



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614695-3 A2**

(22) Data de Depósito: 28/07/2006
(43) Data da Publicação: 12/04/2011
(RPI 2101)



(51) *Int.Cl.:*
A01H 1/00
A01H 5/00
C12N 15/82

(54) Título: **PROTEÇÃO DE PROTEÍNA KRP
MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE DE INIBIÇÃO DE
COMPLEXO CICLINA-CDK ATIVO POR KRP DO TIPO
SILVESTRE**

(30) Prioridade Unionista: 29/07/2005 US 60/703,999

(73) Titular(es): TARGETED GROWTH, INC.

(72) Inventor(es): JAY DEROCHE, PAUL OLIVIER

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006029349 de 28/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/016319 de 08/02/2007

(57) Resumo: PROTEÇÃO DE PROTEÍNA KRP MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE DE INIBIÇÃO DE COMPLEXO CICLINA-CDK ATIVO POR KRP DO TIPO SILVESTRE. A presente invenção refere-se aos polipeptídeos inibidores de de CDK mutante (CKI) tendo atividade antagonista negativa dominante contra as proteínas de CKI do tipo silvestre, bem como composições relacionadas, incluindo ácidos nucleicos e vetores codificando os polipeptídeos de CKI mutantes e células hospedeiras transformadas e plantas transgênicas compreendendo tais ácidos nucleicos e vetores. São também descritos métodos relacionados para usar as proteínas mutantes para modular a divisão celular nas células, particularmente células de planta.

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROTEÇÃO
DE PROTEÍNA KRP MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE DE INIBIÇÃO
DE COMPLEXO CICLINA-CDK ATIVO POR KRP DO TIPO SILVESTRE".**

PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

- 5 Este pedido de Patente reivindica prioridade para o Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 60/703.999, depositado em 29 de julho de 2005, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

- 10 A presente invenção refere-se às plantas que têm o mesmo ciclo celular básico como eucariotas. Não surpreendente, elas também têm em comum com eucariotas, as cinases chamadas cinases dependentes de ciclina (CDK) que regulam as transições entre as diferentes fases do ciclo celular. Arabidopsis, um sistema de planta modelo empregado para estudar o ciclo celular tem vários subgrupos de CDK. CDKA é muito similar ao cdc2
- 15 (CDK1) de mamíferos e contém a seqüência de aminoácido Ser Thr Ala lie Arg Glu (PSTAIRE) altamente conservada (SEQ ID NO:1) em uma região que media a interação com o seu par de ciclina. Arabidopsis também tem um grupo específico de planta de CDK chamado CDKB que não é conservado em animais mais altos. As plantas entretanto necessitam da contraparte de
- 20 mamífero para o G₁ CDKs-CDK4 e CDK6. CDKA foi proposto ser o G₁ CDK (que é ativado pelas ciclinas tipo de planta D), ao mesmo tempo em que CDKB foi demonstrado ser expresso predominantemente na S-fase e posterior, portanto, provavelmente identificado como o CDK específico de G₂/M.

- 25 A ativação/inativação destes CDKs direciona células pelo ciclo celular e também dita quando as células devem sair do ciclo celular. Arabidopsis contém até 49 ciclinas agrupadas em 10 subclasses (vide Wang e outros, Plant Physiol. 135:1084-1099, 2004). Somente as classes A, B e D, parecem desempenhar um papel no ciclo celular e ativam CDKs (Wang e outros, Plant Physiol. 135:1084-1099, 2004). CDKA é ativado pelas ciclinas
- 30 tipo D, ao mesmo tempo em que CDKB é ativado pelas ciclinas tipo A e B.

Em animais, os CDKs são negativamente regulados por duas famílias de inibidores de CDK (CKIs). Uma classe, chamada inibidor de

CDK4 (INK4) é compreendida de 4 membros (p15, p16, p18 e p19) que se liga a e inibe o G₁ CDKs, isto é CDK4 e CDK6, de ligar a ciclina. O outro grupo de inibidores é chamado Proteínas Inibidoras de Cinase (Kips) ou proteínas CIP (Proteína de Interação de CDK) e eles são altamente conservados em todos os animais. A família de CIP/KIP predominantemente inibe a atividade de ciclina A- e E-CDK2 cinase. Nas plantas, CKIs putativos foram identificados (Wang e outros, *Nature* 386:451-452, 1997; Wang e outros, *Plant J*, 15:501-510, 1998; De Veylder e outros, *Plant Cell* 13:1653-1667, 2001; Jasinski e outro, *Plant Physiol* 130: 1871-1882, 2002) e mostraram inibir a atividade de ciclina/CDK cinase purificada in vitro (Wang e outros, 1997, supra; Wang e outros, *Plant J*. 24:613-623, 2000; Lui e outro, *Plant J*. 21 :379-385, 2000). A expressão de CKIs de planta mostrou crescimento reduzido com órgãos menores que contêm células maiores (vide Wang e outros, 2000, supra; Jasinski e outros, *J. Cell Sci.* 115:973-982, 2001; De Veylder e outros, supra; Zhou e outros, *Plant Cell Rep.* 20:967-975, 2002; Zhou e outros, *Plant J*. 35:476-489, 2003; Schnittger e outros, *Plant Cell* 15:303-315, 2003). Em *Arabidopsis*, estes CKIs, são chamados Inibidores de CDK (ICKs) ou proteínas relacionadas com KIP (KRPs). Sete membros da família de ICK foram identificados os quais mais intimamente se assemelha à família de CIP/KIP de CKIs. Cada um destes membros da família de ICK/KRP tem identidade de sequência de aminoácido elevada a p27^{KIP1} porém a identidade é limitada à maioria dos 30 aminoácidos C-terminais. Até hoje, nenhum CKIs relacionado com INK foi identificado em qualquer planta.

A superexpressão de ciclinas ou nocautes de CKI ilustra que a construção de ciclo celular bem-equilibrada pode ser perturbada facilmente em mamíferos. Este desequilíbrio pode definitivamente levar a ciclos celulares acelerados, tamanho de animal aumentado e/ou desenvolvimento de tumor. Reduzir ou eliminar completamente a "atividade" de CKI resulta em atividade de ciclina/CDK cinase aumentada. Esta atividade aumentada resulta na fosforilação de alvos a jusante necessários para progressão de ciclo celular, e os animais finalmente produzem hiperproliferação de célula (Cobre e outros, *Science*. 272:877-880, 1996). A deleção do gene p27^{KIP1} em ca-

mundongos resulta em camundongos maiores devido a atividade de ciclina/cdk excessiva que leva proliferação de célula excessiva (Fero e outros, Cell 85:733-744, 1996; Kiyokawa e outros, Cell 85:721-732, 1996; Nakayama e outros, Cell 85:707 - 720, 1996).

5 Os mecanismos existem para suprimir a expressão de vários membros da família de KRP. O silenciamento de gene pós-transcricional (PTGS) em plantas é um mecanismo de degradação de RNA similar à interferência de RNA (RNAi) em animais. RNAi resulta na degradação específica de RNA de filamento duplo (dsRNA) em fragmentos de dsRNA de 21-23 bp
10 curtos que finalmente desempenham um papel na degradação de uma população de RNAs homólogos. Nas plantas, PTGS usa uma estratégia de repetições invertidas (IR) para suprimir a expressão de gene em muitas espécies de plantas incluindo plantas de colheita tal como milho, soja e colza para designar algumas. Entretanto, a tecnologia de IR tem várias desvantagens
15 tal como a eficiência da seqüência de IR, regulamento de gene alvo distante (Jackson e outros, Nature Biotech. 21:635-637, 2003), silenciamento transitório, estabilidade de IR completa, e similares. Estas desvantagens são compostas no caso presente pela necessidade de silenciar mais de um gene de cada vez.

20 A reprodução de planta convencional foi a força motriz de princípio para produções de colheita aumentada durante os últimos 75 anos (J. Fernandez-Cornejo, Agriculture Information Bulletin Nº. (AIB786) 81 pp, Fevereiro de 2004). Mais recentemente, as colheitas transgênicas ficaram disponíveis as quais, por exemplo, têm resistência a pestes de inseto herbicidas. Entretanto, estas colheitas transgênicas vêm com uma penalidade de
25 produção (Elmore e outros, Agron. J. 93:408-412, 2001; Elmore e outros, Agron. J. 93:404-407, 2001). Até hoje, nenhuma colheita transgênica conhecida está comercialmente disponível a qual tenha um aumento no tamanho de semente ou um aumento na produção de colheita.

