ácido nucleico o proteína o que es capaz de ser traducido en un polipéptido o proteína biológicamente activo. Se dice que un gen codifica un RNA cuando el producto final de la expresión del gen es RNA biológicamente activo, tal como v.g. un RNA antisentido o una ribozima. Se dice que un gen codifica una proteína cuando el producto final de la expresión del gen es una proteína o polipéptido biológicamente activo.

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

Como se utiliza en esta memoria, “que comprende” debe interpretarse como especificación de la presencia de las características, entidades completas, pasos o componentes a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, entidades completas, pasos o componentes, o grupos de los mismos. Así pues, v.g., un ácido nucleico o proteína que comprende una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, puede comprender más nucleótidos o aminoácidos que los citados realmente, es decir, puede estar incluido en un ácido nucleico o proteína mayor. Un gen quimérico que comprende una región de DNA que se define funcional o estructuralmente, puede comprender regiones de DNA adicionales, etc.

Los autores de la invención encontraron que células eucariotas, particularmente células vegetales, muy particularmente células de *Zea mays* contienen simultáneamente al menos dos isoformas (clases) funcionales de proteínas PARP principales que difieren en tamaño y secuencia de aminoácidos, pero que son capaces ambas de fijar DNA, particularmente DNA con roturas de una sola cadena, y tienen ambas actividad de ribosilación de poli-ADP. Los autores de la invención han comprobado también que la muerte celular programada en eucariotas, particularmente en plantas,

puede modularse por alteración del nivel de expresión de los genes PARP o por alteración de la actividad de las proteínas codificadas genéticamente, y que con objeto de alcanzar este objetivo, la expresión de ambos genes precisa estar alterada o, como alternativa, ambas clases de proteínas precisan estar alteradas en su actividad.

5        Está claro que el fallo de la técnica en demostrar que las células eucariotas, particularmente células vegetales, comprenden dos isoformas funcionales de proteínas PARP, codificadas por clases de genes diferentes, ha impedido la modulación eficiente de la actividad de PARP en dichas células por métodos de DNA recombinante. Diversas realizaciones de los métodos y medios se representan por la descripción, los Ejemplos y las reivindicaciones.

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

15       “PCD inhibida” con relación a células específicas debe entenderse como el proceso por el cual una fracción mayor de dichas células o grupos de células, que podrían sufrir normalmente muerte celular programada (sin intervención de los métodos de esta invención) en condiciones particulares, se mantienen vivas en estas condiciones.

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

25       Con objeto de inhibir o prevenir la muerte celular programada en una célula eucariota, particularmente en una célula vegetal, el nivel combinado de ambas proteínas PARP y/o su actividad o actividad aparente se reduce significativamente, evitando sin embargo que la reparación del DNA (dirigida directa o indirectamente por PARP) se inhiba de tal manera que las células en las cuales la función de las proteínas PARP se inhibe no puedan recuperarse del deterioro del DNA, o no puedan mantener su integridad genómica. Preferiblemente, el nivel y/o la actividad de las proteínas PARP en las células diana, deberían reducirse al menos 75%, con preferencia aproximadamente 80%, y en particular aproximadamente 90% del nivel y/o actividad normales en las células diana de tal modo que aproximadamente 25%, con preferencia aproximadamente 20%, en particular aproximadamente 10% del nivel y/o actividad normales de PARP se retenga en las células diana. Adicionalmente, se cree que la disminución en el nivel y/o actividad de las proteínas PARP no debería exceder del 95%, no debiendo exceder con preferencia del 90% de la actividad y/o nivel normales en las células diana. Los métodos para determinar el contenido de una proteína específica tal como las proteínas PARP son bien conocidos por las personas expertas en la técnica e incluyen, pero sin carácter limitante, cuantificación (histoquímica) de tales proteínas utilizando anticuerpos específicos. Los métodos para cuantificar la actividad de PARP están disponibles también en la técnica e incluyen el ensayo TUNEL citado anteriormente (*in vivo*) o el ensayo *in vitro* descrito por Collinge y Althaus (1994) para la síntesis de poli(ADP-ribosa) (véanse los Ejemplos).

30       Con objeto de desencadenar la muerte celular programada en una célula eucariota, particularmente en una célula vegetal, el nivel combinado de ambas proteínas PARP y/o su actividad o actividad aparente se reduce sustancialmente, reduciéndose preferiblemente casi por completo de tal modo que la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica no sean ya posibles. Preferiblemente, el nivel y/o actividad combinados de las proteínas PARP en las células diana, debería reducirse al menos aproximadamente en un 90%, con preferencia aproximadamente un 95%, de un modo más preferiblemente aproximadamente 99% del nivel y/o actividad normales en las células diana; en particular la actividad de PARP debería inhibirse completamente. Particularmente, se prefiere que los niveles funcionales de ambas clases de proteínas PARP por separado se reduzcan a los niveles mencionados.

35       Para el propósito de la invención, las proteínas PARP se definen como proteínas que tienen actividad de poli(ADP-ribosa)polimerasa, comprendiendo preferiblemente la denominada “firma PARP”. La firma PARP es una secuencia de aminoácidos que está altamente conservada entre las proteínas PARP, definidas por de Murcia y Menussier de Murcia (1994) por la extensión desde el aminoácido de la posición 858 al aminoácido de la posición 906 de la proteína PARP de *Mus musculus*. Este dominio corresponde a la secuencia de aminoácidos desde la posición 817 a 865 de la proteína PARP convencional de *Zea mays* (ZAP1; SEQ ID No 2) o a la secuencia de aminoácidos desde la posición 827 a 875 de la proteína PARP convencional de *Zea mays* (ZAP2; SEQ ID No: 11) o a la secuencia de aminoácidos desde la posición 500 a la 547 de la proteína PARP no convencional de *Zea mays* (SEQ ID No 4) o a la secuencia de aminoácidos desde la posición 485 a la 532 de la proteína PARP no convencional de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID No 6). Esta secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las diferentes proteínas PARP (teniendo aproximadamente 90% a 100% de identidad de secuencia). Está particularmente conservada la lisina en la posición 891 (que corresponde a la posición 850 de SEQ ID No 2, la posición 861 de SEQ ID No 11, la posición 532 de SEQ ID No 4 y la posición 517 de SEQ ID No 6) de la proteína PARP de *Mus musculus*, que se considera está implicada en la actividad catalítica de las proteínas PARP. Particularmente, los aminoácidos de las posiciones 865, 866, 893, 898 y 899 de la proteína PARP de *Mus musculus* o de las posiciones correspondientes para las otras secuencias son variables. Las proteínas PARP pueden comprender adicionalmente un dominio de fijación de DNA N-terminal y/o una señal de localización nuclear (NLS).

Actualmente, se han descrito dos clases de proteínas PARP. La primera clase, como se define en esta memoria, comprende las denominadas proteínas PARP clásicas que contienen dedos de Zn (ZAP). Estas proteínas tienen tamaños comprendidos entre 113 y 120 kDa y se caracterizan adicionalmente por la presencia de al menos uno, preferiblemente dos dominios de dedos de Zn localizados en el dominio N-terminal de la proteína, localizados en particular dentro de los aproximadamente 355 a aproximadamente 375 primeros aminoácidos de la proteína. Los dedos de Zn se definen como secuencias peptídicas que tienen la secuencia CxxC<sub>n</sub>HxxC (donde n puede variar desde 16 a 30) capaz de complejar un átomo de Zn. Ejemplos de secuencias de aminoácidos para proteínas PARP de la clase ZAP incluyen las secuencias que pueden encontrarse en la base de datos de proteínas PIR con número de acceso P18493 (*Bos taurus*), P26466 (*Gallus gallus*), P35875 (*Drosophila melanogaster*), P09874 (*Homo sapiens*), P11103 (*Mus musculus*), Q08824 (*Oncorhynchus masou*), P27008 (*Rattus norvegicus*), Q11208 (*Sarcophaga peregrina*), P31669 (*Xenopus laevis*), y las secuencias actualmente identificadas de la proteína ZAP1 y ZAP2 de *Zea mays* (SEQ ID No 2/SEQ ID No 11).

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

La segunda clase que se define en esta memoria, comprende las denominadas proteínas PARP no clásicas (NAP). Estas proteínas son más pequeñas (72-73 kDa) y se caracterizan adicionalmente por la ausencia de un dominio de dedo de cinc en el término N de la proteína, y por la presencia de un dominio N-terminal que comprende tramos de aminoácidos que tienen semejanza con proteínas de fijación de DNA. Preferiblemente, las proteínas PARP de esta clase comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 30 a 32 aminoácidos que comprenden la secuencia RGxxxxGxKxxxxRL (los aminoácidos se representan por el código estándar de una sola letra, donde x representa cualquier aminoácido; SEQ ID No 7). Aún más preferiblemente, estas proteínas PARP comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 32 aminoácidos que tienen la secuencia xLxVxxxRxxLxxRGLxxxGVKxxLVxxRLxxAI (SEQ ID No 8) (el denominado dominio A1) o al menos una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 32 aminoácidos que tiene la secuencia GMxxxELxxxAxxRGxxxxGxKKDxxRLxx (SEQ ID No 9) (el denominado dominio A2), o ambas. Particularmente, los dominios A1 y A2 son capaces de formar una estructura hélice-bucle-hélice. Estas proteínas PARP pueden comprender adicionalmente un dominio básico "B" (secuencia de aminoácidos rica en K/R, de aproximadamente 35 a aproximadamente 56 aminoácidos, implicada en el direccionamiento de la proteína al núcleo) y/o un dominio ácido "C" (secuencia de aminoácidos rica en D/E de aproximadamente 36 aminoácidos). Ejemplos de secuencias de proteínas de la clase NAP incluyen la proteína APP de *Arabidopsis thaliana* (accesible de la base de datos de proteínas PIR bajo el número de acceso Q11207; SEQ ID No 6) y la proteína NAP de *Zea mays* (SEQ ID No 4). La secuencia de los cDNAs correspondientes puede encontrarse en la base de datos EMBL bajo el número de acceso Z48243 (SEQ ID No 5) y en SEQ ID No 3. El hecho de que la segunda clase de proteínas PARP son realmente proteínas PARP funcionales, es decir, son capaces de catalizar la polimerización de poli (ADP-ribosa) dependiente de DNA ha sido demostrado por los autores de la invención (véase el Ejemplo 2).

Los autores de la invención han demostrado adicionalmente que las células eucariotas, particularmente células vegetales, expresan simultáneamente genes que codifican proteínas PARP de ambas clases.

Está claro que otros genes o cDNAs que codifican proteínas PARP de ambas clases como se han definido, o partes de las mismas, pueden aislarse a partir de otras especies o variedades eucariotas, particularmente de otras especies o variedades de plantas. Estos genes de PARP o cDNAs, pueden aislarse v.g. por hibridación Southern (sea hibridación de baja severidad o de alta severidad, dependiendo de la relación entre las especies a partir de las cuales se intenta aislar el gen PARP y la especie de la cual se derivó últimamente la sonda) utilizando como sondas fragmentos de DNA con la secuencia de nucleótidos de los genes PARP o cDNAs arriba mencionados, o partes de los mismos, con preferencia partes que están conservadas tales como un fragmento de gen que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la firma PARP arriba mencionada. Las secuencias de nucleótidos que corresponden a la firma PARP de las proteínas PARP codificadas por genes de plantas son la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 1 desde el nucleótido 2558 al 2704 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 3 desde el nucleótido 1595 al 1747, o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 desde el nucleótido 1575 al 1724. Si debe hacerse una discriminación entre las clases de genes PARP, deberían utilizarse preferiblemente partes de los genes PARP que son específicas para la clase, tales como los dominios N-terminales que preceden al dominio catalítico o partes de los mismos.

Alternativamente, los genes o cDNAs que codifican proteínas PARP o partes de las mismas, pueden aislarse también por amplificación mediante PCR utilizando iniciadores apropiados tales como los iniciadores degenerados con la secuencia de nucleótidos que corresponde a las secuencias indicadas en SEQ ID No 13, SEPA ID No 14 (sic), o iniciadores con la secuencia de nucleótidos que corresponde a las secuencias indicadas en SEQ ID No 15 a 20. No obstante, está claro que las personas expertas en la técnica pueden diseñar oligonucleótidos alternativos para uso en PCR o pueden utilizar oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de al menos 20, con preferencia al menos aproximadamente 30, y de modo particular al menos aproximadamente 50, nucleótidos consecutivos de cualquiera de los genes PARP para aislar los genes o parte de los mismos por amplificación PCR.

Está claro que una combinación de estas técnicas, u otras técnicas (con inclusión, v.g., de RACE-PCR) disponibles para el operario experto con objeto de aislar genes o cDNAs sobre la base de fragmentos parciales y su secuencia de nucleótidos, v.g., obtenida por amplificación PCR, pueden utilizarse para aislar genes PARP, o parte de los mismos.

Además, los genes PARP, que codifican proteínas PARP en las cuales algunos de los aminoácidos han sido intercambiados por otros aminoácidos, químicamente similares (denominadas sustituciones conservadoras), o genes PARP sintéticos (que codifican proteínas similares a los genes PARP naturales pero con una secuencia de nucleótidos diferente, basada en la degeneración del código genético) y partes de los mismos son también adecuados para los métodos de la invención.

La PCD en células eucariotas, particularmente en células vegetales, puede inhibirse por una disminución moderada en el nivel funcional de PARP en dichas células eucariotas.

El nivel funcional de PARP en las células eucariotas, particularmente en células vegetales, puede reducirse por introducción de al menos un gen quimérico en dichas células, que comprende un promotor capaz de dirigir la transcripción en estas células, preferiblemente un promotor expresable en plantas, y una región funcional 3' de terminación de la transcripción y poliadenilación, enlazada operativamente a una región de DNA que, cuando se transcribe, produce una molécula de RNA biológicamente activa que es capaz de reducir el nivel funcional de la actividad endógena de PARP codificada por ambas clases de genes PARP.

Al menos dos de tales genes quiméricos moduladores de la PCD pueden introducirse en las células, con lo cual el RNA biológicamente activo codificado por el primer gen quimérico modulador de la PCD reduce el nivel funcional de la actividad endógena de PARP codificada por los genes de la clase NAP, y con lo cual el RNA biológicamente activo codificado por el segundo gen quimérico modulador de la PCD reduce el nivel funcional de la actividad endógena de PARP codificada por los genes de la clase ZAP, de tal modo que la actividad combinada de PARP se reduce moderadamente.

En una realización particularmente preferida, los genes quiméricos moduladores de la PCD reducen el nivel funcional de la actividad endógena de PARP por reducción del nivel de expresión de los genes endógenos PARP. A este fin, la región de DNA transcrita codifica un RNA biológicamente activo que reduce los mRNAs que codifican las proteínas PARP de las clases NAP y ZAP, que está disponible para la traducción. Esto puede conseguirse por técnicas tales como RNA antisentido, co-supresión o acción de ribozimas.

Como se utiliza en esta memoria, "cosupresión" hace referencia al proceso de supresión transcripcional y/o post-transcripcional de acumulación de RNA de una manera específica de la secuencia, dando como resultado la supresión de la expresión de genes homólogos endógenos o transgenes.

La supresión de la expresión de los genes endógenos PARP puede realizarse por tanto por introducción de un transgén que comprende un promotor fuerte enlazado operativamente a una región de DNA con lo cual el RNA resultante transcrito es un RNA de sentido o un RNA antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75%, con preferencia al menos 80%, particularmente al menos 85%, más particularmente al menos 90%, y especialmente al menos 95% de identidad de secuencia con o es idéntico a la secuencia codificante o transcrita de DNA (sentido) o al complemento (antisentido) de parte del gen PARP cuya expresión debe suprimirse. Preferiblemente, la región de DNA transcrita no codifica una proteína funcional. Particularmente, la región transcrita no codifica una proteína. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos de la región de sentido o antisentido debería tener con preferencia al menos una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos, con más preferencia al menos aproximadamente 250 nucleótidos, en particular al menos aproximadamente 500 nucleótidos, pero puede extenderse hasta la longitud total de la región codificante del gen cuya expresión debe reducirse.

Para el propósito de esta invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias afines de nucleótidos o aminoácidos, expresada como porcentaje, hace referencia al número de posiciones en las dos secuencias alineadas óptimamente que tienen residuos idénticos (x100) dividido por el número de posiciones comparadas. Una laguna, es decir una posición en una alineación en la cual está presente un residuo en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con residuos no idénticos. La alineación de las dos secuencias se realiza por el algoritmo de Wilbur y Upmann (Wilbur y Lipmann, 1983) utilizando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos o aminoácidos, una longitud de palabra de 2 aminoácidos, y una penalidad por laguna de 4. El análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencias, con inclusión de la alineación de secuencias como se ha descrito arriba, pueden realizarse convenientemente utilizando paquetes de software disponibles comercialmente, tales como los programas de la Serie Intelligenetics™ (Intelligenetics Inc., CA).

Estará claro para un técnico experto que uno o más genes quiméricos de sentido o antisentido moduladores de la PCD pueden utilizarse para conseguir las metas de la invención. Cuando se utiliza un gen quimérico de sentido o antisentido modulador de la PCD, este gen debe ser capaz de reducir simultáneamente la expresión de genes PARP de ambas clases. Esto puede conseguirse p.ej. por elección de la región transcrita del gen quimérico de tal manera que la expresión de ambas clases de genes puede regularse por un solo RNA de sentido o antisentido, es decir por elección de las regiones diana correspondientes a la región de DNA de homología máxima de los genes PARP de ambas clases e incorporación de una región de sentido o antisentido del DNA transcrita correspondiente a ambas regiones diana, de acuerdo con las condiciones descritas arriba para el RNA de sentido y antisentido. Alternativamente, regiones diferentes de RNA de sentido o antisentido, específica cada una para regulación de la expresión de una sola clase de genes PARP, pueden combinarse en una sola molécula de RNA, codificada por una región transcrita de un solo gen quimérico modulador de la PCD. Obviamente, las diferentes regiones de RNA de sentido o antisentido específicas para

regulación de la expresión de una sola clase de genes PARP, pueden introducirse como genes quiméricos moduladores de la PCD separados.

Las regiones transcritas codificantes de sentido y antisentido preferidas comprenden una secuencia de nucleótidos que corresponde (con limitaciones de identidad de secuencia como se ha indicado arriba) a una secuencia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos seleccionados de los dominios N-terminales de los genes PARP, que corresponden preferiblemente a una secuencia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos seleccionados de la secuencia de SEQ ID No 1 desde la posición del nucleótido 113 a 1189, la secuencia de SEQ ID No 3 desde la posición del nucleótido 107 al 583, la secuencia de SEQ ID No 5 desde la posición del nucleótido 131 al 542, o la secuencia de SEQ ID No 10 desde la posición del nucleótido 81 al 1180. Sin embargo, está claro que pueden utilizarse regiones transcritas codificantes de sentido o antisentido, que comprenden una secuencia correspondiente a la secuencia completa del dominio N-terminal de los genes PARP, o incluso a la secuencia completa de los genes PARP, en particular la región codificante de proteínas de los mismos. Se prefieren adicionalmente regiones transcritas codificantes de sentido y antisentido que comprenden una secuencia de nucleótidos correspondiente (con limitaciones de identidad de secuencia como se ha indicado arriba) a una secuencia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos seleccionados de los dominios catalíticos C-terminales de los genes PARP, preferiblemente una secuencia de al menos 100 nucleótidos que abarca las secuencias de nucleótidos codificantes de la firma PARP, particularmente las secuencias de nucleótidos codificantes de la firma de PARP arriba indicadas. Una vez más, está claro que pueden utilizarse las regiones transcritas codificantes de sentido o antisentido, que comprenden una secuencia correspondiente a la secuencia completa del dominio C-terminal de los genes PARP.

Los genes quiméricos moduladores de la PCD pueden reducir el nivel funcional de la actividad endógena de PARP por reducción del nivel de actividad aparente de las PARPs endógenas de ambas clases. A este fin, la región de DNA transcrita codifica un RNA biológicamente activo que se traduce en una proteína o péptido que inhibe las proteínas PARP de las clases NAP o ZAP o ambas, tales como anticuerpos desactivadores o mutantes PARP negativos dominantes.

Los “anticuerpos desactivadores de las proteínas PARP” son anticuerpos o partes de los mismos que se fijan específicamente al menos a algunos epítopes de las proteínas PARP, tales como el epítipo que abarca parte del dedo de Zn If desde la posición 111 a la 118 en ZAP1 o un péptido correspondiente en ZAP2, y que inhiben la actividad de la proteína diana.