30 Há uma necessidade na técnica para métodos melhorados de modificação das características de certas colheitas comercialmente valiosas, incluindo, por exemplo, porém sem limitação, aumento das produções de

colheita, aumento do tamanho de semente, aumento da taxa de germinação, aumento da massa da raiz, e similares. A presente invenção como descrito aqui, atende a estas e outras necessidades.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um polipeptídeo inibidor de cinase dependente de ciclina (CKI) de planta variante tendo pelo menos uma modificação com relação a um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre. Em certas modalidades, as modificações estão dentro da região de ligação de CDK de modo a conferir, com relação à proteína de CKI tipo silvestre, afinidade
10 modificada de ligação para proteína de CDK, ao mesmo tempo em que substancialmente mantendo afinidade de ligação a uma proteína de ciclina. Os polipeptídeos de CKI variantes da presente invenção têm atividade antagonista negativa dominante contra função de CKI tipo silvestre. Quando a variante é expressa dentro de uma célula expressando a proteína de CKI
15 tipo silvestre correspondente, ou uma célula expressando um heterólogo de CKI tipo silvestre a proteína tipo silvestre correspondente porém substancialmente tendo função tipo silvestre equivalente com respeito à, inter alia, ligação de ciclina e CDK, a atividade biológica de CKI tipo silvestre é inibida, levando a progressão acelerada pelo ciclo celular e proliferação de célula
20 aumentada.

 Em outros aspectos, a presente invenção provê Ácido nucléico recombinante codificando um polipeptídeo de CKI variante, ou um vetor compreendendo e o ácido nucléico recombinante. O vetor ou ácido nucléico codificando CKI variante podem ser introduzidos em Célula hospedeira para
25 amplificação ou expressão do ácido nucléico. As células hospedeiras podem ser empregadas, por exemplo, em métodos da invenção para produzir os polipeptídeos de CKI variante. Além disso, a expressão do polipeptídeo de CKI variante em uma célula pode ser empregada em métodos da invenção para modular a divisão de célula. Por exemplo, a expressão de polipeptídeo
30 de CKI variante em uma célula pode levar a progressão acelerada pelo ciclo celular e proliferação de célula aumentada.

 Em ainda outros aspectos, a planta transgênica compreendendo

um transgene codificando o polipeptídeo de CKI variante é fornecida. Expressão do polipeptídeo de CKI variante em plantas transgênicas pode ser empregada em métodos da invenção para, por exemplo, aumentar o vigor da planta, aumentar a massa da raiz, aumentar o tamanho da planta, ou

5 aumentar a germinação precoce e similares.

DEFINIÇÕES

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos empregados aqui têm o mesmo significado como geralmente entendido por alguém versada na técnica a qual esta invenção pertence. Embora qualquer método e material similar àquele descrito aqui possa ser empregado na prática ou teste da presente invenção, somente métodos e materiais exemplares são descritos. Para propósitos da presente invenção, os seguintes termos são definidos abaixo.

10

Os termos "um", "uma" e "o", "a" como empregados aqui incluem referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

15

Como empregado aqui, o termo "inibidor de cinase dependente de ciclina" (também referido aqui como "inibidor de CDK" ou "CKI") refere-se a uma classe de proteínas que negativamente regula as cinases dependentes de ciclina (CDKs). Os CKIs tratáveis pela presente invenção são aqueles tendo regiões de polipeptídeo separadas capazes de independentemente ligar um ciclina e um CDK. Tais CKIs incluem, por exemplo, as famílias identificadas de CKIs de planta (os sete CKIs de Arabidopsis identificados), tendo homologia às Proteínas Inibidoras de Cinase (KJPs) em animais, referidas como proteínas relacionadas com KIP (KRPs) (também conhecido como

20

25 Inibidores de "CDKs, ou "TCKs").

Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são empregado aqui alternadamente para se referir a um polímero de resíduos de aminoácido.

O termo "ácido nucléico" se refere a deoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros destes na forma de filamento único ou duplo. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucléicos que contêm análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades

30

de ligação similares como o ácido nucléico de referência e são metabolizados de uma maneira similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que de outra maneira indicado, uma sequência de ácido nucléico particular também implicitamente abrange variante modificada de modo conservador destes (por exemplo, substituições de códon degeneradas). Especificamente, as substituições de códon degeneradas podem ser obtidas gerando seqüências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com resíduos de deoxiinosina e/ou base misturada (vide, por exemplo, Batzer e outros, *Nucleic Acid. Res* 19:5081, 1991; Ohtsuka e outros, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; Rossolini e outros, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). O termo ácido nucléico é alternadamente empregado com gene, cDNA, e mRNA codificado por um gene.

O termo "de ocorrência natural", no contexto de polipeptídeos de CKI e ácidos nucléicos, significa um polipeptídeo ou ácido nucléico que tem uma seqüência de aminoácido ou nucleotídeo que é encontrada em natura, isto é, uma seqüência de aminoácido ou nucleotídeo que possa ser isoladas de uma fonte em natura (um organismo) e que não tenha sido modificado intencionalmente através de intervenção humana. Como empregado aqui, as linhagens de laboratório de plantas que podem ter sido seletivamente criadas de acordo com genéticas clássicas são consideradas plantas de ocorrência natural.

Como empregado aqui, "gene de CKI tipo silvestre" ou "ácido nucléico de CKI tipo silvestre" se refere a uma seqüência de ácido nucléico, correspondendo a um loco genético de CKI no genoma de um organismo, que codifica um produto de gene que realiza a função normal da proteína de CKI codificada por uma seqüência de nucleotídeo de ocorrência natural que corresponda ao loco genético. Um loco genético pode ter mais de uma seqüência ou alelo em uma população de indivíduos, e o termo "tipo silvestre" abrange todos tais alelos de ocorrência natural que codificam um produto de gene que realiza a função normal. "Tipo silvestre" também abrange seqüências de gene que não são necessariamente de ocorrência natural, porém que ainda codificam um produto de gene com função normal (por exemplo,

genes tendo mutações silenciosas ou codificando proteínas com substituições conservadoras).

O termo "polipeptídeo de CKI tipo silvestre" ou "proteína de CKI tipo silvestre" se refere a um polipeptídeo de CKI codificado por um gene de tipo silvestre. Um loco genético pode ter mais de uma seqüência ou alelo em uma população de indivíduos, e o termo "tipo silvestre" abrange todos tais alelos de ocorrência natural que codificam um produto de gene que realiza a função normal.

O termo "mutante" ou "variante", no contexto de ácidos nucléico e polipeptídeos de CKI da presente invenção, significa um polipeptídeo ou ácido nucléico que é modificado com relação a um polipeptídeo ou ácido nucléico tipo silvestre correspondente.

O termo "polipeptídeo de CKI referência" é um termo empregado aqui para propósitos de definir um polipeptídeo de CKI mutante ou variante: o termo se refere a um polipeptídeo de CKI ao qual um de de polipeptídeo de CKI mutante é comparado para propósitos de definir modificações em seqüência de aminoácido. Desse modo, um polipeptídeo de CKI mutante "compreendendo uma seqüência de aminoácido CKI tendo pelo menos uma modificação com relação a um polipeptídeo de CKI de referência" significa que, com exceção da uma ou mais modificações de aminoácido, polipeptídeo de CKI mutante de outro modo compreende a seqüência de aminoácido do polipeptídeo de referência. Ao realizar a presente invenção como descrito aqui, os polipeptídeos de CKI de referência são predeterminados. Um polipeptídeo de CKI de referência pode ser, por exemplo, um polipeptídeo de CKI de ocorrência natural e/ou tipo silvestre, ou um polipeptídeo de CKI que tenha sido intencionalmente modificado.

O termo "ligação modificada" ou "ligação alterada" se refere a um polipeptídeo de CKI mutante codificado por um gene de tipo silvestre cujo polipeptídeo de CKI de referência liga um complexo de ciclina/CDK. Pelo termo "ligação modificada" ou "ligação alterada" aqui se refere à ligação do CKI mutante ao complexo de ciclina/CDK cinase. O termo "ligação modificada" ou "ligação alterada" se refere ao Polipeptídeo de ligação relativo de

CKI mutante comparado ao polipeptídeo de CKI de referência. "Ligação modificada" ou "ligação alterada" pode se referir a um polipeptídeo de CKI mutante que tem ligação igual, ligação reduzida, ou ligação equivalente ao complexo de ciclina/CDK comparado ao polipeptídeo de CKI de referência.

5 "Recombinante" como empregado aqui se refere a uma seqüência de aminoácido ou uma seqüência de nucleotídeo que tenha sido modificada intencionalmente através de métodos recombinantes. Pelo termo "ácido nucléico recombinante" aqui é entendido um ácido nucléico, originalmente formou *in vitro*, em geral, pela manipulação de um ácido nucléico através
10 de endonucleases, em uma forma não normalmente encontrada em natura. Desse modo, um ácido nucléico de CKI variante ou mutante isolado, em uma forma linear, ou um vetor de expressão formado *in vitro* através de moléculas de DNA de ligação que não são normalmente unidas, são ambos considerados recombinantes para os propósitos desta invenção. É entendido que
15 uma vez que um ácido nucléico recombinante é feito e reintroduzido no organismo ou célula hospedeira, ele replicará não recombinantemente, isto é, empregando a maquinaria celular *in vivo* da célula hospedeira no lugar de manipulações *in vitro*; entretanto, tais ácidos nucléicos, uma vez produzidos recombinantemente, embora subsequente replicados não recombinantemente, ainda são considerados recombinantes para o propósitos da invenção. Uma "proteína recombinante" é uma proteína feita empregando técnicas recombinantes, isto é, pela expressão de um ácido nucléico recombinante como descrito acima. Uma proteína recombinante é distinta de proteína de ocorrência natural através de pelo menos uma ou mais características.

25 Com respeito aos aminoácidos, uma modificação "não conservadora" significa uma modificação na qual o resíduo tipo silvestre e o resíduo mutante diferem significativamente em uma ou mais propriedades físicas, incluindo hidrofobicidade, carga, tamanho e forma. Por exemplo, as modificações de um resíduo polar para um resíduo não polar ou vice-versa,
30 as modificações de resíduos positivamente carregados para resíduos negativamente carregados ou vice-versa, as modificações de resíduos grandes para resíduos pequenos ou vice-versa são modificações não conservadoras.

Por exemplo, as substituições podem ser feitas as quais significativamente afetam: a estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da alteração, por exemplo, a estrutura alfa-helicoidal ou beta-folha; a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio-alvo; ou o volume da cadeia lateral. As substituições que em geral são esperadas produzir as maiores alterações nas propriedades do polipeptídeo são aquelas nas quais (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serila ou treonila, é substituído por um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucila, isoleucila, fenilalanila, valila ou alanila; (b) uma cisteína ou prolina é substituída por qualquer outro resíduo; (c) um resíduo tendo uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisila, arginila, ou histidila, é substituída por um resíduo eletronegativo, por exemplo, glutamila ou aspartila; ou (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituída por um não tendo uma cadeia lateral, por exemplo, glicina.

As modificações conservadoras geralmente são aquelas mostradas abaixo, entretanto, como é conhecido na técnica, outras substituições podem ser consideradas conservadoras.

	Ala:	Ser
	Arg:	Lys
	Asn:	Gln, His,
20	Asp:	Glu
	Cys:	Ser
	Gln:	Asn
	Glu:	Asp
	Gly:	Pro
25	His:	Asn, Gln,
	He:	Leu, Val,
	Leu:	He, Val,
	Lys:	Arg, Gln, Glu
	Met:	Leu, He,
30	Phe:	Met, Leu, Tyr,
	Ser:	Thr
	Thr:	Ser

Tip: Tyr
 Tyr: Trp, Phe,
 Val: He, Leu,

O termo "dominante negativo", no contexto de mecanismo de
 5 proteína de fenótipo de ação ou gene, se refere a uma proteína mutante ou
 variante, ou o gene codificando a proteína mutante ou variante, que substancialmente previne uma proteína correspondente tendo função tipo silvestre de realizar a função tipo silvestre.

A frase "antagonista de um CKI tipo silvestre" como empregado
 10 aqui significa que um polipeptídeo de CKI mutante significativamente diminui
 (inibe) a capacidade de um polipeptídeo CKI de tipo silvestre inibir a atividade de cinase de complexos de CDK/ciclina quando comparado com a inibição de atividade de cinase pelo polipeptídeo de CKI tipo silvestre na ausência do antagonista.

Um ácido nucléico é "operavelmente ligado" quando é colocado
 15 em uma relação funcional com outra seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, um promotor ou realçador é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se afetar a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossoma é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se
 20 posicionado para facilitar a translação.

O termo "planta" inclui plantas inteiras, órgãos de planta (por exemplo, folhas, troncos, flores, raízes, e similares), sementes e células de planta (incluindo células de cultura de tecido) e progênie destes. A classe de plantas que pode ser empregada nos métodos da invenção geralmente é tão
 25 ampla quanto à classe de plantas mais altas tratáveis para técnicas de transformação, incluindo gimnospermas e angiospermas, ambas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, bem como certas plantas mais baixas tal como algas. São incluídas plantas de uma variedade de níveis de ploidia, incluindo poliplóide, diplóide e haplóide. Os exemplos de angiospermas monocotiledô-
 30 neos incluem, por exemplo, aspargo, campo e milho verde, cevada, trigo, arroz, sorgo, cana de açúcar, cebola, milho miúdo, centeio e aveias e outro grãos de cereal. Os exemplos de angiospermas dicotiledôneas incluem, po-

rém não estão limitados, tomate, tabaco, algodão, semente de colza (Canola), camelina, fava, soja, pimentas, alface, e similares. Os exemplos de espécies lenhosas incluem álamo, anseie, cedro, carvalho, abeto, e similares.

5 Uma "seqüência de heteróloga" é uma que se origina de uma espécie diferente, ou, se da mesma espécie, é substancialmente modificada de sua forma original. Por exemplo, um promotor heterólogo operavelmente unido a um gene estrutural é de uma espécie diferente daquela da qual o gene estrutural foi derivado, ou, se da mesma espécie, é substancialmente modificado de sua forma original.

10 O termo "vetor" se refere a um pedaço de DNA, tipicamente de filamento duplo, que pode ter inserido nele um pedaço de DNA estrangeiro. O vetor ou réplicon pode ser, por exemplo, de origem de plasmídeo ou viral. Vetores contêm seqüências de polinucleotídeo de "réplicon" que facilitam a replicação autônoma do vetor em uma célula hospedeira. O termo "réplicon"

15 no contexto desta descrição também inclui regiões de seqüência de polinucleotídeo que miram ou de outro modo facilitam a recombinação de seqüências de vetor em um cromossomo hospedeiro. Além disso, ao mesmo tempo em que o DNA estrangeiro pode ser inserido inicialmente em, por exemplo, um vetor de vírus de DNA, a transformação do DNA de vetor viral em célula

20 hospedeira pode resultar na conversão do DNA viral em uma molécula de vetor de RNA viral. O DNA estrangeiro está definido como DNA heterólogo, que é o DNA não naturalmente encontrado na célula hospedeira que, por exemplo, replica a molécula de vetor, codifica um transgene ou marcador selecionável ou avaliável. O vetor é empregado para transportar o DNA estrangeiro ou heterólogo em uma célula hospedeira adequada. Uma vez na

25 célula hospedeira, o vetor pode replicar independentemente de ou coincidente com o DNA cromossômico hospedeiro, e várias cópias do vetor e seu DNA inserido podem ser gerados. Alternativamente, vetor do podem alvejar a inserção do DNA estrangeiro ou heterólogo em um cromossomo hospedeiro.

30 Além disso, o vetor também pode conter os elementos necessários que permitem a transcrição do DNA inserido em uma molécula de mRNA ou de outro modo causar a replicação do DNA inserido em cópias múltiplas de

RNA. Alguns vetores de expressão adicionalmente contêm elementos de seqüência adjacentes ao DNA inserido que permite a translação do mRNA em uma molécula de proteína. Muitas moléculas de mRNA e polipeptídeo codificados pelo DNA inserido podem desse modo ser rapidamente sintetizados.

O termo "vetor de transgene" se refere a um vetor que contém um segmento inserido de DNA, o "transgene", que é transcrito em mRNA ou replicado como um RNA dentro de uma célula hospedeira. O termo "transgene" se refere não somente àquela porção de DNA inserido que é convertido em RNA, porém também aquelas porções de vetor que são necessárias para a transcrição ou replicação do RNA. Além disso, um transgene necessariamente não precisa compreender uma seqüência de polinucleotídeo que contém uma estrutura de leitura aberta capaz de produzir uma proteína.