“Mutantes PARP dominantes negativos” como se utiliza en esta memoria, son proteínas o péptidos que comprenden al menos parte de una proteína PARP (o una variante de la misma), preferiblemente una proteína PARP endógena para la célula hospedadora diana eucariota, que no tienen actividad alguna de PARP, y que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las proteínas endógenas PARP cuando se expresan en la célula hospedadora. Mutantes PARP dominantes negativos preferidos son proteínas que comprenden o están constituidas por un dominio de fijación de DNA funcional (o una variante del mismo) sin un dominio catalítico (tal como el dominio N-terminal que contiene dedo de Zn de aproximadamente 355 a aproximadamente 375 aminoácidos de una PARP de la clase ZAP, en particular un dominio de proteína de fijación de DNA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 2 desde el aminoácido 1 al 370 o un dominio de proteínas de fijación de DNA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 11 desde el aminoácido 1 al 98, o un dominio de proteínas de fijación de DNA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 2 desde el aminoácido 1 al 370 en donde la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 1 al 88 está reemplazada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 11, desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 98, o tal como el dominio de proteínas de fijación de DNA N-terminal de aproximadamente 135 a 160 aminoácidos de una PARP de la clase NAP, particularmente un dominio de proteínas de fijación de DNA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 4 desde el aminoácido 1 al 159 o un dominio de proteínas de fijación de DNA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No 6 desde el aminoácido 1 al 138) o sin un dominio catalítico funcional (tal como mutantes PARP inactivos, mutados en la denominada firma PARP, mutados particularmente en la lisina conservada de la posición 850 de SEQ ID No 2, la posición 532 de SEQ ID No 4, la posición 517 de SEQ ID No 6). Preferiblemente, los mutantes PARP dominantes negativos deberían retener su actividad de fijación de DNA. Los mutantes PARP dominantes negativos pueden fusionarse a una proteína portadora, tal como una  $\beta$ -glucuronidasa (SEQ ID No 12).

Una vez más, pueden utilizarse uno o más genes moduladores de la PCD codificantes de uno o más mutantes PARP dominantes negativos. Cuando se utiliza un gen quimérico modulador de la PCD, el gen tiene que ser capaz de reducir simultáneamente la expresión de genes PARP de ambas clases.

El nivel funcional de PARP en las células eucariotas, particularmente en células vegetales, puede reducirse por modificación de la secuencia de nucleótidos de los genes PARP endógenos en dichas células de tal manera que las proteínas PARP mutantes codificadas retengan aproximadamente 10% de su actividad. Los métodos para conseguir una modificación de este tipo de genes endógenos PARP incluyen recombinación homóloga para intercambiar los genes PARP endógenos por genes PARP mutantes v.g. por los métodos descritos en la Patente U.S. 5.527.695. En una realización preferida, dicha modificación orientada de la secuencia de nucleótidos de los genes PARP endógenos se consigue por introducción de oligonucleótidos DNA/RNA quiméricos como se describe en WO 96/22364 o en la patente US 5.565.350.

En el caso de las células vegetales, se ha encontrado sin embargo que la introducción de un solo gen quimérico modulador de la PCD, que codifique preferiblemente RNA con actividad biológica en la reducción de la expresión de una sola clase de los genes PARP, particularmente de genes PARP de la clase ZAP, puede ser suficiente para la reducción de la actividad total de PARP en dichas células vegetales de acuerdo con la invención, es decir para inhibir o prevenir la muerte celular programada en dichas células vegetales.

En esta realización de la invención, el gen quimérico modulador de la PCD comprende preferiblemente una región transcrita que codifica un RNA biológicamente activo que comprende al menos una región de RNA, con preferencia de al menos 100 nucleótidos de longitud, clasificada de acuerdo con los criterios mencionados en esta memoria como un RNA de sentido para uno de los genes endógenos PARP, y que comprende al menos en otra región de RNA, preferiblemente de al menos 100 nucleótidos de longitud, que se clasifica de acuerdo con los criterios mencionados en esta memoria como un RNA antisentido para uno de los genes endógenos PARP, donde la región de RNA antisentido y la de sentido son capaces de combinarse en una región bicatenaria, con preferencia a lo largo de una distancia de al menos aproximadamente 100 nucleótidos.

Se espera que la introducción de un solo gen quimérico modulador de la PCD, que puede reducir el nivel funcional o aparente de una sola clase de proteínas PARP, particularmente una proteína PARP de la clase ZAP, como se describe en esta memoria, puede ser análogamente suficiente para la reducción de la actividad total de PARP en las células vegetales de acuerdo con la invención. La muerte celular programada reducida o inhibida en células vegetales que comprenden al menos un solo gen quimérico modulador de la PCD de acuerdo con la invención puede dar como resultado una resistencia mejorada a condiciones adversas, tal como resistencia al estrés impuesto por tratamiento con productos químicos, resistencia al estrés por frío, resistencia al estrés impuesto por patógenos y plagas, resistencia a la sequía, resistencia al estrés por calor, etc.

Si la introducción de genes quiméricos moduladores de la PCD en células eucariotas dará finalmente como resultado un nivel funcional moderada o severamente reducido de PARP combinada en dichas células - es decir, PCD inhibida o PCD incrementada - estará determinado usualmente por el nivel de expresión (sea al nivel de la transcripción o al nivel combinado transcripción/traducción) de dichos genes moduladores de la PCD. Un factor principal contribuyente al nivel de expresión del gen modulador de la PCD es la elección de la región promotora, aunque otros factores (tales como, pero sin carácter limitante, la elección del extremo 3', la presencia de intrones, el uso de codones de la región transcrita, la estabilidad del mRNA, la presencia de secuencias de consenso alrededor del sitio de iniciación de la traducción, la elección de regiones de RNA 5' y 3' no traducidas, la presencia de secuencias PEST, la influencia de la estructura de la cromatina que rodea el sitio de inserción de un gen modulador de la PCD estable integrado, el número de copias de los genes moduladores de la PCD introducidos, etc.) o combinaciones de los mismos contribuirán también al nivel de expresión último del gen modulador de la PCD. En general, puede suponerse que la reducción moderada de los niveles funcionales de PARP combinada puede conseguirse por genes moduladores de la PCD que comprenden un promotor relativamente débil, mientras que la reducción severa de los niveles funcionales de PARP combinada puede conseguirse por genes moduladores de la PCD que comprenden un promotor relativamente fuerte. No obstante, el nivel de expresión de un gen modulador de la PCD que comprende un promotor específico y eventualmente su efecto en la PCD, pueden variar en función de los otros factores contribuyentes, como se han mencionado anteriormente.

Para el propósito de realizaciones particulares de la invención, los genes quiméricos moduladores de la PCD pueden comprender un promotor constitutivo, o un promotor que se expresa en la totalidad o la mayoría de los tipos de células del organismo, particularmente en toda la planta, tales como las regiones promotoras derivadas de los genes T-DNA, en particular los genes de opina-sintasa de los plásmidos Ti o Ri de *Agrobacterium* (v.g., los promotores nos, ocs), o las regiones promotoras de genes virales (tales como los promotores CaMV35S, o variantes de los mismos).

Adicionalmente, puede ser ventajoso controlar la expresión del gen modulador de la PCD a voluntad o en respuesta a estímulos ambientales, v.g. por inclusión de un promotor inducible que puede ser activado por un estímulo externo, tal como, pero sin carácter limitante, la aplicación de compuestos químicos (v.g. fitoprotectores, herbicidas, glucocorticoides), condiciones de luz, exposición a estrés abiótico (v.g. lesiones, metales pesados, temperaturas extremas, salinidad o sequía) o estrés biótico (v.g. infección por patógenos o plagas con inclusión de infección por hongos, virus, bacterias, insectos, nematodos, micoplasmas y organismos semejantes a micoplasmas, etc.). Ejemplos de promotores inducibles expresables en plantas adecuados para la invención son: promotores inducibles por nematodos (tal como se describen en el documento WO 92/21757), promotores inducibles por hongos (WO 93/19188, WO 96/28561), promotores inducibles después de aplicación de glucocorticoides tales como dexametasona ( ), o promotores reprimidos o activados después de la aplicación de tetraciclina (Gatz *et al.* 1998; Weimann *et al.*, 1994).

Puede ser conveniente o necesario restringir el efecto sobre la muerte celular programada a un subconjunto particular de las células del organismo, particularmente de la planta, por lo que los genes moduladores de la PCD pueden incluir promotores específicos de tejido o específicos del tipo de célula. Ejemplos de promotores adecuados expresables en plantas, expresados selectivamente en tejidos particulares o tipos de células particulares son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin carácter limitante, promotores específicos de semillas (v.g. WO 89/03887), promotores específicos de primordios de órganos (An *et al.*, 1996), promotores específicos del tallo (Keister *et al.*, 1988), promotores específicos de las hojas (Hudspeth *et al.*, 1989), promotores específicos de mesófilos (tales como los promotores fotoinducibles Rubisco), promotores específicos de la raíz (Keller *et al.*, 1989), promotores específicos de tubérculos (Keil *et al.*, 1989), promotores específicos de tejido vascular (Peleman *et al.*, 1989), promotores específicos de meristemos (tales como el promotor del gen SHOOTMERISTEMLESS (STM, Long *et al.*, 1996), promotores específicos de primor-

dios (tales como el promotor del gen *Antirrhinum* Cyc D3A, Doonan *et al.*, 1998), promotores específicos de las anteras (WO 89/10396, WO 92/13956, WO 92/13957), promotores específicos de los estigmas (WO 91/02068), promotores específicos de la zona de dehiscencia (WO 97/13865), promotores específicos de semillas (WO 89/03887), etc.

5 Preferiblemente, los genes quiméricos moduladores de la PCD están acompañados por un gen marcador, preferiblemente un gen marcador quimérico que comprende un DNA marcador que está enlazado operativamente en su extremo 5' para un promotor expresable en plantas, con preferencia un promotor constitutivo, tal como el promotor 35S de CaMV, o un promotor fotoinducible tal como el promotor del gen que codifica la subunidad pequeña de Rubisco; y enlazado operativamente en su extremo 3' a señales adecuadas de formación del extremo 3' de la transcripción en plantas y poliadenilación. Es de esperar que la elección del DNA marcador no sea crítica, pudiendo utilizarse cualquier DNA marcador adecuado. Por ejemplo, un DNA marcador puede codificar la proteína que proporciona un "color" distinguible a la célula vegetal transformada, tal como el gen A1 (Meyer *et al.*, 1987) o la Proteína Fluorescente Verde (Sheen *et al.*, 1995), puede proporcionar resistencia a los herbicidas a la célula vegetal transformada, tal como el gen *bar*, que codifica resistencia a la fosfinotricina (EP 0.242.246), o puede proporcionar resistencia a los antibióticos a las células transformadas, tales como el gen *aac* (6'), que codifica resistencia a la gentamicina (WO 94/01560).

Métodos para introducir genes quiméricos moduladores de la PCD en células eucariotas, particularmente métodos para transformar células vegetales son bien conocidos en la técnica, y se cree que no son críticos para los métodos de la invención. La transformación da como resultado células transformadas transitoriamente o de manera estable (por lo cual los genes quiméricos moduladores de la PCD se insertan de manera estable en el genoma de la célula, particularmente en el genoma nuclear de la célula).

Está claro que los métodos y medios descritos en esta memoria para alterar la muerte celular programada en células de plantas y en plantas, tienen varias posibilidades de aplicación importantes. La inhibición de la PCD por los métodos y medios descritos en esta memoria, puede utilizarse para aliviar el estrés impuesto sobre las células, en particular las células vegetales, durante la transformación y por tanto aumentar la eficiencia de transformación, como se describe en WO 97/06267. La inhibición de la PCD puede utilizarse también para mejorar cultivos celulares de células eucariotas, particularmente de células vegetales.

De modo inesperado, se ha encontrado que después de la introducción de un gen quimérico modulador de la PCD que modula la expresión de un gen PARP, preferiblemente un gen quimérico que modula la expresión de un gen PARP de la clase ZAP, particularmente un gen quimérico modulador de la expresión de un gen PARP de la clase ZAP en el cual la región transcrita codifica un RNA biológicamente activo que comprende simultáneamente un RNA de sentido y antisentido como se describe en esta memoria, las células vegetales transformadas, callos de plantas y plantas exhibían un crecimiento incrementado.

Aunque no se pretende limitar la invención a un modo de acción particular, se cree que el crecimiento incrementado es una consecuencia del número reducido de células que sufren muerte celular programada, probablemente por aumento del umbral para una señal que inhibe la división celular, conduciendo así a plantas de crecimiento más vigoroso. Estas plantas son también más resistentes al estrés como se explica en otro lugar de esta solicitud.

Por consiguiente, la invención se refiere también a un método para incrementar el crecimiento, preferiblemente el crecimiento vegetativo, de células vegetales, tejidos de plantas y plantas que comprenden al menos un gen quimérico modulador de la PCD de acuerdo con el primer aspecto de la invención, preferiblemente un gen quimérico modulador de la expresión de un gen PARP de la clase ZAP, en particular un gen quimérico modulador de la expresión de un gen PARP de la clase ZAP en el cual la región transcrita codifica un RNA biológicamente activo que comprende simultáneamente un RNA de sentido y antisentido.

Aunque está claro que los métodos descritos en esta memoria pueden aplicarse esencialmente a todas las especies y variedades de plantas, la invención será especialmente adecuada para la muerte celular programada en plantas con valor comercial. Plantas particularmente preferidas a las cuales puede aplicarse la invención son maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, céspedes, alfalfa, leguminosas, una verdura crucífera, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, y plantas ornamentales tales como clavellina, cristantero, rosas, tulípanes y análogas.

La planta transformada obtenida puede utilizarse en un esquema de reproducción convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir el gen quimérico controlador de la división celular de la invención en otras variedades de la misma especie o especies de plantas afines. Las semillas obtenidas a partir de las plantas transformadas contienen el gen modulador de la PCD de la invención como una inserción genómica estable.

Los ejemplos que siguen describen la construcción de genes quiméricos controladores de la apoptosis y el uso de dichos genes para la modulación de la muerte celular programada en células y organismos eucariotas. A no ser que se indique otra cosa en los ejemplos, todas las técnicas de DNA recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos estándar como se describen en Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE.UU. Materiales y métodos estándar para trabajo molecular con plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Cloy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd. (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications, Reino Unido.

## ES 2 317 698 T3

A lo largo de la descripción y los ejemplos, se hace referencia a las secuencias siguientes:

- SEQ ID No 1: Secuencia de DNA del gen ZAP de *Zea mays* (*zap1*)
- 5 SEQ ID No 2: Secuencia de proteína de la proteína ZAP de *Zea mays* (ZAP1)
- SEQ ID No 3: Secuencia de DNA del gen NAP de *Zea mays* (*nap*)
- SEQ ID No 4: Secuencia de proteína de la proteína NAP de *Zea mays* (NAP)
- 10 SEQ ID No 5: Secuencia de DNA de *Arabidopsis thaliana* (*app*)
- SEQ ID No 6: Secuencia de proteína de la proteína NAP de *Arabidopsis thaliana* (APP)
- 15 SEQ ID No 7: Secuencia de consenso para el dominio A de proteínas PARP no-convencionales
- SEQ ID No 8: Secuencia de consenso para el dominio A1 de proteínas PARP no-convencionales
- SEQ ID No 9: Secuencia de consenso para el dominio A2 de proteínas PARP no-convencionales
- 20 SEQ ID No 10: Secuencia de DNA del segundo gen ZAP de *Zea mays* (*Zap2*)
- SEQ ID No 11: Secuencia de proteína de la proteína ZAP de *Zea mays* (ZAP2)
- 25 SEQ ID No 12: Secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión entre el dominio de fijación de DNA de APP y la proteína GUS
- SEQ ID No 13: Iniciador PCR degenerado
- 30 SEQ ID No 14: Iniciador PCR degenerado
- SEQ ID No 15: Iniciador PCR
- SEQ ID No 16: Iniciador PCR
- 35 SEQ ID No 17: Iniciador PCR
- SEQ ID No 18: Iniciador PCR
- 40 SEQ ID No 19: Iniciador PCR
- SEQ ID No 20: Iniciador PCR
- SEQ ID No 21: Fusión de traducción promotor app-gus
- 45

### Texto libre del listado de secuencias

- El texto libre siguiente se ha utilizado en la parte del Listado de Secuencias de esta Solicitud
- 50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A de proteínas PARP no-convencionales
  - <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A1 de proteína PARP no-convencional
  - 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A2 de proteína PARP no-convencional
  - <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Proteína de fusión entre el dominio N-terminal de APP y la proteína GUS
  - 60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador PCR degenerado
  - <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso como iniciador PCR
  - <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fusión del promotor APP con el gen de beta-glucuronidasa
  - 65 <223> Codón de iniciación de la traducción

## Ejemplos

### Procedimientos experimentales

#### Cepas de levadura y bacterianas

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

Se utilizó la cepa XL-1 de *Escherichia coli* (Stratagene, La Jolla, CA) para las manipulaciones de plásmidos y cribados de genotecas, que se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos estándar (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó *E. coli* BL21 (Studier y Moffat, 1986) para la expresión de la proteína APP y *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>r</sup> (pGV2260) (Deblaere *et al.*, 1985) para la transformación estable de las plantas.

#### Ensayo de actividad de poli(ADP-ribosa)polimerasa

Se ensayó la actividad enzimática de la APP en extractos de proteínas totales de cepas de levadura preparadas como sigue. Se cultivaron DY(pV8SPA) o DY(pYeDP1/8-2) en 50 ml de medio SDC durante una noche a 30°C en una máquina de sacudidas giratoria a 150 rpm. Se cosecharon las células de levadura por centrifugación a 1000 x g, se lavaron tres veces con 150 ml de tampón de fosfato de potasio 0,1M (pH 6,5), y se suspendieron de nuevo en 5 ml de tampón de sorbitol (sorbitol 1,2M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,12M, ácido cítrico 0,033M, pH 5,9). Se añadió Lyticase (Boehringer Mannheim, Alemania) a la suspensión de células a una concentración final de 30 U ml<sup>-1</sup> y las células se incubaron a 30°C durante 1 hora. Se lavaron luego los esferoplastos de levadura tres veces con tampón de sorbitol y se resuspendieron en 2 ml de tampón de lisis enfriado en hielo (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, DTT 1 mM). Después de tratamiento por ultrasonidos, el lisado se centrifugó a 20.000 x g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se desaló en una columna EconoPack<sup>TM</sup> 10 DG (Bio-Rad, Richmond, CA) equilibrada con tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM). Para reducir la degradación proteolítica de las proteínas, los tampones de lisis y de reacción se suplementaron con un cóctel inhibidor de proteasas (Boehringer), una tableta por cada 50 ml. Se separaron los ácidos nucleicos de los extractos totales por adición de NaCl y sulfato de protamina a una concentración final de 600 mM y 10 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Después de incubación a la temperatura ambiente durante 10 min, se separó el precipitado por centrifugación a 20.000 x g durante 15 min a 4°C. El tampón del sobrenadante se intercambió en lugar del tampón de reacción por filtración con gel en una columna Econo-Pack<sup>TM</sup> 10 DG.

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

#### Técnicas inmunológicas

Se expresó un cDNA truncado *app* que codificaba un polipéptido APP desde los aminoácidos Met<sup>310</sup> a His<sup>637</sup> como una fusión de traducción con seis residuos histidina en el término N después de inducción de un cultivo de 500 ml del *E. coli* BL21 (pETANdeSPA) con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM. El polipéptido APP se purificó hasta cuasi-homogeneidad por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes (en presencia de hidrócloruro de guanidinio 6M) en una columna Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen, Chatsworth, CA). Después de diálisis contra PBS, se utilizó una mezcla de los polipéptidos APP solubles e insolubles para inmunizar dos conejos blancos de Nueva Zelanda siguiendo un protocolo de inmunización estándar (Harlow y Lane, 1988). Para el análisis por transferencia Western, las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE desnaturalizante (Sambrook *et al.*, 1989; Harlow y Lane, 1988) y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Hybond-C; Amersham), utilizando un Semi-Dry Blotter II (Kem-En-Tec, Copenhague, Dinamarca).

La localización *in situ* del antígeno en células de levadura se llevó a cabo como se ha descrito (Harlow y Lane, 1988). Para la localización de la proteína APP en esferoplastos de levadura, se diluyó suero anti-APP en relación 1:3000 hasta 1:5000 en tampón solución salina-BSA tamponado con Tris. Se utilizó el anticuerpo monoclonal 10H, que reconoce específicamente el polímero poli(ADP-ribosa) (Ikajima *et al.*, 1990) en una dilución 1:100 en tampón de

PBS. El anticuerpo de ratón se detectó con el fragmento de IgG F(ab')<sub>2</sub> anti-ratón de oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), a una dilución de 1:200. Se detectó la IgG de conejo con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de oveja anti-IgG de conejo conjugado con CY-3 (Sigma), a una dilución de 1:200. Para la visualización del DNA, se incubaron portaobjetos durante 1 min en PBS con 10 µg ml<sup>-1</sup> de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma). La obtención de imágenes de fluorescencia se realizó en un microscopio de epifluorescencia Axioskop (Zeiss, Jena, Alemania). Para la observación de los fluorocromos FITC y CY-3 se utilizaron cubos de 23 y 15 filtros, respectivamente. Las células se fotografiaron con película Fuji Color-100 super plus.