Os termos "célula hospedeira transformada", "transformado", e "transformação" se referem à introdução de DNA em uma célula. A célula é chamada uma "célula hospedeira", e pode ser uma célula procariótica ou uma célula eucariótica. As células hospedeiras procarióticas típicas incluem várias linhagens de *E. coli*. As células hospedeiras eucarióticas típicas, são células de planta (por exemplo, células de semente de colza, soja, arroz, ou milho e similares), células de levedura, células de inseto, ou células de animais. O DNA introduzido está normalmente na forma de um vetor que contém um pedaço inserto de DNA. A seqüência de DNA introduzida pode ser da mesma espécie como a célula hospedeira ou de uma espécie diferente da célula hospedeira, ou pode ser uma seqüência de DNA híbrida, contendo alguns DNA estrangeiros e alguns DNA derivados das espécies hospedeiras.

No contexto de polipeptídeos de CKI e ácidos nucléicos e, "correspondência" a outra seqüência (por exemplo, posições de regiões, fragmentos, nucleotídeos ou aminoácido, ou similares) é com base na convenção da numeração de acordo com a posição de nucleotídeo ou aminoácido, e em seguida alinhando as seqüências de uma maneira que maximize o número de nucleotídeos ou aminoácido que se igualam em cada posição,

isto é, de uma maneira que maximize o percentual de identidade de sequência. Uma vez que nem todas as posições com uma determinada "região correspondente" necessitam ser idêntica, as posições não combinantes dentro de uma região correspondente podem ser consideradas como "posições correspondentes". Conseqüentemente, como empregado aqui, a indicação a uma "posição de aminoácido que corresponde a posição de aminoácido X" de um polipeptídeo CKI especificado representa indicação a uma coleção de posições equivalentes em outros polipeptídeos de CKI reconhecidos e famílias e homólogos estruturais.

10 Em uma modalidade típica da presente invenção, relativa a superfamília de KRP de polipeptídeos de CKI e ácidos nucléico, "correspondência" de posições de aminoácido ou nucleotídeo é tipicamente determinada com respeito aos aminoácidos dentro da região de ligação de CDK, ou nucleotídeos codificando a região de ligação de CDK. Geralmente, quando comparado com outras regiões de polipeptídeos de KRP, a região de ligação de CDKs de KRP CKIs compartilham similaridade ou identidade de sequência substancial. Desse modo, uma técnica adequada para determinar a região de ligação de CDK de um polipeptídeo de CKI de KRP é identificar uma região de aminoácido que compartilha similaridade ou identidade de sequência substancial com uma região de ligação de CDK conhecida de um segundo CKI de KRP (por exemplo, de cerca de 145-168 posições de aminoácido de *Brassica napus* Krp1 (Bn Krp1)). (Vide, por exemplo, figura 1, mostrando um alinhamento de sequência de aminoácido de vários membros da família de CKI com BnKrp1). Uma vez que uma sequência que corresponde a uma região de ligação de CDK foi determinada por alinhamento de sequência, posições de nucleotídeo ou aminoácido correspondentes podem ser determinadas adequadamente.

 Como empregado aqui, "porcentagem de identidade de sequência" é determinada comparando-se duas seqüências idealmente alinhadas sobre uma janela de comparação, onde a porção da seqüência na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, intervalos) quando comparada à seqüência de referência (que não compreende adições

ou deleções) para alinhamento ideal das duas seqüências. A porcentagem é calculada determinando-se o número de posições nas quais a base de ácido nucléico idêntica ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas as seqüências para produzir o número de posições emparelhadas, dividindo o número de posições emparelhadas pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de seqüência.

Os termos "idêntico" ou percentual de "identidade", no contexto de dois ou mais ácidos nucléico ou seqüências de polipeptídeo, se refere a duas ou mais seqüências ou subseqüências que são iguais ou têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácido que são as mesmas (por exemplo, 60% de identidade, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de identidade sobre uma região especificada), quando comparada e alinhada para correspondência máxima sobre uma janela de comparação, ou uma região designada, quando medida empregando um dos seguintes algoritmos de comparação de seqüência, ou por alinhamento manual e inspeção visual. As seqüências são "substancialmente idênticas" a cada outra se elas são pelo menos cerca de 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, ou pelo menos 55% idênticas. Estas definições também se referem ao complemento de uma seqüência de teste. Opcionalmente, a identidade existe sobre uma região de polipeptídeo que é pelo menos cerca de 6 resíduos de aminoácidos em comprimento, pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 25 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 35 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 50 resíduos de aminoácido em comprimento, ou pelo menos cerca de 100 ou mais aminoácidos em comprimento, ou sobre uma região de ácido nucléico codificando uma tal região de polipeptídeo. Em certos aspectos preferidos da presente invenção, uma região designada para comparação é uma região de ligação de CDK de um polipeptídeo de CKI, uma região de polipeptídeo compreendendo uma porção de uma tal região de ligação de CDK, ou uma região de polipeptídeo compreendendo

uma tal região de ligação de CDK.

Os termos "similaridade" ou "percentual de similaridade", no contexto de duas ou mais seqüências de polipeptídeo, se referem a duas ou mais seqüências ou subseqüências que têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido que são ou iguais ou similares como definido por uma substituição de aminoácido conservadora (por exemplo, 60% de similaridade, opcionalmente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% similar sobre uma região especificada), quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação, ou região designada quando medida empregando um dos seguintes algoritmos de comparação de seqüência ou por alinhamento manual e inspeção visual. As seqüências são "substancialmente similares" a uma outra se elas são pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, ou pelo menos 55% similares a uma outra. Opcionalmente, esta similaridade existe sobre uma região que é pelo menos cerca de 6 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 25 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 35 resíduos de aminoácido em comprimento, pelo menos cerca de 50 resíduos de aminoácido em comprimento, ou pelo menos cerca de 100 ou mais aminoácidos em comprimento.

Em certos aspectos da presente invenção, para determinação de identidade ou similaridade de seqüência, uma região designada para comparação é a região de ligação de CDK de um polipeptídeo CK-I, uma região de polipeptídeo compreendendo uma porção de uma tal região de ligação de CDK, ou uma região de polipeptídeo compreendendo uma tal região de ligação de CDK.

Para comparação de seqüência, tipicamente uma seqüência atua como uma seqüência de referência, para que as seqüências de teste sejam comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de seqüência, seqüências de teste e referência são entradas em um computador, são designadas coordenadas de subseqüência, se necessário, e os parâmetros de

programa de algoritmo de seqüência são designados. Os parâmetros de programa de *default* podem ser empregados, ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de seqüência então calcula a porcentagem de similaridade ou identidade de seqüência para as seqüências de teste com relação à seqüência de referência, com base nos parâmetros do programa.

Uma "janela de comparação", como empregado aqui, inclui referência a um segmento de posições de aminoácido ou nucleotídeo contíguas nas quais uma seqüência pode ser comparada a uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas seqüências serem idealmente alinhadas. Com respeito à comparação de polipeptídeos de CKI de acordo com a presente invenção, uma janela de comparação é tipicamente de cerca de 6 a cerca de 200 ou mais aminoácidos contíguos, tipicamente cerca de 6 a cerca de 50, cerca de 6 a cerca de 25, cerca de 15 a cerca de 100, cerca de 15 a cerca de 50, cerca de 15 a cerca de 30, cerca de 20 a cerca de 50, ou cerca de 25 a cerca de 50 aminoácidos contíguos. Os métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem-conhecidos na técnica. O alinhamento ideal de seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (Adv. Appl Math. 2:482, 1970), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), pela pesquisa para método de similaridade de Pearson e Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, W.s.), ou por alinhamento manual e inspeção visual (vide, por exemplo, Ausubel e outro, Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)).

Um exemplo de um algoritmo útil é PILEUP. PILEUP cria um alinhamento de seqüência múltiplo de um grupo de seqüências relacionadas que usam alinhamentos progressivos, em pares para mostrar a relação e porcentagem de identidade de seqüência. Também plota uma árvore ou

dendograma que mostra a relação de agrupamento empregada para criar o alinhamento. PILEUP usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng e Doolittle (J Mol. Evol. 35:351-360, 1987). O método empregado é similar ao método descrito por Higgins e Sharp (CABIOS 5:151-153, 1989). O programa pode alinhar até 300 seqüências, cada um de um comprimento máximo de 5.000 nucleotídeos ou aminoácidos. O procedimento de alinhamento múltiplo começa com o alinhamento em par das duas seqüências mais similares, produzindo um agrupamento de duas seqüências alinhadas. Este agrupamento é então alinhado à próxima seqüência mais relacionada ou agrupamento de seqüências alinhadas. Dois agrupamentos de seqüência são alinhados por uma extensão simples do alinhamento em par de duas seqüências individuais. O alinhamento final é obtido por uma série alinhamentos progressivos, em pares. O programa é executado designando seqüências específicas e as suas coordenadas de aminoácido ou nucleotídeo para regiões de comparação de seqüência e designando os parâmetros de programa. Ao empregar PILEUP, uma seqüência de referência é comparada a outras seqüências de teste para determinar a porcentagem de relação de identidade de seqüência que usa os seguintes parâmetros: peso de abertura de *default* (3,00), peso de comprimento de abertura de *default* (0,10), e aberturas de extremidades pesadas. PILEUP pode ser obtido do pacote de software de análise de seqüência GCG (por exemplo, versão 7.0 (Devereaux e outros, Nucl. Acids. Res. 12:387-395, 1984).

Outro exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a porcentagem de identidade de seqüência e similaridade de seqüência, são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul e outros (Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1977), e Altschul e outro (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990), respectivamente. O software para realizar análises de BLAST está publicamente disponível pelo Centro Nacional para Informação de Biotecnologia. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de seqüência de classificação elevada (HSPs) identificando-se as palavras de tamanho curto W na seqüência de questão, que ou comparam ou satisfazem mais escore T de limiar de valor mais positivo T quando alinhado com uma

palavra do mesmo tamanho em uma seqüência de banco de dados. T é referido como o limiar de classificação de palavra vizinha (Altschul e outros, supra). Estas buscas de palavras vizinhas iniciais atuam como sementes para iniciar as pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo-as. As buscas de palavra são estendidas em ambas as direções ao longo de cada seqüência contanto que o escore de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados empregando, para seqüências de nucleotídeo, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos em par; sempre > 0) e N (escore de penalidade para resíduos de má combinação; sempre < 0). Para seqüências de aminoácido, uma matriz de classificação é empregada para calcular o escore cumulativo. A extensão da busca de palavra em cada direção é parada quando: o escore de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X de seu valor máximo obtido; o escore cumulativo vai para zero ou abaixo, devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduo de classificação negativa; ou o final de qualquer seqüência é alcançado. Os parâmetros de algoritmo de BLAST W , T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programam BLASTN (para seqüências de nucleotídeo) usa como *default* um tamanho de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) ou 10, $M = 5$, $N = -4$ e uma comparação de ambas linhagens. Para seqüências de aminoácido, o programam BLASTP usa como *defaults* um tamanho de palavra de 3, e expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação BLOSUM62 (vide, Henikoff e Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915-10919, 1992) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, e uma comparação de ambas linhagens.

O algoritmo de BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências (vide, por exemplo, Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:5873-5887, 1993). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo de BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)) que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre duas seqüências de nucleotídeo ou aminoácido ocorreria por casualidade. Por exemplo, um ácido nucléico é considerado similar a uma se-

qüência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação do ácido nucléico de teste com o ácido nucléico de referência for menor do que cerca de 0,2, tipicamente menor do que cerca de 0,01, e mais tipicamente menor do que cerca de 0,001.

- 5 Os homólogos ou ortólogos de gene podem também ser identificados empregando o recurso de HomoloGene do Centro Nacional para Informação de Biotecnologia (NCBI). Um homólogo ou ortólogo de um primeiro gene pode codificar um produto de gene que tem a mesma função ou uma função similar como o produto de gene codificado pelo primeiro gene. Outra
- 10 indicação que duas seqüências de ácido nucléico ou polipeptídeos são ortólogas é que o gene heterólogo pode complementar (por exemplo, auxiliar) um alelo nulo do gene endógeno em um sistema de expressão de célula eucariótica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

- 15 A figura 1 mostra um alinhamento de seqüência de aminoácido dos membros da família de KRP de Arabidopsis com os membros da família de Brassica Krp. As seqüências foram obtidas do Arabidopsis KRPs do banco de dados público: AtKrp1 (Genbank Nº. U94772) (SEQ ID NO:2); AtKrp2 (Genbank Nº. CAB76424) (SEQ ID NO:3); AtKrp3 (Genbank No.CAC41617)
- 20 (SEQ ID NO:4); AtKip4 (Genbank Nº. CAC41618) (SEQ ID NO:5); AtKrp5 (Genbank Nº. CAC41619) (SEQ ID NO:6); AtKrp. (Genbank Nº. CAC41620) (SEQ ID NO:7); e AtKrp7 (Genbank No. CAC41621) (SEQ ID NO:8). As seqüências para os KRPs de Brassica (BnKrp1 (SEQ ID NO:68), BnKrp3 (SEQ ID NO:69), BnK.4 (SEQ ID NO:70), BnKrp5 (SEQ ID NO:71), e BnKrp. (SEQ
- 25 ID NO:72)) foram obtidas como descrito no Exemplo 1, infra. Também mostrada é a seqüência de aminoácido para p27 (SEQ ID NO:73).

- A figura 2 mostra um alinhamento de seqüência de aminoácido de domínios de ligação de CDK e ciclina de milho (SEQ ID NO:9), canola, soja (SEQ ID NO:11), álamo (SEQ ID NO:12), tabaco (SEQ ID NO:13), trigo,
- 30 arroz (SEQ ID NO:15), e batata (SEQ ID NO:16), ilustrando o grau elevado de identidade de seqüência dentro do domínio de ligação de CDK.

A figura 3 mostra as seqüências de ácido nucléico de BnKrp1

mutante que foram códon otimizado para expressão em milho, codificando para ou BnKrpl F151 A;153A (SEQ ID NO:74) ou BnKrpl Y149A; F151A; F153A (SEQ ID NO:75).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- 5 A presente invenção compreende composições e métodos para modular a divisão de célula de planta. Em particular, são fornecidos polipeptídeos que antagonizam a função da proteína de CKI tipo silvestre por um mecanismo negativo dominante, como também polinucleotídeos relacionados, células hospedeiras, plantas transgênicas, e métodos para uso destes.
- 10 Uma ampla variedade de vetores transgênicos, contendo um polinucleotídeo codificando uma variante, polipeptídeo de CKI negativo dominante, pode ser empregada para praticar a presente invenção. Quando os transgenes de CKI da presente invenção são introduzidos em plantas e expressados, a divisão de célula de planta é modulada. A modulação de divisão de célula pode o-
- 15 correr em toda a planta ou em um tecido ou órgão de maneira específica dependendo do tipo de sequência promotora operavelmente ligada ao transgene de CKI variante. Em particular, as composições e métodos fornecidos aqui podem ser empregados para acelerar a progressão de células de planta pelo ciclo celular, com um aumento concomitante na proliferação celular.
- 20 Usar as composições e métodos desta maneira permite, por exemplo, a geração de produções de colheita e/ou tamanho de semente aumentados em quaisquer de uma ampla variedade de plantas. Um aumento na produção de colheita pode incluir, por exemplo, tecido de folha aumentado, fruto aumentado, produção de flor aumentada, massa de raiz aumentada, e similares.
- 25 Em modalidades particulares da invenção, o polipeptídeo de CKI variante é um membro da família de KRP. Este aspecto da presente invenção é com base, pelo menos em parte, na descoberta que a região de ligação de CDK de membros da família de KRP, é principalmente responsáveis pela inibição de complexos de ciclina-CDK. Desse modo, alvejar a região de
- 30 ligação de CDK em membros da família de KRP (quando oposto à região de ligação de ciclina) permite a geração de proteínas mutante que são antagonistas negativos dominantes particularmente eficazes de função de CKI tipo

silvestre.

Polipectídeos de CKI Mutantes, Ácidos Nucléicos, e Vetores

Os polipeptídeos de CKI da presente invenção são proteínas mutantes ou variantes distinguíveis de CKIs de ocorrência natural ou tipo silvestre. Os polipeptídeos de CKI variantes compreendem pelo menos uma modificação, com relação a um polipeptídeo de CKI de referência (por exemplo, uma proteína de CKI tipo silvestre), na região de ligação de ciclina ou CDK da proteína. As modificações típicas incluem substituições, inserções, e/ou deleções de aminoácido quando comparado à sequência tipo silvestre correspondente. As modificações particularmente adequadas são substituições de aminoácido. Em certas modalidades, o polipeptídeo de CKI variante compreende pelo menos uma modificação não conservadora (por exemplo, uma substituição).