#### Material vegetal y análisis histoquímico

Se utilizó *Nicotiana tabacum* SR1 (Maliga *et al.*, 1975) para la generación de transformantes estables siguiendo el procedimiento de cocultivo en discos de hojas (De Block *et al.*, 1987) con *A. tumefaciens* C58C1 RifR(pGV2260; pGCNSPAGUS). Se utilizó como control la línea SR1 de *N. tabacum* transformada con GUS auténtico bajo el control del CaMV 35S. Se utilizó *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, para la transformación de la fusión app-promotor-GUS siguiendo el procedimiento de infiltración *in situ*.

Para la tinción histoquímica *in situ* de la actividad de GUS, se fijaron muestras de plantas en acetona al 90% enfriada en hielo durante 30 min, se lavaron en K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M (pH 7,8), y se incubaron luego en tampón de tinción (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, pH 7,8, X-Gluc 2 mM, Fe<sup>3+</sup>-EDTA 20 mM) a 37°C. Los tejidos de plantas teñidos se guardaron en etanol al 70% a 4°C. En caso necesario, se redujo el pardeamiento de los tejidos debido a la oxidación fenólica por incubación con lactofenol (Beeckman y Engler, 1994). Se examinó la tinción de GUS bajo un microscopio óptico Jenalumar (Zeiss). Los tejidos vegetales se fotografiaron con película Fuji Color-00 super plus.

#### Métodos diversos

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

#### Ejemplo 1

##### Aislamiento de genes que codifican homólogos de PARP de *Zea mays*

El ejemplo siguiente se da únicamente para propósitos de referencia.

Con el propósito de aislar cDNA de maíz codificante de homólogo(s) de PARP se siguieron dos métodos. En primer lugar, se cribó una genoteca de cDNA de maíz en condiciones de hibridación DNA-DNA de severidad baja, utilizando una sonda de DNA preparada a partir del cDNA de *app* de *Arabidopsis*. En segundo lugar, se realizó una amplificación por PCR de parte de la PARP de maíz, utilizando el cDNA de la primera cadena como molde y dos iniciadores degenerados, designados sobre la base de la secuencia de la "firma PARP", la secuencia de aminoácidos más conservada entre todas las proteínas PARP conocidas.

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

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

Utilizando iniciadores degenerados basados en regiones muy conservadas en la “firma PARP” y el cDNA de la primera cadena de *Zea mays* como molde, se amplificó un fragmento de 310 pares de bases. Para la PCR con iniciadores degenerados 5'-CCGAATTCGGNTAYATGTTTGGNAA-3' (SEQ ID No 13) y 5'-CCGAATTCACNATRTAYTCRT TRTA-3' (SEQ ID No 14) con Y=C/T; R=A/G; N=A/G/C/T), se utilizó el cDNA de la primera cadena como molde y se sintetizó utilizando 5 µg de RNA poli(A)<sup>+</sup> a partir de hojas jóvenes de maíz y la transcriptasa inversa MuMLV. Se realizaron amplificaciones PCR con DNA-polimerasa Taq en un volumen de 100 µl utilizando las condiciones siguientes: 1 min a 95°C, 2 min a 45°C, 3 min a 72°C, seguido por 38 ciclos de 1 min a 95°C, 2 min a 45°C, 3 min a 72°C, con una incubación final durante 10 min a 72°C.

La secuencia del fragmento de 310 pb demostró 55% de identidad de secuencia y 64% de semejanza de secuencia con PARP humana en la misma región, pero era, sin embargo, diferente de la secuencia del cDNA *nap*. Se identificaron tres cDNAs zap después de cribado con el fragmento de 310 pb, que se obtuvo por PCR con iniciadores degenerados. Estos tres cDNAs purificados se dedujeron todos del mismo transcrito debido a que tenían regiones 3' no codificantes idénticas; el clon de mayor longitud (#9) se secuenció en ambas cadenas (SEQ ID No 1). Este cDNA codificaba un polipéptido PARP-homólogo de 689 aminoácidos (SEQ ID No 2; peso molecular 109 kDa), que fue designado por los inventores como ZAP1 (Figura 1B). El primer dedo de Zn de ZAP1 era probablemente no funcional debido a que tenía la secuencia CKSCxxxHASV, que no incluía un tercer residuo de cisteína.

El análisis 5'RACE PCR de los transcritos *zap* de la línea de maíz LG2080 (la genoteca de cDNA cribada se produjo a partir de la línea endogámica B734) se realizó como se ha descrito arriba utilizando los iniciadores específicos de zap siguientes 5'-AAGTCGACGCGGCCGCCACACCTAGTGCCAGGTCAG-3' (SEQ ID No 17) y 5'-ATCTCAATTGTACATTCTCAGGA-3' (SEQ ID No 18). Se obtuvo un producto PCR de 450 pb después de PCR con iniciadores específicos de zap. Se secuenciaron 8 fragmentos 5'RACE PCR independientes, debido a sus ligeras diferencias en longitudes en los extremos 5', con iniciadores específicos de zap. En la totalidad de los transcritos de las plantas de maíz LG2080, había una inserción de secuencia adicional en la región codificante, que hacía la proteína ZAP 11 aminoácidos más larga (980 aminoácidos, peso molecular -110,4 kDa (sic)). El dedo de Zn I de ZAP2 era estándar y su lectura era CKSCxxxHARC (Figura 1B; SEQ ID No 11). La diferencia de secuencias puede ser debida a diferencias entre variedades de maíz, a la expresión de dos genes homólogos, o a remodelación alternativa. De hecho, el maíz puede tener al menos dos genes zap (Figura 2B), que codifican un transcrito de 3,4-3,5 kb (Figura 2D). El experimento de transferencia en gel de DNA con una sonda preparada a partir del cDNA *zap* demostró que estaban presentes los genes homólogos en *Arabidopsis*.

Estructuralmente, ZAP era muy similar a PARP de los animales. El mismo tenía un dominio de fijación de DNA bien conservado, compuesto de dos dedos de Zn (36% de identidad y 45% de semejanza con el dominio de fijación de DNA de PARP de ratón). Se demostró una homología aún mayor por comparación exclusiva de las secuencias de los dedos de Zn, Ala<sup>1</sup>-Phe<sup>162</sup> en la enzima de ratón (44% de identidad y 54% de semejanza), o un subdominio aguas abajo de la señal de localización nuclear (NLS), Leu<sup>237</sup>-Ser<sup>360</sup> en la PARP de ratón (identidad 40% y semejanza 50%). Mientras que la señal de localización nuclear bipartita característica de PARP de mamífero no podía identificarse en ZAP, la secuencia KRKK proporcionaba una NLS monopartita (Figura 1B). El dominio de automodificación supuesto estaba deficientemente conservado y era más corto en ZAP que en PARP de ratón. La compilación de la homología de los dominios catalíticos entre zap, NAP, APP y PARP de ratón se muestra en la Figura 2. Debe indicarse que el dominio de fijación de NAD<sup>+</sup> de ZAP era más similar a la enzima de un mamífero (identidad 48%) que a la de APP y NAP (40% y 42% de identidad de secuencia, respectivamente), en tanto que APP y NAP eran idénticas en un 68% y semejantes en un 76% a su dominio catalítico.

## Ejemplo 2

*Demstración de que la proteína PARP no convencional tiene actividad de poli(ADP-ribosa)-polimerasa dependiente de DNA*

El ejemplo siguiente se da únicamente para propósitos de referencia.

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

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

Se puso cDNA de *app* de longitud total en pYEDP1/8-2 bajo el control de un promotor de levadura inducible por galactosa de la manera siguiente: se escindió el cDNA de *app* de longitud total de pC3 (Lepiniec *et al.*, 1995) como un fragmento *XhoI-EcoRI*. Los extremos se rellenaron con el fragmento Klenow de DNA-polimerasa I, y el fragmento se subclonó en el sitio *SmaI* del vector de expresión de levadura pYEDP1/8-2 (Cullin y Pompon, 1988). El vector de expresión resultante pV8SPA (Figura 4A) se transformó en la cepa DY de *S. cerevisiae*.

Para la expresión de APP en *E. coli*, la región codificante completa del cDNA de app se amplificó por PCR con DNA-polimerasa de Pfu (Stratagene), utilizando los iniciadores 5'-AGGATCCCATGGCGAACAAGCTCAAAGT GAC-3' (SEQ ID No 19) y 5'-AGGATCCTTAGTGCTTGTAGTTGAAT-3' (SEQ ID No 20), y se subclonó como un fragmento *Bam*HI en pET19b (Novagene, Madison, WI), dando como resultado pETSPA. La expresión de la APP de longitud total en *E. coli* BL21 de pETSPA era muy pobre. Para obtener una expresión mejor, se digirió pETSPA con *Nco*I y *Nde*I o con *Sma*I, se rellenaron los extremos con el fragmento Klenow de DNA-polimerasa I, y se autoligaron luego los plásmidos. De los plásmidos pETΔNdeSPA y pETΔSmaSPA resultantes, únicamente pETΔNdeSPA proporcionaba una expresión satisfactoria del polipéptido APP truncado (Met<sup>310</sup> hasta His<sup>637</sup>) en *E. coli* BL21.

La expresión de la APP en levadura se verificó por análisis mediante transferencias Northern y Western. (Fig. 4). Dado que el promotor en pV8SPA es inactivo cuando las células se cultivan en glucosa y se desreprimen en medios que contienen galactosa, se esperaba que la expresión estuviera estrictamente regulada por la fuente de carbono. Sin embargo, el análisis por transferencia Northern del RNA y el análisis por inmunotransferencia de proteínas en DY (pV8SPA) en comparación con la cepa de control DY que contenía el vector vacío, demostró que el mRNA app y la proteína APP se expresaban en levadura aun cuando se cultivaban en medios que contenían glucosa (Figura 4B, pista 2). La peculiaridad de la expresión observada en medio que contenía glucosa era que tanto mRNA app como la proteína APP eran más cortos que los detectados después de inducción con galactosa (compárense las pistas 2 y 4 en la Figura 4B). El polipéptido APP con el peso molecular mayor (aparentemente una proteína de longitud total) se detectaba únicamente en medio que contenía galactosa, aunque tales células expresaban también el mRNA y la proteína truncados. La explicación más probable para este hallazgo es que cuando la cepa DY(pV8SPA) se cultiva en glucosa, existe una expresión que se fuga de la casete de expresión, comenzando la transcripción 200-300 pares de bases aguas abajo del inicio de la transcripción observado después de inducción en galactosa. Este mRNA más corto no codifica probablemente la primera metionina (Met<sup>1</sup>) de APP y, por tanto, la traducción se inicia en Met<sup>72</sup>. Esto podría explicar la diferencia observada de -5 kDa (siendo la diferencia calculada 7,5 kDa) en las masas moleculares de los polipéptidos APP de las cepas cultivadas en glucosa o en galactosa. La posibilidad de que las diferencias en pesos moleculares puedan atribuirse a automodificación por poli(ADP-ribosilación se excluyó por cultivo de cepas en presencia de inhibidores de PARP tales como 3-ABA y nicotinamida (Figura 4B, compárense las pistas 6 y 8 con la pista 4).

Para detectar la síntesis de poli(ADP-ribosa), se extrajeron las proteínas totales de cepas de levadura cultivadas en diferentes condiciones y se incubaron en presencia de NAD<sup>+</sup> marcada radiactivamente. Para prevenir la síntesis de poli(ADP-ribosa) y la posible automodificación de la APP *in vivo*, se cultivaron también cepas en presencia de 3ABA, un inhibidor reversible de PARP, que se separó subsiguientemente de los extractos de proteínas durante el desalado. La Figura 5 muestra que poli(ADP-ribosa) es sintetizada por extractos de proteínas de DY(pV8SPA) cultivados en galactosa (Figura 5A, pistas 1 y 2), pero no por una cepa que contiene el vector vacío (Figura 5A, pista 4). Puede verse también que APP de *Arabidopsis* podría sintetizar polímeros de hasta 40 residuos de longitud (Figura 5A, pista 1) incorporándose la mayor parte de la radiactividad en el 10-15-mero. Esta observación es consistente con los tamaños de los polímeros detectados por otros autores (Chen *et al.*, 1994). Se incorporaba más radiactividad en el polímero cuando la cepa de levadura se cultivaba con 3ABA que sin ella (Figura 5A, pista 1 comparada con la pista 2); la razón podía ser que o bien la APP extraída de cultivos inhibidos se automodificaba menos (se cree que la automodificación inhibe la actividad de PARP) o que la NAD<sup>+</sup> marcada era utilizada por la enzima del cultivo no inhibido para la extensión del polímero existente, dando como resultado una menor actividad específica global. En las mismas condiciones de reacción, la poli(ADP-ribosa) sintetizada por PARP humana, sea en tampón de reacción solo o en presencia de un extracto de proteínas de levadura total de DY(pYedP1/8-2) (Figura 5A, pistas 5 y 6, respectivamente), exhibía cadenas mucho más largas, posiblemente hasta un 400-mero (de Murcia y Ménissier de Murcia, 1994).

La estimulación de la actividad enzimática por DNA mellado es una propiedad bien conocida de la PARP de los animales (Álvarez-González y Althaus, 1989). Por esta razón, los inventores testaron si la actividad de la proteína APP era dependiente de DNA. Después de la eliminación de los ácidos nucleicos de la levadura (DNA, RNA) y algunas proteínas básicas del extracto de proteínas DY(pV8SPA) cultivado en galactosa, se analizó la síntesis de poli(ADP-ribosa) en presencia de concentraciones crecientes de DNA de esperma de salmón tratado por ultrasonidos. Como puede verse en la figura 5B, había una correlación directa entre la cantidad de DNA presente en la reacción y la incorporación de <sup>32</sup>P-NAD<sup>+</sup>. El escaneo de las imágenes fosforescentes indicó que se incorporaba seis veces más radiactividad en la poli(ADP-ribosa) en la mezcla de reacción que contenía 40 μg ml<sup>-1</sup> de DNA que en la que contenía 2 μg ml<sup>-1</sup> de DNA (Figura 5B, pistas 4 y 2, respectivamente). La síntesis del polímero era sensible a 3ABA en la mezcla de reacción (Figura 5B, pista 5).

#### APP es una proteína nuclear

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

Adicionalmente, se testó si la APP era constitutivamente activa en células de levadura, como ha sido consignado para la PARP humana (Collinge y Althaus, 1994). En este caso, se incubaron esferoplastos de levadura fijos con el anticuerpo monoclonal 10H, que reconoce específicamente los polímeros de poli(ADP-ribosa) (Kawamitsu *et al.*, 1984). Se localizó una señal de fluorescencia amarillenta-verde positiva con el anticuerpo 10H en el núcleo y se observó únicamente en células DY(pV8SPA) cultivadas en galactosa. La tinción positiva se reducía notablemente en las células cultivadas en presencia de los inhibidores de PARP, 3ABA y nicotinamida.

Para identificar la localización intracelular de APP en células vegetales, se utilizó un método ampliamente adoptado en estudios de plantas, a saber, el examen de la localización subcelular de una proteína de fusión formada entre la proteína en cuestión y un gen informador, una vez que se produjo la fusión proteínica en plantas transgénicas o células transfectadas (Citovsky *et al.*, 1994; Sakamoto y Nagatani, 1996; Terzaghi *et al.*, 1997; von Arnim y Deng, 1994). Se realizó una fusión traduccional en el terminal N de GUS con la parte del polipéptido APP que se extendía desde Met<sup>1</sup> a Pro<sup>407</sup>. La fusión traduccional de APP con GUS bacteriano se construyó como sigue. Se cortó el plásmido pETSPA con *Sma*I, se trató con fosfatasa alcalina, y se ligó a un fragmento como *Nco*I-*Xba*I de pGUS1 (Plant Genetic Systems N.V., Gante, Bélgica). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* XL-1 y las células se extendieron en placas sobre medio LB suplementado con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido 0,1 mM, 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronido, y 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ampicilina. De este modo, se seleccionó pETSPAGUS como colonias azules. La expresión en *E. coli* de la proteína de fusión de ~110 kDa se confirmó por medio de geles de actividad GUS *in situ* (Lee *et al.*, 1995). La fusión APP-GUS se puso bajo el control del promotor 35S del CaMV (el fragmento *Bam*HI hecho como Klenow de pETSPAGUS se subclonó en pJD330 digerido con *Sma*I; Gallie y Walbot, 1992) y la casete de expresión resultante se subclonó como un fragmento *Xba*I en el sitio *Xba*I del vector binario pCGN1547 (McBride y Summerfelt, 1990) para dar pGCNSPAGUS. El pGCNSPAGUS se introdujo finalmente en *A. tumefaciens* C58C1Rif<sup>®</sup> (pGV2260) por el procedimiento de transformación congelación-descongelación.

La expresión de la proteína de fusión se verificó en *E. coli*. El cDNA quimérico bajo el control del promotor 35S CaMV se integró de manera estable en el genoma del tabaco. La progenie de 4 plantas transgénicas independientes de tabaco se analizó respecto a la distribución subcelular de la actividad de GUS después de tinción histoquímica *in situ* (Jefferson *et al.*, 1987). En plantas de semillero de dos días de edad pudo detectarse la actividad de GUS en los cotiledones y en las raíces, pero no en los hipocótilos o los ápices de la raíz. Debido a la transparencia de los tejidos de la raíz, la tinción de GUS se localizaba claramente en los núcleos de los pelos radiculares y las células epidérmicas. Adicionalmente, se observó cierta tinción difusa, no localizada de otras células de las raíces, en particular a lo largo de los cilindros vasculares. Esta tinción no nuclear de GUS era más pronunciada en los tejidos de las hojas. Mientras que las hojas jóvenes verdaderas o cotiledones exhibían una tinción azul intensa de los núcleos, se apreciaba también cierta tinción difusa del citoplasma. En las hojas completamente expandidas, sin embargo, la tinción de GUS se hacía homogénea y similar a la tinción de plantas de control transformadas con GUS bajo el control del promotor 35S de CaMV, en el cual se expresaba GUS en el citoplasma. Eventualmente, las hojas más viejas o los cotiledones no exhibían prácticamente actividad alguna de GUS detectable histoquímicamente, con la excepción de los haces vasculares, donde la tinción de GUS no podía confinarse a ningún compartimiento particular de las células.

#### *La deficiencia en DNA-ligasa I induce la expresión del gen app*

La PARP en las células animales es una de las proteínas nucleares más abundantes y su actividad está regulada por cambios alostéricos en la proteína después de fijación al DNA deteriorado. Los inventores encontraron que el gen *app* en *Arabidopsis* tenía un nivel de expresión más bien bajo, lo que sugería que la activación transcripcional de este gen podría ser esencial para la función de APP *in vivo*. Para testar esta hipótesis, se estudió la expresión del gen *app* durante la desestabilización del genoma *in vivo* causada por una deficiencia en DNA-ligasa I. Se aisló previamente una mutación por inserción de T-DNA, línea SK1B2, en el gen de DNA-ligasa I de *Arabidopsis* (Babiychuk *et al.*, 1997). La mutación es letal en el estado homocigótico, pero el alelo mutante exhibe una transmisión normal en los gametos. Por esta razón, los inventores esperaban que las células homocigóticas para la mutación murieran debido a una síntesis incompleta del DNA durante la fase S del ciclo celular, poco después de la fertilización del saco embrionario mutante con polen mutante. Se construyó una fusión de traducción promotor *app*-GUS, en la cual la región codificante de GUS estaba fusionada en marco con los cinco primeros aminoácidos de APP y 2 kb de secuencias flanqueantes *app* 5' (SEQ ID No 21). El gen codificante de la proteína de fusión se transformó en *Arabidopsis*. Después de dos retrocruzamientos a un tipo salvaje, las plantas heterocigóticas transformadas con el promotor *app*-GUS se cruzaron con la línea SK1 B2 de *Arabidopsis*. Las inflorescencias de las plantas de control y las plantas heterocigóticas para la mutación de ligasa se teñían por la actividad de GUS. El patrón de tinción GUS detectado principalmente en los tejidos de envejecimiento refleja probablemente la expresión del gen *app*, aunque no se tiene evidencia firme alguna de que la totalidad de las secuencias reguladoras estuvieran presentes en los constructos utilizados. Este patrón era el mismo tanto en las inflorescencias de las plantas de control, que no llevaban el gen mutante de ligasa como en las plantas heterocigóticas para una mutación. Aproximadamente la cuarta parte de los óvulos en las plantas mutantes con la proteína de fusión son GUS-positivos. El examen microscópico más próximo demostró que en los óvulos GUS-positivos únicamente se teñía el gametofito. La única diferencia entre las plantas de control y la planta mutante era una mutación en el gen de DNA-ligasa. Por esta razón, los inventores han llegado a la conclusión de que el gen *app* es inducido, debido o bien a la acumulación de roturas del DNA, o a la muerte de los sacos embrionarios mutantes fertilizados con polen mutante. Se encontró que la tinción GUS de los sacos embrionarios aparece dentro de las 24 horas después de la polinización, o por consiguiente muy pronto después de la fertilización.