Os polipeptídeos de CKI mutante da presente invenção são proteínas negativas dominantes. A abordagem negativa dominante é particularmente tratável por polipeptídeos de CKI que tem duas regiões de polipeptídeo separadamente envolvidas em ligação de CDK e ciclina. A abordagem geral para criar os mutantes negativos dominantes da presente invenção inclui modificar uma das regiões de ligação de ciclina e CDK individuais para modificar a ligação de ciclina ou CDK "tipo silvestre". Esta região de ligação de CDK ou ciclina modificada pode resultar em ligação equivalente, reduzida ou eliminada a ciclina ou CDK comparado com polipeptídeo tipo silvestre. Em qualquer caso, a mutação reduziria ou eliminaria a atividade inibidora de CKIs cinase, além de designar um polipeptídeo de CKI negativo dominante que pode interferir com a função tipo silvestre, o polipeptídeo mutante deve (1) substancialmente se ligar aos complexos de ciclina/CDK; (2) não substancialmente inibir o complexo de CDK ciclina até mesmo em concentrações elevadas; e (3) competir com polipeptídeo de CKI do tipo silvestre para se ligar ao complexo de ciclina/CDK. Em vivo, os polipeptídeos de CKI mutante que cumprem todas estas exigências resultam em atividade de ciclina/CDK cinase elevada na célula, que sucessivamente leva a proliferação de célula aumentada e um índice mitótico mais elevado que no final das contas leva

às plantas com produção aumentada, sementes maiores, e/ou algumas outras características associadas com uma atividade de ciclina/CDK cinase elevada em uma ou mais regiões da planta.

No caso particular de polipeptídeos de KRP, a região de ligação de CDK, que é principalmente responsável pela inibição de ciclina/CDK cinase nesta família de polipeptídeos de CKI, é alvejada para modificação.

As modificações particularmente adequadas incluem substituições, inserções, ou deleções de aminoácido. Por exemplo, as substituições de aminoácido podem ser geradas como modificações no CDK ou na região de ligação de ciclina que reduz ou elimina a ligação. Similarmente, as substituições de aminoácido podem ser geradas como modificações no CDK ou na região de ligação de ciclina que reduzem ou eliminam a atividade inibidora de CKI. Em modalidades típicas, pelo menos uma substituição, inserção, ou deleção de aminoácido não conservador no CDK ou na região de ligação de ciclina é feita para romper ou modificar a ligação do polipeptídeo de CKI a uma proteína de ciclina ou CDK.

Os polipeptídeos de CKI mutantes substitucionais são aqueles que têm pelo menos um resíduo de aminoácido em uma sequência de proteína de CKI de referência removida e um aminoácido diferente inserido em seu lugar na mesma posição. As substituições podem ser únicas, onde somente um aminoácido na molécula foi substituído, ou elas podem ser múltiplas, onde dois ou mais aminoácidos foram substituídos na mesma molécula. As alterações significativas na atividade das moléculas de proteína de CKI da presente invenção podem ser obtidas substituindo-se um aminoácido com outro cuja cadeia lateral seja significativamente diferente na carga e/ou estrutura daquela do aminoácido nativo, um aminoácido com uma carga oposta daquela do aminoácido nativo, ou um aminoácido com a hidrofobicidade oposta daquela do aminoácido nativo, e outro. Estes tipos de substituições seriam esperados afetar a estrutura da cadeia principal de polipeptídeo e/ou da carga ou hidrofobicidade da molécula na área da substituição. Em certas, modalidades exemplares da presente invenção, um CKI mutante substitucional inclui a substituição de um resíduo de não alanina com alani-

na. Em outras variações, o CKI substitucional inclui substituição de um resíduo de aminoácido com, por exemplo, um aminoácido opostamente carregado, um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral maior, um aminoácido com a hidrofiliçidade oposta, um aminoácido não polar pequeno (por exemplo, Cys, Thr, Ser, Ala, ou Gly), ou um aminoácido polar (por exemplo, Pro, Glu, Asp, Asn, ou Gln).

Os polipeptídeo de CKI mutantes insercionais são aqueles com um ou mais aminoácidos inseridos imediatamente adjacente a um aminoácido em uma posição particular na molécula de proteína de CKI de referência. Imediatamente adjacente a um aminoácido, significa conectado a grupo α -carbóxi ou α -amino funcional do aminoácido. A inserção pode ser um ou mais aminoácidos. A inserção pode consistir, por exemplo, em um ou dois aminoácidos conservadores. Os aminoácidos similares na carga e/ou estrutura aos aminoácidos adjacentes ao sítio de inserção são definidos como conservadores. Alternativamente, CKI mutante inclui a inserção de um aminoácido com uma carga e/ou estrutura que seja substancialmente diferente dos aminoácidos adjacentes ao sítio de inserção.

Os polipeptídeos de CKI mutantes delecionais são aqueles onde um ou mais aminoácidos nas moléculas de proteína de CKI de referência foram removidos, em algumas modalidades, os mutantes delecionais terão um, dois ou mais aminoácidos deletados em uma região particular da molécula de proteína de CKI. Os mutantes delecionais podem incluir, por exemplo, mutantes tendo uma truncação da amino ou carbóxi terminação.

Os métodos da presente invenção podem ser aplicados a qualquer membro reconhecido da família de CKI de proteínas nas quais regiões individuais são envolvidas na ligação de proteínas de ciclina e CDK para inibir a função de CDK. Em uma modalidade, as proteínas de CKI mutantes são mutações ou variantes de proteínas que pertencem à família de KRP de CKIs. Como notado acima, a região de ligação de CDK de membros da família de KRP é principalmente responsável pela inibição de cinase. Consequentemente, a região de ligação de CDK é preferivelmente alvejada para modificação no desígnio de polipeptídeos de CKI de KRP variante. A região

de ligação de CDK de proteínas de KRP geralmente corresponde aos aminoácidos 145-168 de Krp1 de *Brassica napus* (BnKrp1) (SEQ ID NO: 17). Em certas modalidades, a modificação da região de ligação de CDK de um membro da família de KRP compreende modificação de pelo menos uma

5 posição de aminoácido, duas posições de aminoácido, ou mais dentro da região que corresponde às posições 145-168 de BnKRP1. (A região correspondente em Krp1 de *Arabidopsis thaliana* compreende aminoácidos 167-190). As posições de aminoácido particularmente adequadas para modificação incluem aquelas posições que correspondem aos aminoácidos 145, 148,

10 149, 151, 153, 155, 163, 164, 165, e/ou 167 de Krp1 de *Brassica napus* (BnKrp1). Os resíduos de aminoácido correspondentes em outro polipeptídeo de CKI são facilmente determinados por alinhamento de seqüência que usa métodos conhecidos e como também descrito aqui.

Em cada caso, os aminoácidos mencionados acima são conservados em p27 de mamífero e todos contatam o CDK na estrutura cristalina

15 de p27complexo com Ciclina A e CDK2. Em uma modalidade, a modificação da região de ligação de CDK de KRP compreende modificação de aminoácidos que corresponde à posição de aminoácido 151 e 153 de BnKRP1 (por exemplo, uma substituição de aminoácido, tal como, por exemplo, por alanina ou um aminoácido de modo oposto carregado, em cada destes sítios).

20 Em outras variações exemplares, além de modificação de aminoácidos que correspondem às posições 151 e 153 de BnKRP1, a modificação da região de ligação de que CDK de KRP também inclui modificação(s) na posição (s) correspondendo ao aminoácido(s) 149, 164, e/ou 165 de BnKRP1 (por exemplo, uma substituição de aminoácido adicional em uma posição que

25 responde ao aminoácido 149 de BnKRP1; ou duas substituições de aminoácido adicionais nas posições que correspondem a ambos aminoácido 164 e aminoácido 165 de BnKRP1). Tal modificação(s) para o polipeptídeo de CKI de KRP modifica a afinidade de ligação a uma proteína de CDK, ao mesmo

30 tempo em que substancialmente preservando a capacidade da proteína variante de ligar uma proteína de ciclina.

A modificação da região de ligação de CDK de Krp de interesse

particular inclui, porém não está limitado, às modificações que correspondem a quaisquer das seguintes substituições de aminoácido:

- BnKrp1 F145A;Y149A
- BnKrp1 F145A;Y149A;F151A
- 5 BnKrp1 F145A;Y149A;F151A;F153A
- BnKrp1 Y149A;F151A
- BnKrp1 Y149A;F153A
- BnKrp1 F151A;F153A
- BnKrp1 F151A;F153A;Y149A
- 10 BnKrp1 F151A;F153A;E164A
- BnKrp1 F151A;F153A;W165A
- BnKrp1 F151A;F153A;E164A;W165A
- BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A
- BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;W165A
- 15 BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A;W165A
- BnKrp1 E164A;W165A

Em certas modalidades, o polipeptídeo de CKI modificado como acima é BnKrp1. Em outras variações, o CKI modificado como acima não é BnKrp1 (por exemplo, *Arabidopsis thaliana*), com os aminoácidos substituídos correspondendo àqueles apresentados acima.

Outras modificações (por exemplo, substituições, inserções, deleções) que afetam a ligação de CDK ou ciclina, incluindo modificações adicionais nos membros da família de KRP, podem ser identificadas empregando uma variedade de técnicas, incluindo métodos de alinhamento estrutural, métodos de alinhamento de sequência e similares. As proteínas mutantes ou variantes podem ser geradas, por exemplo, empregando um sistema PDA® previamente descrito nas Patentes dos Estados Unidos N^{os}. 6.188.965; 6.296.312; e 6.403.312; varredura de alanina (vide, Patente dos Estados Unidos N^o. 5.506.107), varredura de gene (WO 01/25277), mutagênese de saturação de sítio, campo médio, homologia de sequência, ou outros métodos conhecidos por aqueles versados na técnica que guiam a seleção de tipos e sítios de mutação de ponto, como descrito também descrito aqui pos-

teriormente.

As variantes de polipeptídeo de CKI da presente invenção podem ser construídas mutando-se as seqüências de DNA que codificam o CKI tipo silvestre correspondente, ou outro CKI correspondente do qual a variante seja derivada, tal como empregando técnicas geralmente referidas como mutagênese direcionada ao sítio. As moléculas de ácido nucléico codificando as proteínas de CKI podem ser mutadas por uma variedade de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) bem-conhecidas por alguém versado na técnica. (Vide, por exemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand, e J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) no Capítulo 14); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, e T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990). Além disso, os métodos de mutagênese químicos e/ou de radiação bem-conhecidos são bem-conhecidos na técnica e podem ser empregados para induzir mutações nas regiões de codificação de proteínas do membro familiar de KRP. A avaliação pode ser realizada para localizar aquelas plantas que poderiam compreender uma seqüência de nucleotídeo desejada codificando um Krp mutante ou variante da presente invenção. As plantas podem ser avaliadas quanto às alterações na seqüência de aminoácido do CKI, alterações na atividade de cinase ou as alterações esperadas no fenótipo seguido por análise de seqüência.

Como forma de exemplo não limitante, os dois sistemas iniciadores utilizados no *kit* de Mutagênese Direcionada ao Sítio Transformadora de Clontech, podem ser empregados para introduzir mutantes direcionados ao sítio em um gene codificando uma proteína de CKI. Seguinte a desnaturação do plasmídeo-alvo neste sistema, dois iniciadores são simultaneamente anelados ao plasmídeo; um destes iniciadores contém a mutação direcionada ao sítio desejada, o outro contém uma mutação em outro ponto no plasmídeo que resulta na eliminação de um sítio de restrição. A segunda síntese de linhagem é realizada então, firmemente ligando estas duas mutações, e os plasmídeos resultantes são transformados em uma linhagem *mutS* de *E. coli*. O DNA de plasmídeo é isolado das bactérias transformadas, restrito

com a enzima de restrição relevante (desse modo linearizando os plasmídeos não mutados), e em seguida retransformado em *E. coli*. Este sistema permite a geração de mutações diretamente em um plasmídeo de expressão, sem a necessidade de subclonagem ou geração de fagemídeos de filamento único. A ligação estrita das duas mutações e a linearização subsequente de plasmídeos não mutados, resultam na eficiência de mutação elevada e permite avaliação mínima. Seguinte a síntese do iniciador de sítio de restrição inicial, este método requer o uso de somente um novo tipo de iniciador por sítio de mutação. Em vez de preparar cada mutante posicional separadamente, um grupo de iniciadores de oligonucleotídeo "degenerados designados" pode ser sintetizado para introduzir todas as mutações desejadas em um determinado sítio simultaneamente. Os transformantes podem ser avaliados sequenciando-se o DNA de plasmídeo pela região mutagenizada para identificar e classificar os clones mutantes. Cada DNA de mutante pode então ser restrito e analisado por eletroforese, tal como, por exemplo, em um gel de Realce de Detecção de Mutação (J. T. Baker) para confirmar que nenhuma outra alteração na seqüência tenha ocorrido (por comparação de deslocamento de faixa para o controle não mutagenizado). Alternativamente, a região de DNA total pode ser seqüenciada para confirmar que nenhum evento mutacional adicional ocorreu fora da região-alvo.

Os duplícies mutantes verificados no vetor de super expressão de pET (ou outro) podem ser empregados para transformar *E. coli* tal como linhagem de pLysS de *E. coli* BL21 (DE3), para produção de nível elevado da proteína de mutante, purificação por protocolos padrões. O método de mapeamento de FAB-MS pode ser empregado para rapidamente verificar a fidelidade de expressão de mutante. Esta técnica fornece segmentos de seqüenciamento em toda a proteína inteira e fornece a confiança necessária na designação da seqüência, em uma experiência de mapeamento deste tipo, a proteína é digerida com uma protease (a escolha dependerá da região específica a ser modificada desde que este segmento seja de interesse principal e que o mapa restante deva ser idêntico ao mapa de proteína na plasmídeo mutagenizada). O grupo de fragmentos de clivagem é fracionado por, por

exemplo, HPLC de microboro (fase reversa ou permuta de íon, dependendo novamente da região específica a ser modificada) para fornecer vários peptídeos em cada fração, e os pesos moleculares dos peptídeos são determinados através de métodos padrões, tal como FAB-MS. A massa determinada de cada fragmento é então comparada aos pesos moleculares de peptídeos esperados da digestão da sequência predita, e a correção da sequência rapidamente averiguada. Considerando que esta abordagem de mutagenese para modificação de proteína é direcionada, o seqüenciamento do peptídeo alterado não deveria ser necessário se os dados de MS concordarem com a predição. Se necessário verificar um resíduo alterado, CAD-tandem MS/MS pode ser empregado para seqüenciar os peptídeos da mistura em questão, ou o peptídeo-alvo pode ser purificado para degradação de Edman subtrativa ou digestão de carboxipeptidase Y que depende do local da modificação.

15 No desígnio de uma mutagenese direcionada ao sítio particular, é geralmente desejável primeiro tornar uma substituição não conservadora e determinar (a) se a atividade de ligação de CDK ou ciclina alvejada é prejudicada e (b) se qualquer atividade não alvejada (por exemplo, ligação de ciclina se a região de ligação de CDK for alvejada) é grandemente prejudicada como uma consequência. Se o resíduo é por este meio demonstrado ser importante para uma atividade biológica não alvejada, então substituições conservadoras podem ser feitas.

25 Outras técnicas de mutagenese direcionada ao sítio também podem ser empregadas com seqüências de nucleotídeo de CKI. Por exemplo, a digestão de endonuclease de restrição de DNA seguida por ligação pode ser empregada para gerar variantes de deleção de CKIs, como geralmente descrito na seção 15.3 de Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, NY). Uma estratégia similar pode ser empregada para construir variantes de inserção, como descrito na seção 15.3 de Sambrook e outros, supra. Mais recentemente Zhu e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768-8773, 1999) legaram um método de alvejamento de mutações para genes de

planta *in vivo* empregando oligonucleotídeos de RNA/DNA quiméricos.

Os polipeptídeos mutantes, com mais do que um aminoácido substituído, podem ser gerados em um dos vários modos. Se os aminoácidos estão localizados próximos uns aos outros na cadeia de polipeptídeo, eles podem ser mutados simultaneamente empregando um oligonucleotídeo que codifica para todas as substituições de aminoácido desejadas. Se, entretanto, os aminoácidos estão localizados um pouco distantes um do outro (separados por mais do que dez aminoácidos, por exemplo), é mais difícil de gerar um único oligonucleotídeo que codifique todas as alterações desejadas. Ao contrário, um dos dois métodos alternativos pode ser empregado. No primeiro método, um oligonucleotídeo separado é gerado para cada aminoácido a ser substituído. Os oligonucleotídeos são então anelados ao DNA modelo de filamento único simultaneamente, e o segundo filamento de DNA que é sintetizado do modelo codificará todas as substituições de aminoácido desejadas. Um método alternativo envolve dois ou mais ciclos de mutagênese para produzir o mutante desejado. O primeiro ciclo é como descrito para os mutantes únicos: DNA de CKI tipo silvestre é empregado para o modelo, um oligonucleotídeo codificando a primeira substituição(s) de aminoácido desejada é anelado a este modelo, e a molécula de DNA de heterodúplex é então gerada. O segundo ciclo de mutagênese utiliza o DNA mutado produzido no primeiro ciclo de mutagênese como o modelo. Desse modo, este modelo já contém uma ou mais mutações. O oligonucleotídeo codificando as substituições de aminoácido desejadas adicionais é então reanelado a este modelo, e o filamento resultante de DNA agora codifica mutações de ambos o primeiro e segundo ciclo de mutagênese. Este DNA resultante pode ser empregado como um modelo em um terceiro ciclo de mutagênese, e assim por diante.