## Ejemplo 3

*Construcción de genes quiméricos moduladores de la PCD e introducción de los vectores T-DNA que comprenden tales genes moduladores de la PCD en una cepa de Agrobacterium*

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

Utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, se enlazan operativamente las regiones de DNA siguientes, como se reseña esquemáticamente en la Figura 6 (constructos 1 y 5): Para el gen quimérico p35S:(dsRNA-ZAP)

- una región promotora de CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de ZAP2 en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico p35S:(dsRNA-APP)

- una región promotora de CaMV 35S (Odell *et al.*, 1985)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de APP en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

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

Utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, se enlazan operativamente las regiones de DNA siguientes, como se reseña esquemáticamente en la Figura 6 (constructos 2 y 6): Para el gen quimérico pNOS:(dsRNA-ZAP)

- una región promotora NOS (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de ZAP2 en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico pNOS:(dsRNA-APP)

- una región promotora NOS (Herrera-Estrella *et al.*, 1983)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de APP en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

## 3.3. Construcción de los genes *pTA29:(dsRNA-APP)* y *pTA29:(dsRNA-ZAP)*

Utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, se enlazan operativamente las regiones de DNA siguientes, como se reseña esquemáticamente en la Figura 6 (constructos 3 y 7):

Para el gen quimérico *pTA29:(dsRNA-ZAP)*

- una región promotora TA29 (WO 89/10396)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de ZAP2 en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico *pTA29:(dsRNA-APP)*

- una región promotora TA29 (WO 89/10396)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de APP en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

## 3.4. Construcción de los genes *pNTP303:(dsRNA-APP)* y *pNTP303:(dsRNA-ZAP)*

Utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, se enlazan operativamente las regiones de DNA siguientes, como se reseña esquemáticamente en la Figura 6 (constructos 4 y 8):

Para el gen quimérico *pNTP303:(dsRNA-ZAP)*

- una región promotora NTP303 (Wetering 1994)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de ZAP (aproximadamente completa) (el homólogo de *Arabidopsis thaliana* a SEQ ID No 10, aislado por hibridación)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de ZAP2 en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

Para el gen quimérico *pNTP303:(dsRNA-APP)*

- una región promotora NTP303(Wetering 1994)
- una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP (aproximadamente completa) (SEQ ID No 5)
- aproximadamente 500 pb del extremo 5' de la región de DNA codificante de APP en orientación inversa
- una región extrema 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990)

## 3.5. Construcción de los genes marcadores quiméricos

Utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, se enlazan operativamente las regiones de DNA siguientes, como se reseña esquemáticamente en la Figura 6:

Para el gen marcador *gat*

- una región promotora Act2 (An *et al.*, 1996)
- un DNA codificante de aminoglicosido-6'-acetil-transferasa (WO 94/26913)
- una región del extremo 3' de un gen de nopalina-sintasa (Depicker *et al.*, 1982)

Para el gen marcador *BAR*

- una región promotora Act2 (An *et al.*, 1996)
- un DNA codificante de fosfinotricin-acetil-transferasa (US 5.646.024)
- una región del extremo 3' de un gen de nopalina-sintasa (Depicker *et al.*, 1982)

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

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

## 3.7. Introducción de los vectores T-DNA en *Agrobacterium*

Los vectores T-DNA se introducen en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif(pGV4000) por electroporación como ha sido descrito por Walkerpeach y Velten (1995) y se seleccionan los transformantes utilizando espectinomycin y estreptomycin.

### Ejemplo 4

#### Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium* con los vectores T-DNA del Ejemplo 3

Se utilizan las cepas de *Agrobacterium* para transformar *Arabidopsis thaliana* var.C24 aplicando el método de transformación de las raíces como ha sido descrito por Valvekens *et al.* (1992). Los explantes se coinfectan con las cepas de *Agrobacterium* que contienen respectivamente los constructos dsRNA-APP o dsRNA-ZAP. Los constructos dsRNA-APP se utilizan en combinación con el gen *pact:bar*. Los constructos dsRNA-ZAP se utilizan en combinación con el gen *pact-gat*. Se seleccionan transformantes respecto a resistencia a la fosfinotricina. Las líneas transgénicas regeneradas y enraizadas se testan respecto a la presencia del otro T-DNA por cribado respecto a resistencia a la kanamicina. Las líneas transgénicas que contienen ambos T-DNA's se transfieren al invernadero. Se registra el fenotipo de las líneas transgénicas T0 y las generaciones T1 se estudian ulteriormente con mayor detalle.

### Ejemplo 5

#### Transformación de *Brassica napus* mediada por *Agrobacterium* con los vectores T-DNA del Ejemplo 3

Se utilizan las cepas de *Agrobacterium* para transformar la variedad N90-740 de *Brassica napus* aplicando el método de transformación del hipocótilo esencialmente como ha sido descrito por De Block *et al.* (1989), excepto en lo que respecta a las modificaciones siguientes:

- Se precultivan explantes de hipocótilo durante un día en medio A2 [MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2% de glucosa, 0,5% de agarosa, 1 mg/l de 2,4-D, 0,25 mg/l de ácido naftalenoacético (NAA) y 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP)].
- El medio de infección A3 es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2% de glucosa, 0,1 mg/l de NAA, 0,75 mg/l de BAP y 0,01 mg/l de ácido gibberélico (GA3).

## ES 2 317 698 T3

- El medio de selección A5G es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 1,2% de glucosa, 40 mg/l de adenina.SO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de polivinilpirrolidona (PVP), 0,5% de agarosa, 0,1 mg/l de NAA, 0,75 mg/l de BAP, 0,01 mg/l de GA3, 250 mg/l de carbenicilina, 350 mg/l de triacilina, 5 mg/l de AgNO<sub>3</sub> durante 3 semanas. Después de este periodo, se continúa la selección en medio A5J (similar a A5G pero con 3% de sacarosa)
- El medio de regeneración A6 es MS, 0,5 g/l de Mes (pH 5,7), 2% de sacarosa, 40 mg/l de adenina.SO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de PVP, 0,5% agarosa, 0,0025 mg/l de BAP y 250 mg/l de triacilina.
- Se transfieren brotes sanos a un medio de enraizado que era A9: MS semiconcentrado, 1,5% de sacarosa (pH 5,8), 100 mg/l de triacilina, 0,6% de agar en recipientes de 1 litro. MS significa medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962).

Para la introducción de ambos constructos dsRNA-APP y dsRNA-ZAP de T-DNA en una misma célula vegetal, se aplica el método de co-transformación, especialmente como ha sido descrito por De Block y Debrouwer (1991). Se seleccionan líneas de plantas transformadas en un medio que contiene fosfinotricina, después de lo cual se escruta la presencia del segundo T-DNA por testado de los brotes enraizados regenerados respecto a resistencia a la kanamicina. En los experimentos de co-transformación, se utilizan los constructos dsRNA-APP en combinación con el gen *pact:bar*. Los constructos dsRNA-ZAP se utilizan en combinación con el gen *pact-gat*. Las líneas transgénicas que contienen ambos T-DNA's se transfieren al invernadero. Se registra El fenotipo de las líneas transgénicas T0 y las generaciones T1 se estudian ulteriormente con mayor detalle.

### Ejemplo 6

*Ensayo in vitro para testar el vigor de las líneas de plantas*

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

##### *Medios y tampones de reacción*

Medio de siembra:

Sales de Murashige y Skoog semiconcentradas

2% de sacarosa

pH 5,8

0,6% de agar

Medio de inducción de callo: A2S

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

Medio de incubación:

Tampón de fosfato K 25 mM, pH 5,8

Sacarosa al 2%

1 gota de Tween 20 para 25 ml de medio

Tampón de reacción:

Tampón de fosfato K 50 mM, pH 7,4

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

1 gota de Tween 20 para 25 ml de tampón

## ES 2 317 698 T3

### *Esterilización de las semillas y crecimiento de las plantas jóvenes*

Se empapan las semillas en etanol al 70% durante 2 min, se esterilizan luego superficialmente durante 15 min en una solución de hipoclorito de sodio (con aproximadamente 6% de cloro activo) que contiene 0,1% de Tween 20. Finalmente, se lavan las semillas con 1 l de agua destilada estéril. Se ponen 7 semillas/recipiente de 1 l (Weck) que contiene aproximadamente 75 ml de medio de siembra. Se dejan germinar las semillas a 23°C y 30  $\mu\text{Einstein/s}^{-1}\text{m}^{-2}$  con un período de luz de 16 h.

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

### *Precultivo de los explantes de hipocótilo*

- 12-14 días después de la siembra, se cortan los hipocótilos en segmentos de aproximadamente 7 mm.
- Los explantes de hipocótilos se cultivan durante 4 días en medio A2S a 23-25°C (a 30  $\mu\text{Einstein/s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).  
☐ P.S.: son necesarios aproximadamente 150-300 explantes de hipocótilo/línea para la realización del ensayo
- Se transfieren los explantes de hipocótilos a cápsulas Petri Optilux (Falcon S1005) que contienen 30 ml de medio de incubación.
- Se incuba durante aproximadamente 20 horas a 24°C en la oscuridad.

### *Ensayo TTC*

- Se transfieren 150 explantes de hipocótilo a un tubo Falcon de 50 ml.
- Se lava con tampón de reacción (sin TTC).
- Se añaden 25 ml-30 ml de tampón de reacción/tubo.  
☐ no se añadió cantidad alguna de TTC al tubo 1.  
\* para la medida de la absorción de fondo  
\* es suficiente una línea/experimento
- Tubo 2 ☐ + TTC 10 mM  
(los explantes tienen que estar sumergidos, pero no se infiltran a vacío!)
- Se invierten los tubos
- Se incuba durante aproximadamente 1 hora en la oscuridad a 26°C (la reacción no termina!)
- Se lavan los hipocótilos con agua desionizada
- Se elimina el agua
- Se congela a -70°C durante 30 min
- Se descongela a la temperatura ambiente (en la oscuridad)
- Se añaden 50 ml de etanol (industrial)
- Se extrae el TTC-H reducido por agitación mediante sacudidas durante 1 hora
- Se miden las absorciones de los extractos a 485 nm
- P.S.: el TTC-H reducido no es estable ☐ se mantiene en la oscuridad y se mide D.O.<sub>485</sub> lo antes posible

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

## ES 2 317 698 T3

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

### 6.2. Ensayo de aptitud de *Arabidopsis*

#### *Medios y tampones de reacción*

Medio de plantas: sales de Murashige y Skoog semiconcentradas

Sacarosa al 1,5%

pH 5,8

Agar al 0,6%

→ Autoclave 15 min.

Se añade 100 mg/l de mio-inositol esterilizado por filtración

- 0,5 mg/l de piridoxina
- 0,5 mg/l de ácido nicotínico
- 1 mg/l de tiamina

Medio de incubación:

Tampón de fosfato K 10 mM, pH 5,8

Sacarosa al 2%

1 gota de Tween 20 para 25 ml de medio

Tampón de reacción:

Tampón de fosfato K 50 mM, pH 7,4

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

1 gota de Tween 20 por 25 ml de tampón

#### *Plantas de Arabidopsis*

- Esterilización de las semillas de *Arabidopsis*

2 min en etanol al 70%

10 min de lejía (6% de cloro activo) + 1 gota de Tween 20 para 20 ml de solución, lavado 5 veces con agua estéril

P.S.: la esterilización se realiza en tubos Eppendorf de 2 ml, con las semillas de *Arabidopsis* sumergidas en el fondo del tubo, permitiendo la eliminación de los líquidos por medio de una pipeta de 1 ml

- Cultivo de las plantas de *Arabidopsis*

Las semillas se siembran en “discos de Cultivo de Tejidos Intergrid de Falcon” (nº 3025) que contienen ±100 ml de medio vegetal (una semilla/cuadrícula).

## ES 2 317 698 T3

Las plantas se cultivan a 23°C

40  $\mu\text{Einstein s}^{-1}\text{m}^{-2}$

16 horas luz-8 horas oscuridad

durante aproximadamente 3 semanas (las plantas comienzan a formar capullos)

→ P.S.: \* se necesitan aproximadamente 90-110 plantas/línea para llevar a cabo el ensayo

\* Se incluye una línea de control (C24; Columbia; ...) para calibración.

### Preincubación

- Se cosechan los brotes de *Arabidopsis* por corte de las raíces (mediante tijeras). Se pone cada brote inmediatamente en medio de incubación (los brotes tienen que estar sumergidos, pero sin infiltración a vacío)

Medio de incubación:  $\pm 150$  ml en “discos de Cultivo de Tejidos Intergrid de Falcon” (n° 3025)

- a) Medio de incubación: para cuantificación de la absorción del sustrato (véase el ensayo TTC)
- b) Medio de incubación
- c) Medio de incubación + niacinamida 2 mM

30-35 brotes/cápsula Petri (pero la misma cantidad de brotes para todas las líneas y para cada condición)

- Se incuba a 24°C en la oscuridad durante  $\pm 20$  horas.

### Ensayo TTC

- Se transfieren los brotes a tubos Falcon de 50 ml

- Se lava con tampón de reacción (sin TTC)

- Se añaden 30-35 ml de tampón de reacción/tubo

a) sin TTC añadida (para medida de la absorción de fondo)

b y c) +TTC 10 mM

(los brotes tienen que estar sumergidos, pero sin infiltración a vacío!)

- Se incuban durante aproximadamente 2 horas en la oscuridad a 26°C (sin terminar la reacción!)

- Se lavan los brotes con agua desionizada

- Se elimina el agua

- Se congela a -70°C durante 30 min

- Se descongela a la temperatura ambiente (en la oscuridad)

- Se añaden 50 ml de etanol (industrial)

- Se extrae el TTC-H reducido por agitación mediante sacudidas durante 1 hora

- Se miden las absorciones de los extractos a 485 nm

P.S.: el TTC-H reducido no es estable → mantener en la oscuridad y medir D.O.<sub>485</sub> lo antes posible

- Se comparan los perfiles de reducción de las líneas testadas frente a la línea de control (para población de 30 a 35 plantas)

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

## ES 2 317 698 T3

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

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

- Si la adición de niacinamida al medio de incubación da como resultado una mayor capacidad de reducción de TTC, ello indica una aptitud menor (como se muestra para C24 y Columbia)

### Ejemplo 7

#### *Análisis fenotípicos de las líneas transgénicas que contienen a la vez los constructos dsRNA-APP y dsRNA-ZAP*

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

La semilla T1 se deja germinar sobre medio que contiene kanamicina, después de lo cual las plantas resistentes se registran por medio del ensayo de multipocillos de amonio para resistencia a la fosfotricina (De Block *et al.*, 1995). Una mitad de las plantas que contiene ambos T-DNA's se transfiere al invernadero para registrar la fertilidad masculina de las plantas, mientras que la otra mitad se utiliza para cuantificar el vigor de las plantas por medio del ensayo de aptitud.

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

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

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

### Ejemplo 8

#### *Análisis fenotípico de plantas que comprenden un gen quimérico modulador de la PCD*

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico p35S::(dsRNA-ZAP) utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, enlazando operativamente las regiones de DNA siguientes:

- una región promotora CaMV35S2 (Odell *et al.*, 1985)
- un DNA codificante de una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de ZAP2 de *Zea mays* desde el sitio HincII al sitio SnaBI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 desde el nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 1728
- el extremo 5' de la región codificante de ZAP2 desde el sitio HincII al sitio EcoRV en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 desde el nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 792)
- una región del extremo 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990).

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

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico pNos::(dsRNA-ZAP) utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, por enlace operativo de las regiones de DNA siguientes:

- una región promotora de nopalina-sintasa (Herrera-Estrella *et al.*, 1985)
- un DNA codificante de una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)

## ES 2 317 698 T3

- una región de DNA codificante de ZAP2 de *Zea mays* desde el sitio HincII al sitio SnaBI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 desde el nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 1728
- el extremo 5' de la región codificante de ZAP2 desde el sitio HincII al sitio EcoRV en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 10 desde el nucleótido de la posición 279 al nucleótido de la posición 792)
- una región del extremo 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990).

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

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico p35S::(dsRNA-APP) utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, por enlace operativo de las regiones de DNA siguientes:

- una región promotora CaMV35S2 (Odell *et al.*, 1985)
- un DNA codificante de una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP de *Arabidopsis thaliana* desde el sitio ScaI al sitio SmaI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 desde el nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 1349
- el extremo 5' de la región codificante de ZAP2 desde el sitio ScaI al sitio HaeIII en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 desde el nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 784)
- una región del extremo 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990).

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

Se construyó otro ejemplo de un gen quimérico pNos::(dsRNA-APP) utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante, por enlace operativo de las regiones de DNA siguientes:

- una región promotora de nopalina-sintasa (Herrera-Estrella *et al.*, 1985)
- un DNA codificante de una región conductora Cab 22 (Harpster *et al.*, 1988)
- una región de DNA codificante de APP de *Arabidopsis thaliana* desde el sitio ScaI al sitio SmaBI que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 desde el nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 1349
- el extremo 5' de la región codificante de ZAP2 desde el sitio ScaI al sitio HaeIII en orientación inversa (que tiene el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No 5 desde el nucleótido de la posición 189 al nucleótido de la posición 784)
- una región del extremo 3' de CaMV35S (Mogen *et al.*, 1990).

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

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

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

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

La tolerancia al estrés de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* T1 (derivadas de Columbia) se evaluó dejando en flotación pequeñas plantas sobre una solución de ácido salicílico de 10 ó 50 mg/l o, para control, simplemente sobre

agua. Las plantas sensibles al estrés desarrollaban hojas blanqueadas y retorcidas al cabo de 1 a 2 días de incubación, mientras que las plantas tolerantes al estrés se mantenían intactas durante al menos 5 días. Nuevamente, las plantas transgénicas que comprendían un constructo pNOS::(dsRNA-ZAP) como en pTYG33 o un constructo p35S::(dsRNA-ZAP) como en pTYG34, eran significativamente más tolerantes al estrés que las plantas transgénicas de control (véase Tabla 1).

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

TABLA 1

*Evaluación de plantas transgénicas de Arabidopsis (generación T1)*

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

TABLA 2

*Recrecimiento de los callos de Brassica transgénica después de incubación en aspirina*

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

## Referencias

- Alexander (1969) *Stain Technology* 44, 117
- Alvarez-Gonzalez and Althaus (1989) *Mut. Res.* 218, 67-74
- An et al. (1996) *The Plant Cell* 8, 15-30
- An et al. (1996b) *Plant Journal* 10, 107-121

**Ausubel et al.** (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA.

**Ausubel et al.** (1987) *Current Protocols in Molecular Biology* 1987-1988. New York: Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience

**Babiychuk et al** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12722-12727

**Beeckman and Engler** (1994) *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, 37-42.

**Chen et al.** (1994) *Eur. J. Biochem* 224, 135-142

**Citovsky et al.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3210-3214.

**Cohen** (1993) *Immunol. Today* 14, 126-130

**Collinge and Althaus** (1994) *Mol. Gen. Genet.* 245, 686-693

**Croy** (1993) *Plant Molecular Biology Labfax* jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK.

**Cullin and Pompon** (1988) *Gene*, 65, 203-217

De **Block et al.** (1987) *EMBO J.* 6, 2513-2518

De **Block et al.** (1989) *Plant Physiol.* 91: 694

De **Block and Debrouwer** (1991) *Theor. Appl. Genet* 82, 257-263

De **Block et al.** (1995) *Planta* 197, 619-626

de **Murcia and Ménissier de Murcia** (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 172-176.

**Deblaere et al.** (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 4777-4788

**Depicker et al.** (1982) *J. Mol. App. Gen.* 1, 561-573

**Ding et al.** (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12804-12812

**Dohmen et al.** (1991) *Yeast*, 7, 691-692

**Doonan et al.** (1998) in "Plant Cell Division" (Francis, Duditz and Inzé, Eds.) *Portland Press*, London

**Ellis et al.** (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7, 663-698

**Gallie and Walbot** (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 4631-4638

**Gatz et al.** (1988) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 85, 1394-1397

**Gavrieli et al.** (1992) *J. Cell. Biol.* 119, 493-501 Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*

**Harpster et al.** (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212, 182-190.

**Hawkins and Phillips** (1983) *Plant Sci. Lett.* 32, 221-224

**Heller et al.** (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11176-11180

**Herrera-Estrella et al.** (1983) *EMBO J.* 2, 987

**Hudspeth et al.** (1989) *Plant Mol Biol* 12, 579-589

**Hurkman and Tanaka** (1986) *Plant Physiol.* 81, 802-806

**Ikajima et al.** (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 21907-21913

**Jefferson et al.** (1987) *EMBO J.* 6, 3901-3907

**Kameshita et al.** (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4770-4776

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

**Wang et al.** (1995) *Genes Dev.* 9, 509-520

**Wang et al.** (1996) *Plant Cell* 8, 375-391

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

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

10 **Wetering** (1994) PhD thesis, Katholieke Universiteit Nijmegen

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

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

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

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

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Un método para producir una planta tolerante al estrés, comprendiendo dicho método introducir un gen quimérico en células de dicha planta para obtener células de plantas transgénicas, en donde dicho gen quimérico comprende las regiones de DNA siguientes enlazadas operativamente:

- (a) un promotor expresable en plantas;
- 10 (b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA, siendo dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa, en donde dicha molécula de RNA comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos que tiene 75 a 100% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa o el complemento del mismo; y
- 15 (c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación; y regenerar una planta a partir de dichas células de plantas transgénicas.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho estrés se selecciona de estrés por frío, estrés por sequía o estrés por calor.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho gen quimérico comprende las regiones de DNA siguientes enlazadas operativamente:

- 25 a) un promotor expresable en plantas;
- b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA, siendo dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa en donde dicha molécula de RNA comprende
  - 30 i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de dicha planta; y
  - 35 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos de dicho gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de dicha planta;

40 siendo dicha secuencia nucleotídica de sentido y dicha secuencia nucleotídica antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario, y

- c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

45 4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho gen quimérico comprende las regiones de DNA siguientes enlazadas operativamente:

- a) un promotor expresable en plantas;
- 50 b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA, siendo dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa en donde dicha molécula de RNA comprende
  - 55 i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto a una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11; y
  - 60 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11,
  - 65

siendo dicha secuencia de nucleótidos de sentido y dicha secuencia de nucleótidos antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario; y

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

5 5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa comprende

10 i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 3; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 5 y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 10; y

15 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 3; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 5 y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 10, siendo dicha secuencia de nucleótidos de sentido y dicha secuencia de nucleótidos antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario.

20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho promotor expresable en plantas es un promotor constitutivo.

25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente el paso de producir más plantas que comprenden dicho gen quimérico por un esquema de reproducción convencional.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha planta se selecciona del grupo constituido por maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verduras crucíferas, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavellina, rosa, crisantemo y tulipán.

30 9. Una planta transgénica que exhibe tolerancia incrementada al estrés cuando se compara con una planta de control, comprendiendo dicha planta transgénica en sus células un gen quimérico que comprende las regiones de DNA siguientes enlazadas operativamente:

35 a) un promotor expresable en plantas;

b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA, siendo dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa en donde dicha molécula de RNA comprende

40 i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa de dicha planta; y

45 ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos de un gen endógeno codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa, siendo dicha secuencia nucleotídica y dicha secuencia de nucleótidos antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario; y

50 c) una región de DNA implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación.

10. La planta transgénica de la reivindicación 9, en donde dicho gen quimérico comprende las regiones de DNA siguientes, enlazadas operativamente:

55 a) un promotor expresable en plantas;

60 b) una región de DNA, que cuando se transcribe produce una molécula de RNA, siendo dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa en donde dicha molécula de RNA comprende

65 iii) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11; y

iv) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6 y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 11, siendo dicha secuencia de nucleótidos de sentido y dicha secuencia de nucleótidos antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario; y

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

11. La planta transgénica de la reivindicación 10, en donde dicha molécula de RNA capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa comprende

i) una secuencia de nucleótidos de sentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 3; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 5 y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 10; y

ii) una secuencia de nucleótidos antisentido que comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos con 75% a 100% de identidad de secuencia respecto al complemento de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 1, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 3; la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 5 y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No: 10,

siendo dicha secuencia de nucleótidos de sentido y dicha secuencia de nucleótidos antisentido capaces de combinarse en una región de RNA bicatenario.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicho promotor expresable en plantas es un promotor constitutivo.

13. La planta transgénica de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicha planta se selecciona del grupo constituido por maíz, colza oleaginosa, lino, trigo, césped, alfalfa, leguminosas, verdura crucífera, tomate, lechuga, algodón, arroz, cebada, patata, tabaco, remolacha azucarera, girasol, clavellina, rosa, crisantemo, y tulipán.

14. Una semilla de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende dicho gen quimérico.

15. Uso de una secuencia de nucleótidos de un gen vegetal codificante de poli(ADP-ribosa)-polimerasa o el complemento del mismo para producir una planta tolerante al estrés, por introducción de dicha secuencia de nucleótidos en células de dicha planta, **caracterizado** porque dicha secuencia de nucleótidos o su complemento comprende una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos que tiene 75% a 100% de identidad de secuencia con una secuencia nucleotídica de 100 nucleótidos de un gen PARP endógeno de dicha planta y es capaz de reducir la expresión de genes endógenos codificantes de poli(ADP-ribosa)-polimerasa.

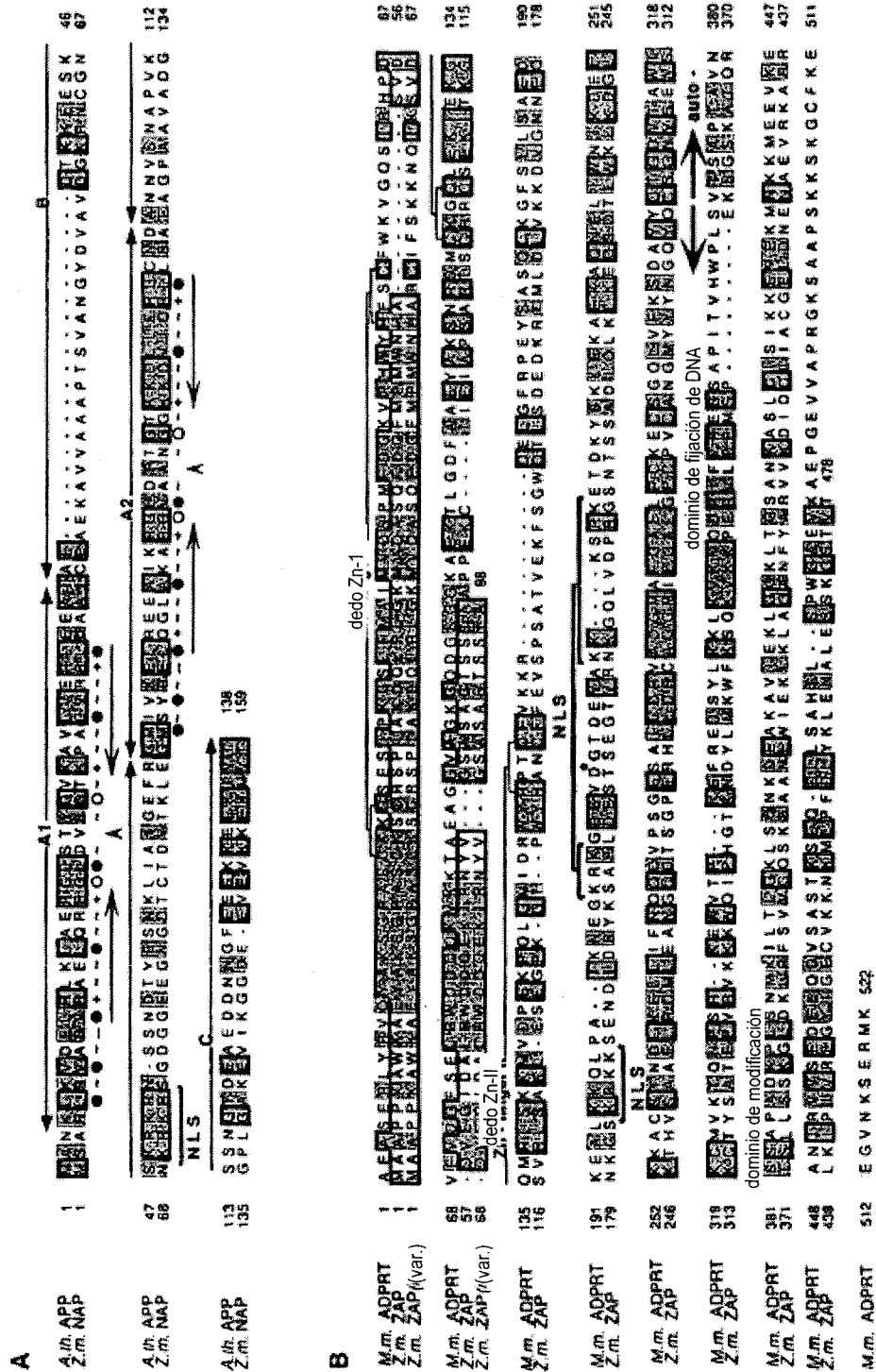


Figura 1

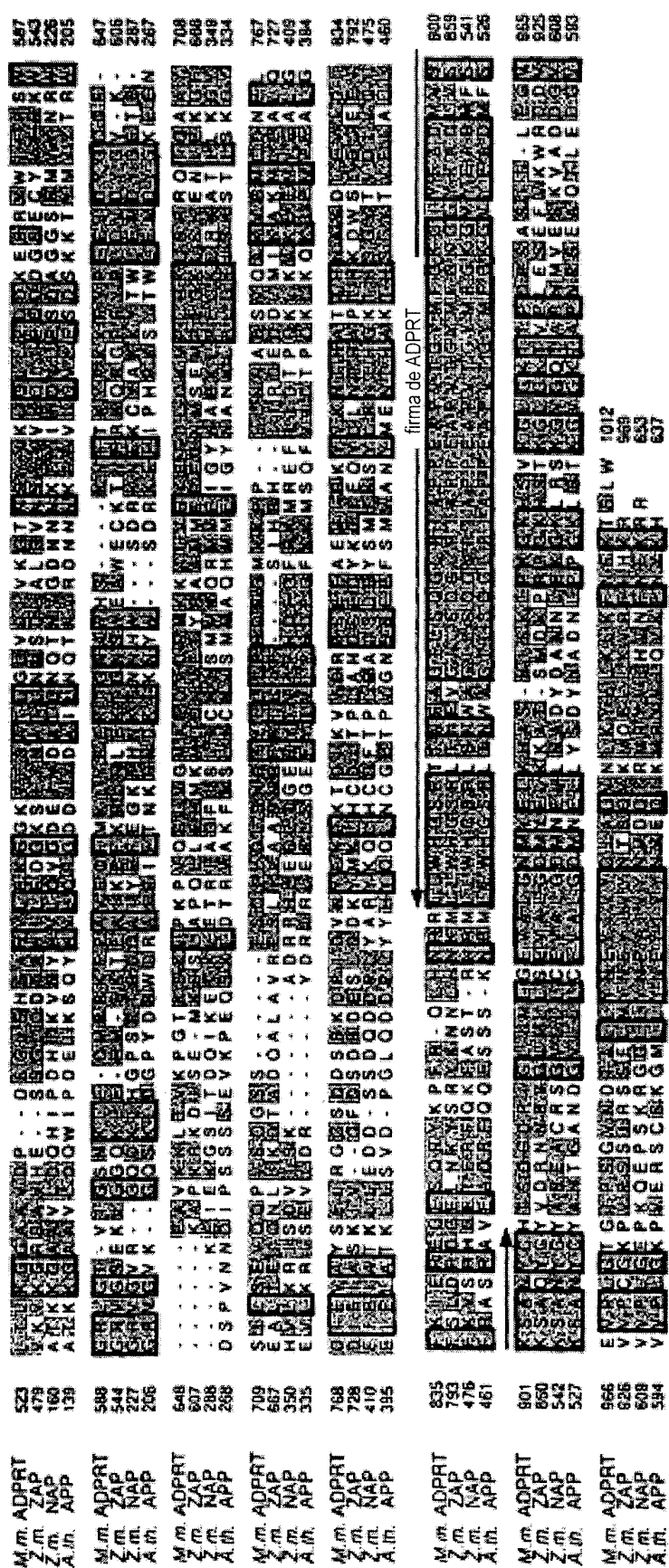


Figura 2

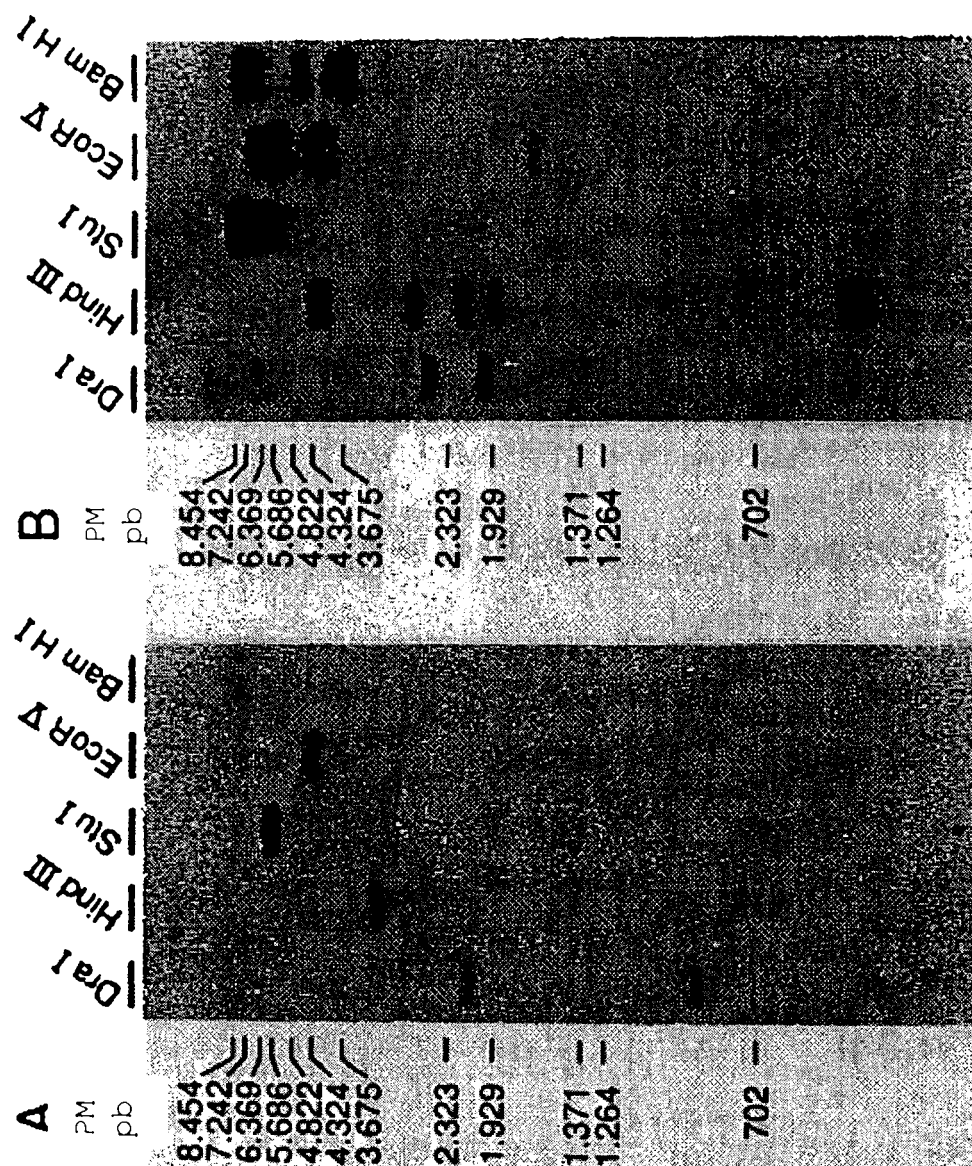


Figura 3

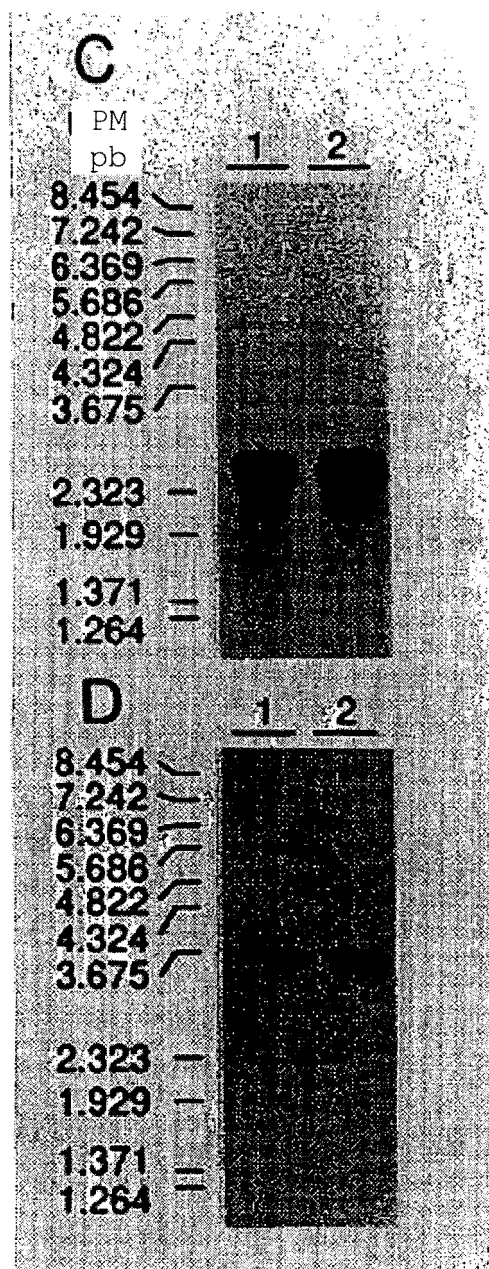
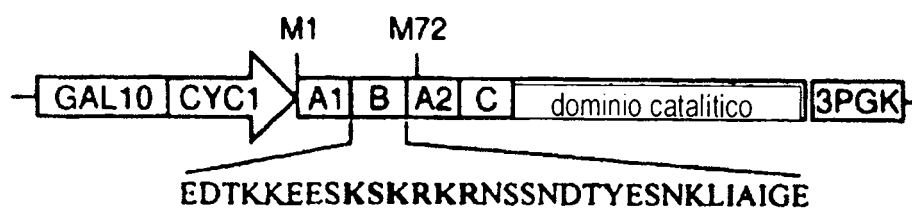


Figura 3, continuación

**A**



**B**

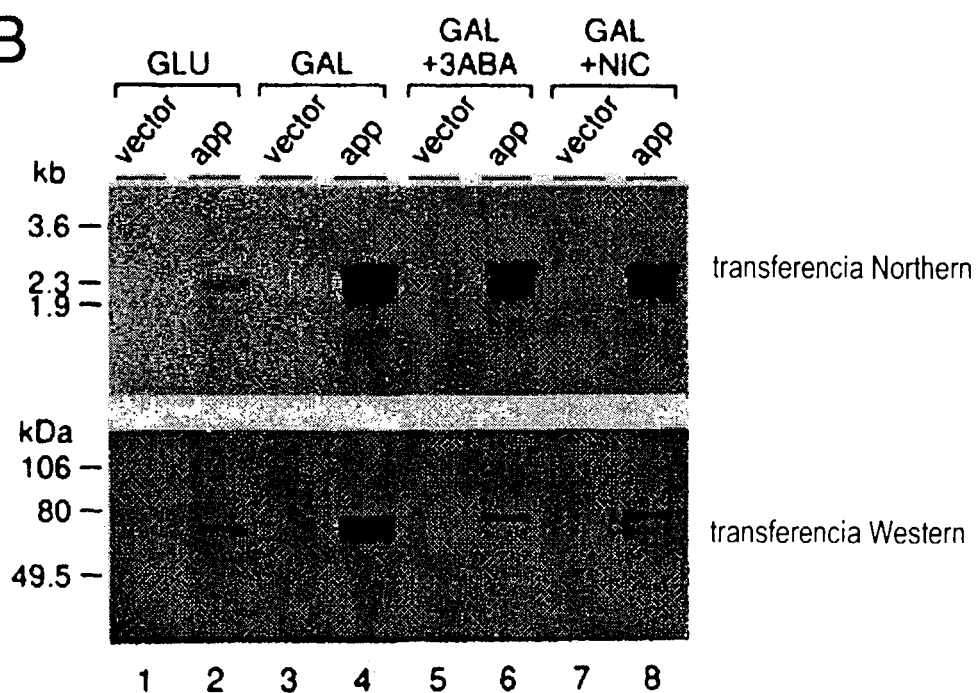


Figura 4



Figura 5

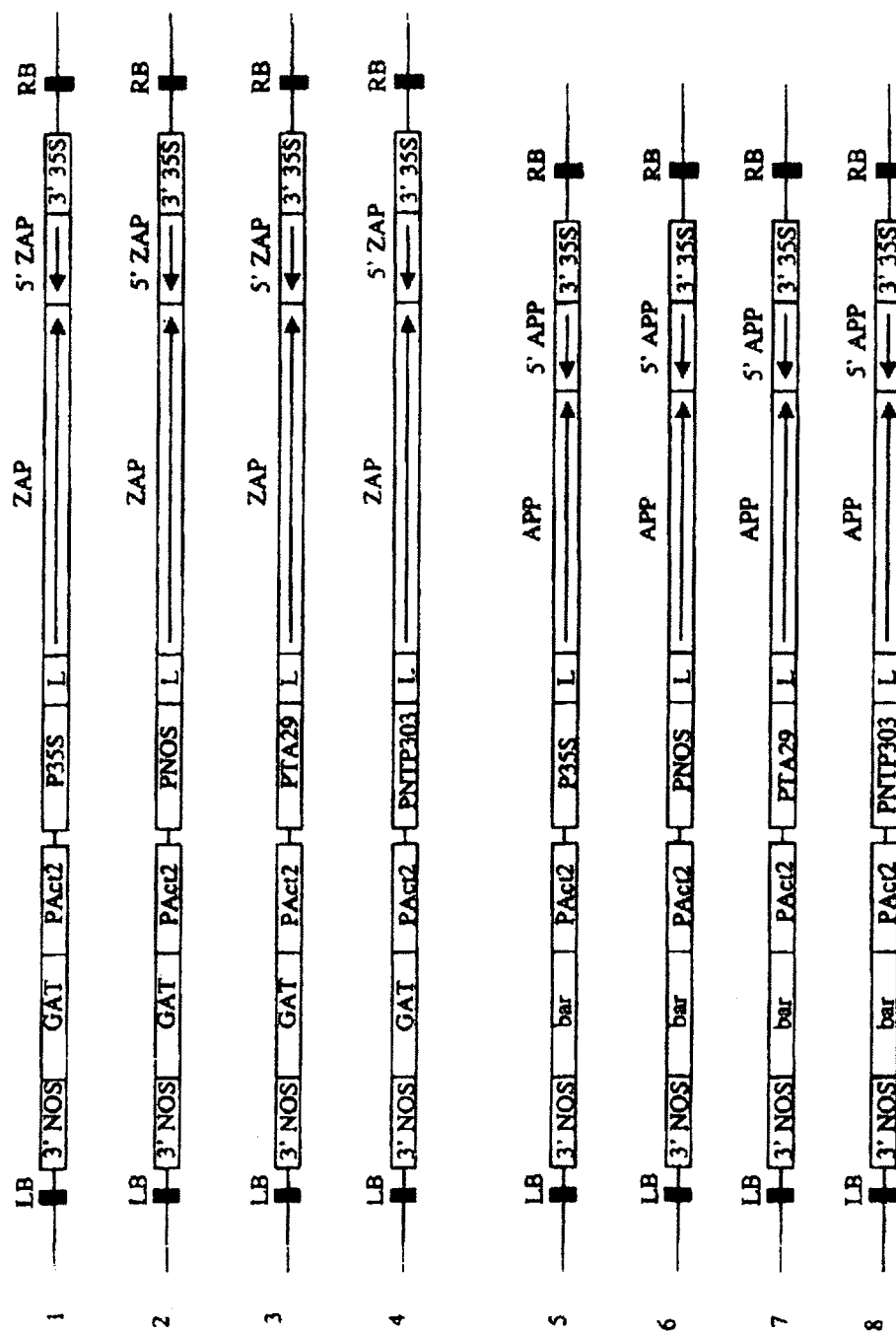


Figura 6

# ES 2 317 698 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Plant Genetic Systems, X.V.

5 <120> Métodos y medios para modular la muerte celular programada en células eucariotas

<130> PCDMOD WO1

10 <140>

<141>

<150> US SN 09/118276

15 <151> 1998-07-17

<160>

20 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3211

25 <212> DNA

<213> *Zea mays*

<220>

30 <221> CDS

<222> (113)..(3022)

<400> 1

35

acctacctga ataccgcac cctaagtggt ccgcttcttc tgcgctccgg cctccaaactc 60

40

catcgaaggg gctacggaga ggaggggaacc cgaaccacag caggccggcg ca atg gcg 118  
Met Ala  
1

45

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

50

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

55

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

60

aac cat gcc agc gtt gac gat gtt gaa ggg atc gat gca ctc aga cgg 310

65

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                                                                                    |     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | Asn His Ala Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu Arg Trp                                                                    |     |
|    | 55 60 65                                                                                                                           |     |
| 5  | gat gat caa gag aag ata cga aac tac gtt ggg agt gcc tca gct ggt<br>Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser Ala Gly | 358 |
|    | 70 75 80                                                                                                                           |     |
| 10 | aca agt tct aca gct gct cct cct gag aaa tgt aca att gag att gct<br>Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu Ile Ala | 406 |
|    | 85 90 95                                                                                                                           |     |
| 15 | cca tct gcc cgt act tca tgt aca cga tgc agt gaa aag att aca aaa<br>Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile Thr Lys | 454 |
|    | 100 105 110                                                                                                                        |     |
| 20 | gga tcg gtc cgt ctt tca gct aaq ctt gag agt gaa ggt ccc aag ggt<br>Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro Lys Gly | 502 |
|    | 115 120 125 130                                                                                                                    |     |
| 25 | ata cca tgg tat tat gcc aac tgt ttc ttc gag gta tcc ccg tct gca<br>Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro Ser Ala | 550 |
|    | 135 140 145                                                                                                                        |     |
| 30 | act gtt gag aag ttc tca gcc tgg gat act ttc tcc gat gag gat aag<br>Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu Asp Lys | 598 |
|    | 150 155 160                                                                                                                        |     |
| 35 | aga acc atg ctc gat ctt gtt aaa aaa gat gtt ggc aac aat gaa caa<br>Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn Glu Gln | 646 |
|    | 165 170 175                                                                                                                        |     |
| 40 | aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat agc tac<br>Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp Ser Tyr | 694 |
|    | 180 185 190                                                                                                                        |     |
| 45 | aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg cga aac<br>Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val Arg Asn | 742 |
|    | 195 200 205 210                                                                                                                    |     |
| 50 | aaa ggg caa ctc tta gat cca cgt ggt tcc aat act agt tca gct gat<br>Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser Ala Asp | 790 |
|    | 215 220 225                                                                                                                        |     |
| 55 | atc caa cta aag ttc aag gag caa agt gat aca ctt tgg aag tta aag<br>Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys Leu Lys | 838 |
|    | 230 235 240                                                                                                                        |     |
| 60 | gat gga ctt aag att cat gta tcc gct gct gaa tta agg gat atg ctc                                                                    | 886 |
| 65 |                                                                                                                                    |     |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                                                                                    |      |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp Met Leu                                                                    |      |
|    | 245 250 255                                                                                                                        |      |
| 5  | gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta ttg gat<br>Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu Leu Asp | 934  |
|    | 260 265 270                                                                                                                        |      |
| 10 | cgc tgt gcg gat gga atg ata tct gga gcg ctg ggt cct tgc cca gtc<br>Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys Pro Val | 982  |
|    | 275 280 285 290                                                                                                                    |      |
| 15 | tgt gct aat ggc atg tac cat tat aat ggt cag tac caa tgc agt ggt<br>Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys Ser Gly | 1030 |
|    | 295 300 305                                                                                                                        |      |
| 20 | aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa cct gtc<br>Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Pro Val | 1078 |
|    | 310 315 320                                                                                                                        |      |
| 25 | cgc gtt aag aag aag tgg caa att cca cat gga aca aag aat gat tac<br>Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr | 1126 |
|    | 325 330 335                                                                                                                        |      |
| 30 | ctt atg aag tgg ttc aaa tct caa aag gct aag aaa cca gag agg gtt<br>Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val | 1174 |
|    | 340 345 350                                                                                                                        |      |
| 35 | ctt cca cca atg tca cct gag aaa tct gga agt aaa gca act cag aga<br>Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg | 1222 |
|    | 355 360 365 370                                                                                                                    |      |
| 40 | aca tca ttg ctg tcc tct aaa ggg ttg gat aaa tta agg ttc tct gtt<br>Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val | 1270 |
|    | 375 380 385                                                                                                                        |      |
| 45 | gta gga caa tca aaa gaa gca gca aat gag tgg att gag aag ctc aaa<br>Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys | 1318 |
|    | 390 395 400                                                                                                                        |      |
| 50 | ctt gct ggt gcc aac ttc tat gcc agg gtt gtc aaa gat att gat tgt<br>Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys | 1366 |
|    | 405 410 415                                                                                                                        |      |
| 55 | cta att gca tgt ggt gag ctc gac aat gaa aat gct gaa gtc agg aaa<br>Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys | 1414 |
|    | 420 425 430                                                                                                                        |      |
| 60 | gca agg agg ctg aag ata cca att gta agg gag ggt tac att gga gaa                                                                    | 1462 |
| 65 |                                                                                                                                    |      |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile Gly Glu |      |
|    | 435 440 445 450                                                 |      |
| 5  | tgt gtt aaa aag aac aaa atg ctg cca ttt gat ttg tat aaa cta gag | 1510 |
|    | Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys Leu Glu |      |
|    | 455 460 465                                                     |      |
| 10 | aat gcc tta gag tcc tca aaa ggc agt act gtc act gtt aaa gtt aag | 1558 |
|    | Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys Val Lys |      |
|    | 470 475 480                                                     |      |
| 15 | ggc cga agt gct gct cat gag tcc tct ggt ttg caa gat act gct cac | 1606 |
|    | Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr Ala His |      |
|    | 485 490 495                                                     |      |
| 20 | att ctt gaa gat ggg aaa agc ata tac aat gca acc tta aac atg tct | 1654 |
|    | Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn Met Ser |      |
|    | 500 505 510                                                     |      |
| 25 | gac ctg gca cta ggt gtg aac agc tac tat gta ctc cag atc att gaa | 1702 |
|    | Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile Ile Glu |      |
|    | 515 520 525 530                                                 |      |
| 30 | cag gat gat ggg tct gag tgc tac gta ttt cgt aag tgg gga cgg gtt | 1750 |
|    | Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly Arg Val |      |
|    | 535 540 545                                                     |      |
| 35 | ggg agt gag aaa att gga ggg caa aaa ctg gag gag atg tca aaa act | 1798 |
|    | Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser Lys Thr |      |
|    | 550 555 560                                                     |      |
| 40 | gag gca atc aag gaa ttc aaa aga tta ttt ctt gag aag act gga aac | 1846 |
|    | Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr Gly Asn |      |
|    | 565 570 575                                                     |      |
| 45 | tca tgg gaa gct tgg gaa tgt aaa acc aat ttt cgg aag cag cct ggg | 1894 |
|    | Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln Pro Gly |      |
|    | 580 585 590                                                     |      |
| 50 | aga ttt tac cca cct gat gtt gat tat ggt gtt aag aaa gca cca aaa | 1942 |
|    | Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala Pro Lys |      |
|    | 595 600 605 610                                                 |      |
| 55 | cgg aaa gat atc agt gaa atg aaa agt tct ctt gct cct caa ttg cta | 1990 |
|    | Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln Leu Leu |      |
|    | 615 620 625                                                     |      |
| 60 | gaa ctc atg aag atg ctt ttc aat gtg gag aca tat aga gct gct atg | 2038 |
| 65 |                                                                 |      |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met |      |
|    | 630 635 640                                                     |      |
| 5  | atg gaa ttc gaa att aat atg tca gaa atg cct ctt ggg aag cta agc | 2086 |
|    | Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser |      |
|    | 645 650 655                                                     |      |
| 10 | aag gaa aat att gag aaa gga ttc gaa gca cta act gag ata cag aat | 2134 |
|    | Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn |      |
|    | 660 665 670                                                     |      |
| 15 | tta ttg aag gac acc gct gat caa gca ctg gct gtt aga gaa agc tta | 2182 |
|    | Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu |      |
|    | 675 680 685 690                                                 |      |
| 20 | att gtt gct gcg agc aat cgc ttt ttc act ctt atc cct tct att cat | 2230 |
|    | Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His |      |
|    | 695 700 705                                                     |      |
| 25 | cct cat att ata cgg gat gag gat gat ttg atg atc aaa gcg aaa atg | 2278 |
|    | Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met |      |
|    | 710 715 720                                                     |      |
| 30 | ctt gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt gcc ttc | 2326 |
|    | Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe |      |
|    | 725 730 735                                                     |      |
| 35 | gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tat atg aaa ctt cac | 2374 |
|    | Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His |      |
|    | 740 745 750                                                     |      |
| 40 | tgt gac atc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tac aag cta att | 2422 |
|    | Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile |      |
|    | 755 760 765 770                                                 |      |
| 45 | gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct acc cac aag gac tgg tgg | 2470 |
|    | Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser |      |
|    | 775 780 785                                                     |      |
| 50 | ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca ctt gat cga gat gga gaa ctt aat | 2518 |
|    | Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn |      |
|    | 790 795 800                                                     |      |
| 55 | aag tac tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta cta tgg | 2566 |
|    | Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp |      |
|    | 805 810 815                                                     |      |
| 60 | cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gtg gga att ctt agt caa ggg cta | 2614 |
| 65 |                                                                 |      |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu    |      |
|    | 820 825 830                                                        |      |
| 5  | aga att gca cct cct gag gca cct gtt act ggc tat atg ttc ggc aaa    | 2662 |
|    | Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys    |      |
|    | 835 840 845 850                                                    |      |
| 10 | ggc ctc tac ttt gca gat cta gca agc aag agc gca caa tac tgt tat    | 2710 |
|    | Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr Cys Tyr    |      |
|    | 855 860 865                                                        |      |
| 15 | gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tct gag gtt gct    | 2758 |
|    | Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala    |      |
|    | 870 875 880                                                        |      |
| 20 | tca gga gac atg tat gaa cta aag aaa gcc acg tcc atg gac aaa cct    | 2806 |
|    | Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro    |      |
|    | 885 890 895                                                        |      |
| 25 | cca aga ggg aag cat tcg acc aag gga tta ggc aaa acc gtg cca ctg    | 2854 |
|    | Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu    |      |
|    | 900 905 910                                                        |      |
| 30 | gag tca gag ttt gtg aag tgg agg gat gat gtc gta gtt ccc tgc ggc    | 2902 |
|    | Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly    |      |
|    | 915 920 925 930                                                    |      |
| 35 | aag ccg gtg cca tca tca att agg agc cct gaa ctc atg tac aat gag    | 2950 |
|    | Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu    |      |
|    | 935 940 945                                                        |      |
| 40 | tac atc gtc tac aac aca tcc cag gtg aag atg cag ttc ttg ctg aag    | 2998 |
|    | Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys    |      |
|    | 950 955 960                                                        |      |
| 45 | gtg cgt ttc cac cac aag agg tag ctgggagact aggcgaagtag agtcggaagg  | 3052 |
|    | Val Arg Phe His His Lys Arg                                        |      |
|    | 965 970                                                            |      |
| 50 | tagagaagca gaggtaggcg atgcctcttt tggcattatt agtaagcctg gcacgtatctt | 3112 |
|    | atgggtgctc gcgcctgac cctcttggtt agtgctgctt gggcatcagc gcgaatagca   | 3172 |
| 55 | ccaatcacac actcttacct aatgacgttt tactgtata                         | 3211 |

<210> 2

60 <211> 969

<212> PRT

<213> *Zea mays*

65

# ES 2 317 698 T3

<400> 2

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

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp |             |
|    | 245                                                             | 250 255     |
| 5  | Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu |             |
|    | 260                                                             | 265 270     |
| 10 | Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys |             |
|    | 275                                                             | 280 285     |
|    | Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys |             |
|    | 290                                                             | 295 300     |
| 15 | Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu |             |
|    | 305                                                             | 310 315 320 |
| 20 | Pro Val Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn |             |
|    | 325                                                             | 330 335     |
|    | Asp Tyr Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu |             |
| 25 | 340                                                             | 345 350     |
|    | Arg Val Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr |             |
|    | 355                                                             | 360 365     |
| 30 | Gln Arg Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe |             |
|    | 370                                                             | 375 380     |
|    | Ser Val Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys |             |
| 35 | 385                                                             | 390 395 400 |
|    | Leu Lys Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile |             |
|    | 405                                                             | 410 415     |
| 40 | Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val |             |
|    | 420                                                             | 425 430     |
|    | Arg Lys Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile |             |
| 45 | 435                                                             | 440 445     |
|    | Gly Glu Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys |             |
|    | 450                                                             | 455 460     |
| 50 | Leu Glu Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys |             |
|    | 465                                                             | 470 475 480 |
|    | Val Lys Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr |             |
| 55 | 485                                                             | 490 495     |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Ala His Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn |             |
|    | 500                                                             | 505 510     |
| 5  | Met Ser Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile |             |
|    | 515                                                             | 520 525     |
| 10 | Ile Glu Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly |             |
|    | 530                                                             | 535 540     |
|    | Arg Val Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser |             |
|    | 545                                                             | 550 555 560 |
| 15 | Lys Thr Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr |             |
|    | 565                                                             | 570 575     |
| 20 | Gly Asn Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln |             |
|    | 580                                                             | 585 590     |
|    | Pro Gly Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala |             |
|    | 595                                                             | 600 605     |
| 25 | Pro Lys Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln |             |
|    | 610                                                             | 615 620     |
| 30 | Leu Leu Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala |             |
|    | 625                                                             | 630 635 640 |
|    | Ala Met Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys |             |
|    | 645                                                             | 650 655     |
| 35 | Leu Ser Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile |             |
|    | 660                                                             | 665 670     |
| 40 | Gln Asn Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu |             |
|    | 675                                                             | 680 685     |
|    | Ser Leu Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser |             |
|    | 690                                                             | 695 700     |
| 45 | Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala |             |
|    | 705                                                             | 710 715 720 |
| 50 | Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val |             |
|    | 725                                                             | 730 735     |
|    | Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys |             |
|    | 740                                                             | 745 750     |

# ES 2 317 698 T3

Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys  
 755 760 765  
 5 Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp  
 770 775 780  
 10 Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu  
 785 790 795 800  
 15 Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu  
 805 810 815  
 20 Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln  
 820 825 830  
 25 Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe  
 835 840 845  
 30 Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr  
 850 855 860  
 35 Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu  
 865 870 875 880  
 40 Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp  
 885 890 895  
 45 Lys Pro Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val  
 900 905 910  
 50 Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro  
 915 920 925  
 55 Cys Gly Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr  
 930 935 940  
 60 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu  
 945 950 955 960  
 65 Leu Lys Val Arg Phe His His Lys Arg  
 965

<210> 3

55 <211> 2295

<212> DNA

<213> *Zea mays*

60 <220>

<221> CDS

<222> (107)..(2068)

65

# ES 2 317 698 T3

<400> 3

```

tgacctgttc catcccgcca gcccttcggc tcccacgacc caaccccact gcccgagcc 60
5
cccgagcctt ctccgaatctt gcgagaacct caggggcgag gagcag atg tcg gcg 115
Met Ser Ala
1
10
agg cta cgg gtg gcg gac gtc cgc gcg gag ctt cag cgc cgc ggc ctc 163
Arg Leu Arg Val Ala Asp Val Arg Ala Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu
5 10 15
15
gat gta tcc ggc acc aag cct gct ctc gtg cgg agg ctg gac gcc gca 211
Asp Val Ser Gly Thr Lys Pro Ala Leu Val Arg Arg Leu Asp Ala Ala
20 25 30 35
20
att tgc gag gcg gag aag gcc gtg gtg gct gct gcg cca acc agt gtg 259
Ile Cys Glu Ala Glu Lys Ala Val Val Ala Ala Ala Pro Thr Ser Val
40 45 50
25
gca aat ggg tat gac gta gcc gta gat ggc aaa agg aac tgc ggg aat 307
Ala Asn Gly Tyr Asp Val Ala Val Asp Gly Lys Arg Asn Cys Gly Asn
55 60 65
30
aat aag agg aaa agg tcc ggg gat ggg ggt gaa gag gga aac ggc gat 355
Asn Lys Arg Lys Arg Ser Gly Asp Gly Gly Glu Glu Gly Asn Gly Asp
70 75 80
35
acg tgt aca gat ggc aca aaa cta gag ggc atg agc tat cgt gag ctg 403
Thr Cys Thr Asp Val Thr Lys Leu Glu Gly Met Ser Tyr Arg Glu Leu
85 90 95
40
cag gga ttg gcc aag gca cgt gga gtt gcg gca aat ggg ggc aag aaa 451
Gln Gly Leu Ala Lys Ala Arg Gly Val Ala Ala Asn Gly Gly Lys Lys
100 105 110 115
45
gat gtt atc cag agg ttg ctc tcg gcg act gct ggt cct gct gca gtt 499
Asp Val Ile Gln Arg Leu Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Ala Ala Val
120 125 130
50
gca gat ggt ggt cct ctg gcc gcc aag gaa gtc ata aaa ggt ggt gat 547
Ala Asp Gly Gly Pro Leu Gly Ala Lys Glu Val Ile Lys Gly Gly Asp
135 140 145

```

# ES 2 317 698 T3

gag gag ggt gag ggg aau aag gag aag atg gtt act gcc acc aag aag 595  
 Glu Glu Val Glu Val Lys Lys Glu Lys Met Val Thr Ala Thr Lys Lys  
 150 155 160

5  
 gga gct gca ggc ggg gat cag cac att ccc gat cac ata aaa gcg aac 643  
 Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp His Ile Lys Val Asn  
 165 170 175

10  
 tat cat gtc ttg caa gtg ggc gat gaa atc tat gat gcc acc tcg aac 691  
 Tyr His Val Leu Gln Val Gly Asp Glu Ile Tyr Asp Ala Thr Leu Asn  
 180 185 190 195

15  
 cag act aat ggt gga gac aac aac aat aag tcc tat atc att caa gtt 739  
 Gln Thr Asn Val Gly Asp Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Val  
 200 205 210

20  
 tta gaa tct gat gct ggt gga agc ttt atg gtt ttc aac aga tgg gga 787  
 Leu Glu Ser Asp Ala Gly Gly Ser Phe Met Val Tyr Asn Arg Trp Gly  
 215 220 225

25  
 aga gct ggg gta gga ggt caa gat aaa cta cat ggt ccc tcc cca aca 835  
 Arg Val Gly Val Arg Gly Gln Asp Lys Leu His Gly Pro Ser Pro Thr  
 230 235 240

30  
 cga gac caa gca ata tat gaa ttt gag ggg aag ttc cac aac aaa acc 883  
 Arg Asp Gln Ala Ile Tyr Glu Phe Glu Gly Lys Phe His Asn Lys Thr  
 245 250 255

35  
 aat aat cat tgg tct gat cgc aag aac ttc aaa tgt tat gca aag aaa 931  
 Asn Asn His Trp Ser Asp Arg Lys Asn Phe Lys Cys Tyr Ala Lys Lys  
 260 265 270 275

40  
 tac cct tgg ctt gaa atg gat tat ggt gaa act gag aaa gaa ata gag 979  
 Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys Glu Ile Glu  
 280 285 290

45  
 aaa ggt tcc acc att gat cag ata aaa gag aca aaa ctt gaa act aga 1027  
 Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu Glu Thr Arg  
 295 300 305

50  
 att gcg cag ttc ata tcc ctg atc tgc aat att agc atg atg aag caa 1075  
 Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met Met Lys Gln  
 310 315 320

55  
 aga atg gtg gac ata ggt tat aat gct gaa aag ctt ccc ctt gga aag 1123  
 Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro Leu Gly Lys  
 325 330 335

# ES 2 317 698 T3

cta agg aaa gcc aca ata ctt aag ggt tat cat gtt ttg aaa agg ata 1171  
 Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu Lys Arg Ile  
 340 345 350 355  
 5  
 tcc gat gtt att tca aag gcg gac agg aga cat ctt gag caa ttg act 1219  
 Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu Gln Leu Thr  
 360 365 370  
 10  
 ggg gaa ttc tac acc gtg att cct cat gac ttt ggt ttc aga aag atg 1267  
 Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe Arg Lys Met  
 375 380 385  
 15  
 cgt gaa ttt att atc gat act cct cag aaa cta aaa gcc aag ttg gag 1315  
 Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala Lys Leu Glu  
 390 395 400  
 20  
 atg gtt gaa gcc ttt ggt gag att gaa att gca act aaa ctt ttg gag 1363  
 Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys Leu Leu Glu  
 405 410 415  
 25  
 gat gat tca agt gac cag gat gat ccg ttg tat gcc cga tac aag caa 1411  
 Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg Tyr Lys Gln  
 420 425 430 435  
 30  
 ctt cat tgt gat ttc aca cct ctt gaa gcc gat tca gat gag tac tct 1459  
 Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp Glu Tyr Ser  
 440 445 450  
 35  
 atg ata aaa tca tat ttg aga aat aca cat gga aaa aca cac tct ggt 1507  
 Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr His Ser Gly  
 455 460 465  
 40  
 tat acg gtg gac aca gtg caa ata ttt aag gtt tca agg cat ggt gaa 1555  
 Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg His Gly Glu  
 470 475 480  
 45  
 aca gag cga ttt caa aaa ttt gct agt aca aga aat agg atg ctt ttg 1603  
 Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg Met Leu Leu  
 485 490 495  
 50  
 tgg cat ggt tct cgg ttg agc aac tgg gcc ggg atc ctt tct cag ggt 1651  
 Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu Ser Gln Gly  
 500 505 510 515  
 55  
 ctg cga atc gcc cct cct gaa gca cct gtt act ggt tac atg ttt ggc 1699  
 Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly  
 520 525 530

# ES 2 317 698 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

tgttgctgag atcttagcag aacatatgtg gacttatagc accaggtgcc ctccagcctca 2148

ctttctgagc aaatttggtg gcctttgcat ttctgatttg gtttcagctt ctgagcccat 2208

45

tgatgattga tactgagtgt atatatgaac cattgatatc cactttccat gtaacttaagt 2268

ttttttaaca tgtcccatgc ataataa 2295

50

<210> 4

<211> 653

55

<212> PRT

<213> *Zea mays*

60

65

# ES 2 317 698 T3

<400> 4

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

# ES 2 317 698 T3

|    | 260                                                                                | 265 | 270 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Ala Lys Lys Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys<br>275 280 285     |     |     |
|    | Glu Ile Glu Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu<br>290 295 300     |     |     |
| 10 | Glu Thr Arg Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met<br>305 310 315 320 |     |     |
| 15 | Met Lys Gln Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro<br>325 330 335     |     |     |
|    | Leu Gly Lys Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu<br>340 345 350     |     |     |
| 20 | Lys Arg Ile Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu<br>355 360 365     |     |     |
| 25 | Gln Leu Thr Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe<br>370 375 380     |     |     |
|    | Arg Lys Met Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala<br>385 390 395 400 |     |     |
| 30 | Lys Leu Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys<br>405 410 415     |     |     |
| 35 | Leu Leu Glu Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg<br>420 425 430     |     |     |
|    | Tyr Lys Gln Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp<br>435 440 445     |     |     |
| 40 | Glu Tyr Ser Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr<br>450 455 460     |     |     |
| 45 | His Ser Gly Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg<br>465 470 475 480 |     |     |
|    | His Gly Glu Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg<br>485 490 495     |     |     |
| 50 | Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu<br>500 505 510     |     |     |
| 55 | Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr                    |     |     |

# ES 2 317 698 T3

|    | 515                                                             | 520 | 525     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 5  | Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser Ala |     |         |
|    | 530                                                             | 535 | 540     |
| 10 | Asn Tyr Cys Tyr Ala Ser Glu Ala Cys Arg Ser Gly Val Leu Leu Leu |     |         |
|    | 545                                                             | 550 | 555 560 |
| 15 | Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Asn Ala Asp Tyr |     |         |
|    | 565                                                             | 570 | 575     |
| 20 | Asp Ala Asn Asn Leu Pro Lys Gly Lys Leu Arg Ser Lys Gly Val Gly |     |         |
|    | 580                                                             | 585 | 590     |
| 25 | Gln Thr Ala Pro Asn Met Val Glu Ser Lys Val Ala Asp Asp Gly Val |     |         |
|    | 595                                                             | 600 | 605     |
| 30 | Val Val Pro Leu Gly Glu Pro Lys Gln Glu Pro Ser Lys Arg Gly Gly |     |         |
|    | 610                                                             | 615 | 620     |
| 35 | Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Asp Gln Ile Arg Met |     |         |
|    | 625                                                             | 630 | 635 640 |
| 40 | Arg Tyr Val Leu His Val Asn Phe Asn Phe Lys Arg Arg             |     |         |
|    | 645                                                             | 650 |         |

35 <210> 5  
 <211> 2147  
 <212> DNA  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (129)..(2042)  
 45 <400> 5

50 attgatgaag aagaaaaacga agaagaagac tcttcaaata ctcgcgcgaa ctcacttctg 60  
 acgaaaacca tacttctctca gtctcattcc ctttcgcgacg aactattctc ctgaagaaga 120  
 55 agacgaaa atg gcg aac aag ctc aaa gtc gac gaa ctc cgt tta aaa ctc 170  
 Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu  
 1 5 10  
 60 gcc gag cgt gga ctc agt act act gga gtc aaa gcc gtt ctg gtg gag 218  
 Ala Glu Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu  
 15 20 25 30

# ES 2 317 698 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 317 698 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

tgg gat cgt gcg ata gag ata ttt acc aat aag ttc aat gac aag aca 842  
 Trp Asp Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr  
 225 230 235

aag aat tat tgg ttt gac aga aag gag ttt atc cca cat ccc aag tcc 890  
 Lys Asn Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser  
 240 245 250

tat aca tgg ctc gaa atg gat tac gga aaa gag gaa aat gat tca ccg 938  
 Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro  
 255 260 265 270

gtc aat aat gat att ccg agt tca tct tcc gaa gtt aaa cct gaa caa 986  
 Val Asn Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln  
 275 280 285

tca aaa cta gat att cgg gtt gcc aag ttc atc tct ctt ata tgt aat 1034  
 Ser Lys Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn  
 290 295 300

gtc agc atg atg gca cag cat atg atg gaa ata gga tat aac gct aac 1082  
 Val Ser Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn  
 305 310 315

aaa ttg cca ctc ggc aag ata agc aag tcc aca att tca aag ggt tat 1130  
 Lys Leu Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr  
 320 325 330

gaa gtg ctg aag aga ata tgg gag gtg att gac cgg tat gat aga acg 1178  
 Glu Val Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr  
 335 340 345 350

agg ctt gag gaa ctg agt gga gag ttc tac aca gtg aca cct cat gat 1226  
 Arg Leu Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp  
 355 360 365

ttt ggt ttt aag aaa atg agt cag ttt gtt ata gac act cct caa aag 1274  
 Phe Gly Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys  
 370 375 380

ttg aaa cag aaa att gaa acg gtt gaa gca tta ggt gaa att gaa ctc 1322  
 Leu Lys Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu  
 385 390 395

gca aca aag ttg ttg tcc gtc gac cgg gga ttg cag gat gat cct tta 1370  
 Ala Thr Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu  
 400 405 410

# ES 2 317 698 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

tat tat cac tac gag caa ctt aat tgt ggt ttg acg cca gta gga aat 1418  
 Tyr Tyr His Tyr Gln Gln Leu Asn Cys Gly Leu Thr Pro Val Gly Asn  
 415 420 425 430

gat tca gag gag ttc tct atg gtt gct aat tac atg gag aac act cac 1466  
 Asp Ser Glu Glu Phe Ser Met Val Ala Asn Tyr Met Glu Asn Thr His  
 435 440 445

gca aag acg cat tcc gga tat acg gtt gag att gcc caa cta ttc aga 1514  
 Ala Lys Thr His Ser Gly Tyr Thr Val Glu Ile Ala Gln Leu Phe Arg  
 450 455 460

gct tcc aga gct gtc gaa gct gat cga ttc caa cag ttt tca agt tcc 1562  
 Ala Ser Arg Ala Val Glu Ala Asp Arg Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser  
 465 470 475

aag aac agg atg tta ctc tgg cac ggt tca cgt ctc act aac tgg gct 1610  
 Lys Asn Arg Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Trp Ala  
 480 485 490

ggt att tta tct caa ggt ctg cga ata gct cct cct gaa gcg cct gta 1658  
 Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val  
 495 500 505 510

act ggt tac atg ttt gga aaa ggg gtt tac ttt gcg gat atg ttc tcc 1706  
 Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser  
 515 520 525

aag agt gcg aac tat tgc tat gcc aac act ggc gct aat gat ggc gtt 1754  
 Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Tyr Ala Asn Thr Gly Ala Asn Asp Gly Val  
 530 535 540

ctg ctc ctc tgc gag gtt gct ttg gga gac atg aat gaa ctt ccg tat 1802  
 Leu Leu Leu Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Tyr  
 545 550 555

tca gat tat aac gag gat aat cta ccc ccg gga aag cta agc aca aaa 1850  
 Ser Asp Tyr Asn Ala Asp Asn Leu Pro Pro Gly Lys Leu Ser Thr Lys  
 560 565 570

ggt gtg ggg aaa aca gca cca aac cca tca gag gct caa aca cca gaa 1898  
 Gly Val Gly Lys Thr Ala Pro Asn Pro Ser Glu Ala Gln Thr Leu Glu  
 575 580 585 590

gac ggt gtt gtc gtc cca ctt ggc aaa cca gtg gaa cgt tca tgc tcc 1946  
 Asp Gly Val Val Val Pro Leu Gly Lys Pro Val Glu Arg Ser Cys Ser  
 595 600 605

# ES 2 317 698 T3

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

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

aacttatgta tattagcttt tgaacatcaa ctaattatcc aaaaatcagc gtttattgt 2102  
atttttttca aactctttca tctctgattt tgcacgggtc actcg 2147

<210> 6

<211> 637

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| 5  | Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr | 165 | 170 | 175 |
| 10 | Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu | 180 | 185 | 190 |
| 15 | Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val | 195 | 200 | 205 |
| 20 | Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp | 210 | 215 | 220 |
| 25 | Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn | 225 | 230 | 235 |
| 30 | Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr | 245 | 250 | 255 |
| 35 | Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn | 260 | 265 | 270 |
| 40 | Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys | 275 | 280 | 285 |
| 45 | Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser | 290 | 295 | 300 |
| 50 | Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu | 305 | 310 | 315 |
| 55 | Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr Glu Val | 325 | 330 | 335 |
| 60 | Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr Arg Leu | 340 | 345 | 350 |
| 65 | Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly | 355 | 360 | 365 |
|    | Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys | 370 | 375 | 380 |
|    | Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu Ala Thr | 385 | 390 | 395 |
|    | Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Tyr |     |     | 400 |

# ES 2 317 698 T3

|    | 405                                                             | 410 | 415 |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 5  | His Tyr Gln Gln Leu Asn Cys Gly Leu Thr Pro Val Gly Asn Asp Ser | 420 | 425 | 430 |     |
| 10 | Glu Glu Phe Ser Met Val Ala Asn Tyr Met Glu Asn Thr His Ala Lys | 435 | 440 | 445 |     |
| 15 | Thr His Ser Gly Tyr Thr Val Glu Ile Ala Gln Leu Phe Arg Ala Ser | 450 | 455 | 460 |     |
| 20 | Arg Ala Val Glu Ala Asp Arg Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser Lys Asn | 465 | 470 | 475 | 480 |
| 25 | Arg Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Trp Ala Gly Ile | 485 | 490 | 495 |     |
| 30 | Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly | 500 | 505 | 510 |     |
| 35 | Tyr Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser | 515 | 520 | 525 |     |
| 40 | Ala Asn Tyr Cys Tyr Ala Asn Thr Gly Ala Asn Asp Gly Val Leu Leu | 530 | 535 | 540 |     |
| 45 | Leu Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Tyr Ser Asp | 545 | 550 | 555 | 560 |
| 50 | Tyr Asn Ala Asp Asn Leu Pro Pro Gly Lys Leu Ser Thr Lys Gly Val | 565 | 570 | 575 |     |
| 55 | Gly Lys Thr Ala Pro Asn Pro Ser Glu Ala Gln Thr Leu Glu Asp Gly | 580 | 585 | 590 |     |
| 60 | Val Val Val Pro Leu Gly Lys Pro Val Glu Arg Ser Cys Ser Lys Gly | 595 | 600 | 605 |     |
| 65 | Met Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Glu Gln Ile Lys | 610 | 615 | 620 |     |
|    | Met Arg Tyr Val Ile Gln Val Lys Phe Asn Tyr Lys His             | 625 | 630 | 635 |     |

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A de proteínas PARP no-convencionales

ES 2 317 698 T3

<400> 7

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

<210> 8

 $^{10} \text{ <211> } 33$ 

<212> PRT

## <213> Secuencia Artificial

15  $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A1 de proteína PARP no-convencional

<400> 8

20

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

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

30                    Ile

<210> 9

<211> 30

35 <212> PRT

## <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Dominio A2 de proteína PARP no-convencional

<400> 9

45 Gly Met Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Gly Xaa  
1 5 10 15

50           Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Lys Lys Asp Xaa Xaa Arg Leu Xaa Xaa  
                    20                         25                         30

<210> 10

55  $\langle 211 \rangle$  3212

<212> DNA

<213> *Zea mays*

60  $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (81)..(3020)

65

# ES 2 317 698 T3

<400> 10

```

gcttctctctg tcgtccggcc tccaactcca tcgaaggggc tagggagagg agggaaacccg 60
5
aaccacagca ggccggggca atg gcg gcg ccg cca aag gcg tgg aag gcg gag 113
Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu
1 5 10

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

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

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

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

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

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

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

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

```

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | aag ggt ata cca tgg tat cat gcc aac tgt ttc ctt gag gta tcc ccg | 545  |
|    | Lys Gly Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro |      |
|    | 140 145 150 155                                                 |      |
| 5  | tct gca act gtt gag aag ttc tca ggc tgg gat act ttg tcc gat gag | 593  |
|    | Ser Ala Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu |      |
|    | 160 165 170                                                     |      |
| 10 | gat aag aga acc atg ctc gat ctt gct aaa aaa gat gtt ggc aac aat | 641  |
|    | Asp Lys Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn |      |
|    | 175 180 185                                                     |      |
| 15 | gaa caa aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat | 689  |
|    | Glu Gln Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp |      |
|    | 190 195 200                                                     |      |
| 20 | agc tac aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg | 737  |
|    | Ser Tyr Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val |      |
|    | 205 210 215                                                     |      |
| 25 | cga aac aaa ggg caa ctt gta gac cca cgt ggt tcc aat act agt tca | 785  |
|    | Arg Asn Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser |      |
|    | 220 225 230 235                                                 |      |
| 30 | gct gat atc caa cta aag ctt aag gag caa agt gac aca ctt tgg aag | 833  |
|    | Ala Asp Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys |      |
|    | 240 245 250                                                     |      |
| 35 | tta aag gat gga ctt aag act cat gta tcg gct gct gaa tta agg gat | 881  |
|    | Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp |      |
|    | 255 260 265                                                     |      |
| 40 | atg ctt gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta | 929  |
|    | Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu |      |
|    | 270 275 280                                                     |      |
| 45 | ttg gat cgc tgt gcg gat gga atg ata ttt gga gcg ctg ggt ccc tgc | 977  |
|    | Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys |      |
|    | 285 290 295                                                     |      |
| 50 | cca gtc tgt gct aat ggc atg tac tat tat aat ggt cag tac caa tgc | 1025 |
|    | Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys |      |
|    | 300 305 310 315                                                 |      |
| 55 | agt ggt aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa | 1073 |
|    | Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu |      |
|    | 320 325 330                                                     |      |

# ES 2 317 698 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

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

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

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

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

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

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

gat tgt tta att gca tgt ggt gag ctc gac aat gaa aat gct gaa gtc 1409  
 Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val  
 430 435 440

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

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

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

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

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

# ES 2 317 698 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

65

# ES 2 317 698 T3

att cat cct cat att ata cgg gat gag gat gat ctg atg atc aaa gcg 2273  
 Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala  
 720 725 730  
 5  
 aaa atg cct gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt 2321  
 Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val  
 735 740 745  
 10  
 ggc ttc gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tcc atg aaa 2369  
 Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys  
 750 755 760  
 15  
 ctt cac tgt gac acc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tcc aag 2417  
 Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys  
 765 770 775  
 20  
 tta att gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct act cac aag gac 2465  
 Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp  
 780 785 790 795  
 25  
 tgg tcg ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca cct gat cga gat cga gaa 2513  
 Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu  
 800 805 810  
 30  
 ctt aat aag tcc tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta 2561  
 Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu  
 815 820 825  
 35  
 tta tgg cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gct gga att ctt agt caa 2609  
 Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln  
 830 835 840  
 40  
 ggg cta aga att cca cct cct gag gca cct gct act ggc tat atg ttc 2657  
 Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe  
 845 850 855  
 45  
 ggc aag ggc ctc tcc ttc gca gat cta gta agc aag agc gca caa tcc 2705  
 Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr  
 860 865 870 875  
 50  
 tgt tat gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tcc gag 2753  
 Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu  
 880 885 890  
 55  
 gtt gct tta gga cag atg tat gaa cta aag aag gcc acg tcc atg gac 2801  
 Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp  
 895 900 905  
 60  
 65

# ES 2 317 698 T3

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

cca ctg gag cca gag ttt gtg aag cgg agg gat gat gtc gta ggt ecc 2897  
Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro  
925 930 935

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

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

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

tagagttgga aggtagagaa gcagagctag gcgatgcctc ttttggcatt actagtaagc 3100

ctggcatgta tttatgggtg ctgcgccttg atccattttg gtaagtgttg cttgggcac 3160

agcgcggaata gcaccaatca cacactttta cctaattgacg ttttactgta ta 3212

<210> 11  
<211> 980  
<212> PRT  
<213> *Zea mays*  
<400> 11

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

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

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

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

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

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser Ala Gly Thr Ser Ser |             |
|    | 85                                                              | 90 95       |
| 5  | Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu Ile Ala Pro Ser Ala |             |
|    | 100                                                             | 105 110     |
| 10 | Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile Thr Lys Gly Ser Val |             |
|    | 115                                                             | 120 125     |
|    | Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro Lys Gly Ile Pro Trp |             |
|    | 130                                                             | 135 140     |
| 15 | Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro Ser Ala Thr Val Glu |             |
|    | 145                                                             | 150 155 160 |
| 20 | Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu Asp Lys Arg Thr Met |             |
|    | 165                                                             | 170 175     |
|    | Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn Glu Gln Asn Lys Gly |             |
| 25 | 180                                                             | 185 190     |
|    | Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp Ser Tyr Lys Ser Ala |             |
|    | 195                                                             | 200 205     |
| 30 | Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val Arg Asn Lys Gly Gln |             |
|    | 210                                                             | 215 220     |
|    | Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser Ala Asp Ile Gln Leu |             |
| 35 | 225                                                             | 230 235 240 |
|    | Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys Leu Lys Asp Gly Leu |             |
|    | 245                                                             | 250 255     |
| 40 | Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp Met Leu Glu Ala Asn |             |
|    | 260                                                             | 265 270     |
|    | Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu Leu Asp Arg Cys Ala |             |
| 45 | 275                                                             | 280 285     |
|    | Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys Pro Val Cys Ala Asn |             |
| 50 | 290                                                             | 295 300     |
|    | Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys Ser Gly Asn Val Ser |             |
|    | 305                                                             | 310 315 320 |
| 55 | Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Pro Val Arg Val Lys |             |
|    | 325                                                             | 330 335     |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr Leu Met Lys |     |
|    | 340                                                             | 350 |
| 5  | Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val Leu Pro Pro |     |
|    | 355                                                             | 360 |
| 10 | Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg Thr Ser Leu |     |
|    | 370                                                             | 380 |
| 15 | Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val Val Gly Gln |     |
|    | 385                                                             | 390 |
|    |                                                                 | 395 |
|    |                                                                 | 400 |
| 20 | Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys Leu Ala Gly |     |
|    | 405                                                             | 410 |
|    |                                                                 | 415 |
| 25 | Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys Leu Ile Ala |     |
|    | 420                                                             | 425 |
|    |                                                                 | 430 |
| 30 | Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys Ala Arg Arg |     |
|    | 435                                                             | 440 |
|    |                                                                 | 445 |
| 35 | Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile Gly Glu Cys Val Lys |     |
|    | 450                                                             | 455 |
|    |                                                                 | 460 |
| 40 | Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys Leu Glu Asn Ala Leu |     |
|    | 465                                                             | 470 |
|    |                                                                 | 475 |
|    |                                                                 | 480 |
| 45 | Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys Val Lys Gly Arg Ser |     |
|    | 485                                                             | 490 |
|    |                                                                 | 495 |
| 50 | Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr Ala His Ile Leu Glu |     |
|    | 500                                                             | 505 |
|    |                                                                 | 510 |
| 55 | Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn Met Ser Asp Leu Ala |     |
|    | 515                                                             | 520 |
|    |                                                                 | 525 |
| 60 | Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile Ile Glu Gln Asp Asp |     |
|    | 530                                                             | 535 |
|    |                                                                 | 540 |
| 65 | Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly Arg Val Gly Ser Glu |     |
|    | 545                                                             | 550 |
|    |                                                                 | 555 |
|    |                                                                 | 560 |
| 70 | Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser Lys Thr Glu Ala Ile |     |
|    | 565                                                             | 570 |
|    |                                                                 | 575 |
| 75 | Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr Gly Asn Ser Trp Glu |     |
|    | 580                                                             | 585 |
|    |                                                                 | 590 |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |             |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------------|
|    | Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln Pro Gly Arg Phe Tyr |             |
|    | 595                                                             | 600 605     |
| 5  | Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala Pro Lys Arg Lys Asp |             |
|    | 610                                                             | 615 620     |
| 10 | Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln Leu Leu Glu Leu Met |             |
|    | 625                                                             | 630 635 640 |
|    | Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Glu Phe |             |
|    |                                                                 | 645 650 655 |
| 15 | Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Glu Asn |             |
|    | 660                                                             | 665 670     |
| 20 | Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn Leu Leu Lys |             |
|    | 675                                                             | 680 685     |
|    | Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu Ile Val Ala |             |
| 25 | 690                                                             | 695 700     |
|    | Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His Pro His Ile |             |
|    | 705                                                             | 710 715 720 |
| 30 | Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met Leu Glu Ala |             |
|    | 725                                                             | 730 735     |
|    | Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe Asp Ser Asp |             |
| 35 | 740                                                             | 745 750     |
|    | Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His Cys Asp Ile |             |
|    | 755                                                             | 760 765     |
| 40 | Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Gln Tyr |             |
|    | 770                                                             | 775 780     |
| 45 | Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser Leu Glu Leu |             |
|    | 785                                                             | 790 795 800 |
|    | Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn Lys Tyr Ser |             |
|    | 805                                                             | 810 815     |
| 50 | Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp His Gly Ser |             |
|    | 820                                                             | 825 830     |
| 55 | Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala |             |
|    | 835                                                             | 840 845     |

ES 2 317 698 T3

```

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

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

      Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly Asp
10                      885                      890                      895

      Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro Pro Arg Gly
15                      900                      905                      910

      Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu Glu Ser Glu
15                      915                      920                      925

      Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly Lys Pro Val
20                      930                      935                      940

      Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu Tyr Ile Val
25                      945                      950                      955                      960

      Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys Val Arg Phe
30                      965                      970                      975

      His His Lys Arg
30                      980

35 <210> 12
    <211> 1010
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
40
    <220>
    <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Proteína de fusión entre el dominio APP N-terminal y la proteína GUS
45 <400> 12

      Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu Ala Glu
50      1                      5                      10                      15

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

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

      Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys Leu Ile

```

# ES 2 317 698 T3

|    | 50                                                                     | 55  | 60      |
|----|------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 5  | Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg Glu Glu<br>65  | 70  | 75 80   |
| 10 | Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp Leu Leu<br>85  | 90  | 95      |
| 15 | Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro Val Lys<br>100 | 105 | 110     |
| 20 | Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly Phe Glu<br>115 | 120 | 125     |
| 25 | Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys Gly Ala<br>130 | 135 | 140     |
| 30 | Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln Tyr His<br>145 | 150 | 155 160 |
| 35 | Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr<br>165 | 170 | 175     |
| 40 | Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu<br>180 | 185 | 190     |
| 45 | Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val<br>195 | 200 | 205     |
| 50 | Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp<br>210 | 215 | 220     |
| 55 | Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn<br>225 | 230 | 235 240 |
| 60 | Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr<br>245 | 250 | 255     |
| 65 | Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn<br>260 | 265 | 270     |
|    | Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys<br>275 | 280 | 285     |
|    | Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser<br>290 | 295 | 300     |
|    | Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu        |     |         |

# ES 2 317 698 T3

|    |                                                                 |     |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| 5  | Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr Glu Val | 325 | 330 | 335 |
|    | Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr Arg Leu | 340 | 345 | 350 |
| 10 | Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly | 355 | 360 | 365 |
| 15 | Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys | 370 | 375 | 380 |
|    | Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu Ala Thr | 385 | 390 | 395 |
| 20 | Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr | 405 | 410 | 415 |
| 25 | Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg | 420 | 425 | 430 |
|    | Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu | 435 | 440 | 445 |
| 30 | Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp | 450 | 455 | 460 |
| 35 | Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val | 465 | 470 | 475 |
|    | Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp | 485 | 490 | 495 |
| 40 | Ala Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met | 500 | 505 | 510 |
| 45 | Glu His Gln Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr | 515 | 520 | 525 |
|    | Val Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu | 530 | 535 | 540 |
| 50 | Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn | 545 | 550 | 555 |
| 55 | Gly Lys Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly |     |     |     |

# ES 2 317 698 T3

|    | 565                                                                                | 570 | 575 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 5  | Ile His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp<br>580 585 590     |     |     |
|    | Asp Ile Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser<br>595 600 605     |     |     |
| 10 | Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg<br>610 615 620     |     |     |
| 15 | Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr<br>625 630 635 640 |     |     |
|    | Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu<br>645 650 655     |     |     |
| 20 | Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr<br>660 665 670     |     |     |
| 25 | Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe<br>675 680 685     |     |     |
|    | Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu<br>690 695 700     |     |     |
| 30 | Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu Met Val His<br>705 710 715 720 |     |     |
| 35 | Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser<br>725 730 735     |     |     |
|    | His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly<br>740 745 750     |     |     |
| 40 | Ile Val Val Ile Asp Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu<br>755 760 765     |     |     |
| 45 | Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu<br>770 775 780     |     |     |
|    | Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln Ala Ile Lys<br>785 790 795 800 |     |     |
| 50 | Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser<br>805 810 815     |     |     |
| 55 | Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe                    |     |     |

# ES 2 317 698 T3

|    | 820                                                             | 825  | 830  |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 5  | Ala Pro Leu Ala Glu Ala Thr Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile |      |      |
|    | 835                                                             | 840  | 845  |
| 10 | Thr Cys Val Asn Val Met Phe Cys Asp Ala His Thr Asp Thr Ile Ser |      |      |
|    | 850                                                             | 855  | 860  |
| 15 | Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly Trp Tyr Val |      |      |
|    | 865                                                             | 870  | 875  |
| 20 | Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu |      |      |
|    | 885                                                             | 890  | 895  |
| 25 | Leu Ala Trp Gln Glu Lys Leu His Gln Pro Ile Ile Ile Thr Glu Tyr |      |      |
|    | 900                                                             | 905  | 910  |
| 30 | Gly Val Asp Thr Leu Ala Gly Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp |      |      |
|    | 915                                                             | 920  | 925  |
| 35 | Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu Asp Met Tyr His Arg Val Phe |      |      |
|    | 930                                                             | 935  | 940  |
| 40 | Asp Arg Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn Phe Ala Asp |      |      |
|    | 945                                                             | 950  | 955  |
| 45 | Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys Lys Gly |      |      |
|    | 965                                                             | 970  | 975  |
| 50 | Ile Phe Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln |      |      |
|    | 980                                                             | 985  | 990  |
| 55 | Lys Arg Trp Thr Gly Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gln Gly Gly |      |      |
|    | 995                                                             | 1000 | 1005 |
| 60 | Lys Gln                                                         |      |      |
|    | 1010                                                            |      |      |

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador PCR degenerado

<400> 13

ccgaattcgg ntayatgtty ggnaa 25

<210> 14

<211> 25

## ES 2 317 698 T3

<212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Iniciador PCR degenerado

<400> 14  
 10                   ccgaattcacc nacttctctt tttta                   25

15 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso como Iniciador PCR

25 <400> 15  
                   gggaaccatgt agtttatcttt gaact           25

30 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso en PCR

40 <400> 16  
                   gacctctgtac cccaactctt ccccat       26

45 <210> 17  
 <211> 36  
 <212> DNA

50 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso en PCR

55 <400> 17  
 60                   aagtcgacgcg ggccggccaca cctagtgcca ggttcag           36

<210> 18  
 <211> 24  
 65 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 317 698 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso en PCR

5 <400> 18

atctcaatg tacattctc agga 24

10

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso en PCR

20

<400> 19

aggatcccat ggcgacaag ctcaagtg c 31

25

<210> 20

<211> 26

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido para uso en PCR

<400> 20

40

aggatcccta ggcctgtag ttgat 26

<210> 21

45 <211> 4947

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

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

<220>

55 <221> Promotor

<222> (1)..(1961)

<220>

60 <221> señal\_misc

<222> (1962)..(1964)

<223> codón de iniciación de la traducción

65

# ES 2 317 698 T3

<400> 21

5           ctcgagatag tatatTTTT agttactatc attacataag tatatTTTaa aaaactaatt 60  
           atatgaatta tgtagctaac tagatagata atcgtataac caattcatgt tagtatagta 120  
 10           tagtttaagt atglattttg ggattacaag tglggttggc atcaagacaa ggatgggtgt 180  
           agcctttctc tctaatttgg ttaagaaaa gtttttgcac tttatgtata aacgtgtttt 240  
 15           ttttttataa tttcaaatTT caacaaaaaa caattttttt taataatgat tgaccactat 300  
           agacaattta aatgataaaa aaaaggggga atttttcaca atgttttgga gattaagtcta 360  
 20           gattttttgt ccaaatTTTc cgattgtang aattaaguag caatgaacat ttgtgttaag 420  
           cttaacgatt tgtactcaca atatctttta aatttaaaat tgttaaccaa aatatcctat 480  
 25           atattgtact tctaatagaa atataaacta ttaaaaacaa cactttattc atataatata 540  
           agttaaaaca tatgtttttt ttagtatgct ctaatcacac ctattaaaaa aagttgaagc 600  
 30           taaatgagcc aaaaagaaaa ataaagatag gggatgggga caggctgtaa tgttaggcgg 660  
           ttgggtatatg aactgagaac atgtctgttg gttcggccca tctacgccac tcaaccattt 720  
 35           ggctatgttt tctttttggc ttttgcattg tctctctact tttcttcttt ggtcamaatc 780  
           tctatctcgt cttttacatg gcttaccgga atgttagctg tcatgtaaat ttgggttatga 840  
 40           aaagatcttt tatataaact ttatcgtata ttaatatcgt tatcatctaa ccattttttt 900

# ES 2 317 698 T3

aaactaaact agaaccatcc agttttacaa gagttttttt tttttttttt taaccaaata 960  
 atatttgaag tgtacaatat taacaatata tgggccaaat aatagtggaa accaaatcgt 1020  
 5 tagteccact ttatgatggg cctgttgatt cttatgtctt cttcgttaagt tgggattatg 1080  
 cagattacgg gctaataaac atgcacgttt agtttttact gtccaagtta cgaaatttta 1140  
 10 tcttttgggt tgttggccca ttcatatat tccaaatgcc aaatccagcc cggctcgaca 1200  
 cagcactgct cggctcaaca ctcgatgctg gttggtagcc acttaagacc ttgggttgat 1260  
 15 taacatgcta cgaataattt gtgtcccttt ttttcaagg agactaatct ctttaataa 1320  
 aaaagaattg tgtcattagt caacacaagt cctataatcc gtttacgtta ttgtatgca 1380  
 20 cgtccttggg aaagtgaata gtggcgtagt ttacagccaa aaactatttg tatattttct 1440  
 ttcgttaaac aaccagcaaa attttcagaa aaatgttctt aaattataaa ttagtagtac 1500  
 25 attttaaanc atagagattt ttgtttctt ttaatagaag agttnaacct atgtacaaaa 1560  
 tttcaactcc ttttcaaagt atttgccgtt tactagattt ttaacctttt tttttttatc 1620  
 30 tttcatgatt ttctattgct tgcctcctc aatggtagga aataaatact attttaaaaa 1680  
 ggtcaggggt ggatttaaga atcaatccaa aagtctgggg tcttttggag attaaaaagt 1740  
 35 tatatgggaa atatcccaa atatgaacga gaacttttgt caaaaaaatt taaaataatt 1800  
 tttcaaaaag ccttaagctt ttcaagggaa gccatcgatg aagaagaaa cgaagaaga 1860  
 40 gactcttcaa acgttcgcgc gaactcactt ctgacgaaaa ccatacttcc tcagtctcat 1920  
 tccctttccg acgaactatt ctcctgaaga agaagacgaa aatggcgaa cagctcaaa 1980  
 45 tgcacatggt ccgtccgta gaaacccaa cccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt 2040  
 gggcattcag tctggaacgc gaaactg:g gaattgatca gcgttggttg gaaagcgcgt 2100  
 tacaagaaag ccgggcaatt gctgtgccag gcagttttta cgatcagttc gccgatgcag 2160  
 50 atattcgtta ttatgcgggc aacgtctggt atcagcgca agtctttata ccgaaagggt 2220  
 gggcagggca gcgtacgtg ctgcgtttcg atgcggtcac tcattacggc aaagtgtggg 2280  
 55 tcaataatca ggaagtcatg gagcatcagg gcggctatac gccatttga gccgatgtca 2340

60

65

# ES 2 317 698 T3

cgccgcatgt tattgccggg aaaagtgtac gtatccaccgt ttgtgtgaac aacgaactga 2400  
 actggcagac tatcccgccg ggaatggcga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt 2460  
 5 cttacttcca tgatttcttt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca 2520  
 cgccgaacac ctgggtggac gatataccg ttgtgacgca tctcgcgcaa gactgttaac 2580  
 10 acgcgtctgt tgactggcag gtggcggcca atgggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg 2640  
 cggatcaaca ggtgggttga actggacnng gcactagcgg gactttgcaa gtgggtgaac 2700  
 15 cgacacctctg gcaaccgggt gaaggttato tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc 2760  
 agacagagtg tgatatctac cgccttcgcg tcggcatccg gtcaagtggca gtgaaggcg 2820  
 20 aacagttcct gattaaccac aaacggtctt actttactgg ctttggctct catgaagatg 2880  
 cggacttacg tggcaaaagg ttcgataacg tgcctgatgt gcacgaccac gcattaatgg 2940  
 25 actggattgg ggccaactcc taccgtacct cgcattacc ttacgctgaa gagatgctcg 3000  
 actgggcaga tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgcctgtgtc ggctttaacc 3060  
 30 tctcttttag cattggttct gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagag 3120  
 cagccaacgg ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg 3180  
 acaaaaacca cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgccaa cgaaccggat acccgtccgc 3240  
 35 aagtgcacgg gaatatctcg cncctggcgg aagcaacgcg taaactcgac ccgacgcgtc 3300  
 cgatcacctg cgtcaatgta atgttctgcg acgctcacac cgataccatc agcgatctct 3360  
 40 ttgatgtgct gtgcctgaac cgttattacg gatggtatgt ccaagcggc gatttggaaa 3420  
 cggcagagaa ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca ggagaaactg catcagccga 3480  
 45 ttatcatcac cgaatcggc gtggatacgt tagccgggct gcactcaatg tacaccgaca 3540  
 tgtggagtga agagtatcag tgtgcacggc tggatatgta tcaccgcgtc tttgatcgcg 3600  
 50 tcagcgcctg cgtcggcgaa caggtatgga atttcgcga ttttgcgacc tcgcaaggca 3660  
 tattggtcgt tggcggcaac aagaagggga tcttactcgc cgaccgcaaa ccgaagtcgg 3720  
 55 cggcttttct cctgcaaaa cgtcggactg gcatgaactt cgttgaaaaa ccgcagcagg 3780

# ES 2 317 698 T3

gaggcaaaca atgannnnnn gaattggccc tgccttaatg agatatgcga gacgcctatg 3840  
 atcgcatgat atttgccttc aattctgttg tgcacgttgt aaaaaacctg agcatgtgta 3900  
 gctcagatcc ttaccgccgg ttccggttca ttctaataaa tatatcaccg gttactatcg 3960  
 tatttttatg aataatattc tccgttcaat ttactgattg taccctacta cttatatgta 4020  
 caatattaaa atgaaaacaa tatattgtgc tgaatagggt tatagcgaca tctatgatag 4080  
 agcgccacaa taacaaacaa ttgcgtttta ttattacaaa tccaatttta aaaaaagcgg 4140  
 cagaaccggg caaacctaaa agactgatta cataaatctt attcaaat tt caaaaggccc 4200  
 caggggctag tatctacgac acaccgagcg gcgaactaat aacgttccact gaagggaact 4260  
 ccgggtcccc gccggcgcg atgggtgaga ttccctgaag ttgagtattg gccgtccgct 4320  
 ctaccgaaag ttacgggcac cattcaaccg ggtccagcac ggccggccggg taaccgactt 4380  
 gctgccccga gaattatgca gcattttttt ggtgtatgtg ggccccaaat gaagtgcagg 4440  
 tcaaaccttg acagtgcga caaatcgttg ggccgggtcca gggcgaattt tgcgacaaca 4500  
 tgtcgaggct cagcaggact ctagaggatc cccgggtacc gagctcgaat tcaactggcg 4560  
 tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggtac ccaacttaat cgccttgcag 4620  
 cacatcccc ttccgccagc tggcgtaata ggaagaggc ccgcaccgat cgccttcccc 4680  
 aacagttgcg cagccgaat gggaatgsc gcctgatgcy gtattttctc cttacgcac 4740  
 tgtgcgggat ttacacccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 4800  
 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 4860  
 tcccggcatc cgttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagagg 4920  
 tttcacctgc atcacgaaa cgcgcga 4947