Uma técnica particularmente adequada para guiar identificação de modificações adequadas, inclui alinhar proteínas de CKI por alinhamento de seqüência. Há várias metodologias de alinhamento de seqüência descritas acima que podem ser empregadas. Os programas de alinhamento com base em seqüência, por exemplo, incluem pesquisas de Smith-Waterman,

Needleman-Wunsch, Double Affine Smith-Waterman, pesquisa de estrutura, pesquisa de perfil Gribkov/GCG, varredura de perfil Gribkov/GCG, pesquisa de estrutura de perfil, perfis generalizados de Bucher, modelos de Hidden Markov, Hframe, Estrutura Dupla, BLAST, Psi-BLAST, Clustal, e GeneWise.

- 5 (Vide, por exemplo, Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990; Altschul e outros, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997, ambos incorporados por referência).

As seqüências de aminoácido de polipeptídeos de CKI relacionados podem ser alinhadas, por exemplo, em um alinhamento de seqüência múltiplo (MSA). (Vide, por exemplo, figura 1). O MSA também pode ser empregado para estender informação estrutural conhecida por um ou mais polipeptídeos de CKI aos polipeptídeos de CKI adicionais (tipicamente para polipeptídeos de CKI que compartilham identidade de seqüência substancial) que possam ainda não ter sido identificado. Devido à extensão elevada de homologia estrutural entre polipeptídeos de CKI diferentes, o MSA pode ser empregado como um preditor seguro dos efeitos de modificações em várias posições no alinhamento. Conseqüentemente, no caso de membros familiares de KRP, por exemplo, a numeração e seqüência de CKI mostradas na figura 1 podem ser empregadas como um ponto de referência de MSA para qualquer outra seqüência de proteína de membro familiar de KRP. Como previamente notado, as posições de aminoácido particularmente adequadas incluem aquelas correspondendo às posições de aminoácido 145, 148, 149, 151, 153, 155, 163, 164, 165 e/ou 167 de KRP1 de *Brassica napus* (BnKrp1). Ao empregar o alinhamento descrito na figura 1, e/ou empregar os programas de alinhamento conhecidos na técnica como aqueles descritos aqui, alguém pode usar como um ponto de referência o sistema de numeração do programa de alinhamento e pode correlacionar as posições relevantes do polipeptídeo de CKI com posições equivalentes em outros membros reconhecidos de CKIs ou homólogos estruturais e famílias. Métodos similares podem ser empregados ou o alinhamento da seqüência (s) de aminoácido de polipeptídeo de CKI que já tenha sido seqüenciado.

Em certos casos, os aminoácidos no polipeptídeo de CKI que

interagem com uma proteína de ciclina ou CDK podem ser identificados diretamente de uma estrutura tridimensional de um complexo de CKI/CDK ou CKI/ciclina. Informação equivalente pode ser derivada por análise do complexo de CKI/CDK ou CKI/ciclina de um polipeptídeo de CKI relacionado.

- 5 Desse modo, os alinhamentos estruturais podem ser empregados para gerar o polipeptídeos de CKI variantes da invenção. Há uma ampla variedade de programas de alinhamento estrutural conhecida na técnica. Vide, por exemplo, VAST do *site* da Web NCBI; SSAP (Orengo e Taylor, *Methods Enzymol.* 266:617-635, 1996); SARF2 (Alexandrov, *Protein, Eng.* 9:727-732, 1996) CE
10 (Shinydyalov e Bourne, *Protein Eng.* 11:739-747, 1998); (Orengo e outros, *Structure* 5:1093-108, 1997; Dali (Holm e outros, *Nucl. Acid Res.* 26:316-9, 1998 todos dos quais estão incorporados por referência)).

- Conseqüentemente, modificações úteis em interfaces de CKI/CDK ou CKI/ciclina podem ser selecionadas empregando os algoritmos
15 de modelagem ou desígnio de proteína tal como tecnologia PDA® (vide, Patentes dos Estados Unidos N.ºs. 6.188.965; 6.269.312; e 6.403.312, desse modo incorporadas por referência). Os algoritmos nesta classe geralmente usam funções de classificação de nível de aminoácido ou nível atômico para avaliar a compatibilidade de seqüências de aminoácido com a estrutura ter-
20 ciária ou quaternária total de uma proteína. Desse modo, os algoritmos desta classe podem ser empregados para selecionar rompimentos e/ou modificações de ligação de CDK ou ciclina que substancialmente não perturbam a capacidade de proteínas de CKI variantes de corretamente dobrar e interagir com alvos de ocorrência natural que correspondem às regiões não modifica-
25 das da proteína. Estas tecnologias tipicamente usam informação estrutural de alta resolução da proteína-alvo como entrada. Em uma modalidade, uma estrutura experimentalmente determinada da proteína de CKI apropriada é empregada como entrada. Em modalidades alternativas, um MSA pode ser empregado para guiar a construção de modelos de homologia de nível atô-
30 mico para membros de CKI com base no subgrupo da família cujas estruturas tridimensionais tenham sido determinadas empregando métodos relacionados ou cristalográficos. Em ainda outra modalidade, o modelo estrutural

de interface de p27/ciclina de mamífero pode ser empregado para prever o resíduo de aminoácido de contato para CKI de planta.

Os polipeptídeos de CKI mutantes que têm ligação modificada, por exemplo, reduzida para uma proteína de CDK ou ciclina também podem ser identificados por uma grande variedade de outros métodos, incluindo, por exemplo, evolução direcionada (por exemplo, PCR propenso a erro, emaranhamento de DNA, e similares), a mutagenese de saturação de sítio único, e mutagenese de varredura de alanina. No caso de CKIs KRP, por exemplo, o uso destes e/ou outros métodos pode permitir para a identificação de modificações adicionais que reduzem a atividade de ligação de CDK e que se encontra fora da região de ligação de CDK descrita aqui.

Além disso, cálculos dinâmicos moleculares podem ser empregados para computacionalmente avaliar as seqüências calculando-se individualmente as classificações de seqüência mutante e compilando uma lista. Além disso, potenciais de par de resíduo podem ser empregados para classificar as seqüências (Miyazawa e outros, *Macromolecules* 18: 534-552, 1985, incorporados aqui por referência) durante avaliação computacional.

Alternativamente, as bibliotecas de proteínas de CKI variantes podem ser feitas para testar. Por exemplo, uma biblioteca de seqüências de aminoácido de CKI variantes pode ser empregada para designar os ácidos nucléicos codificando as seqüências de CKI variantes e que pode então ser clonada em células hospedeiras, expressadas, e analisadas. A escolha de códons, vetores de expressão adequados, e células hospedeiras adequadas, tipicamente variarão dependendo de vários fatores, e pode ser facilmente otimizada quando necessário.

Em um método particularmente adequado para avaliar bibliotecas de mutantes testando quanto à atividade antagonista negativa dominante e/ou outras atividades desejadas como descrito aqui, reações de PCR múltiplas com oligonucleotídeos agrupados são realizadas. Os oligonucleotídeos de sobreposição são sintetizados os quais correspondem ao gene de tamanho natural. Estes oligonucleotídeos podem representar todos os aminoácidos diferentes em cada posição variante ou subgrupos. Estes oligonu-

cleotídeos podem ser agrupados em proporções iguais e reações de PCR múltiplas realizadas para criar seqüências de tamanho natural que contêm as combinações de mutações definidas pela biblioteca. Além disso, isto pode ser feito empregando métodos de PCR propensos ao erro.

- 5 Tipicamente, cada oligonucleotídeo de sobreposição compreende somente uma posição a ser variada. Alternativamente, as posições variantes estão muito próximas uma a outra, para permitir que esta e variantes múltiplas por oligonucleotídeo sejam empregadas para permitir a recombinação completa de todas as possibilidades (isto é, cada oligo pode conter o
- 10 códon para uma única posição sendo mutada, ou para mais do que uma posição sendo mutada). As múltiplas posições sendo mutadas estão preferivelmente próximas da seqüência para impedir o comprimento de oligo nucleotídeo de ser não prático. Para mutar posições múltiplas em um oligonucleotídeo, combinações particulares de mutações podem ser incluídas ou
- 15 podem ser excluídas na biblioteca incluindo-se ou excluindo-se o oligonucleotídeo codificando aquela combinação. Por exemplo, como descrito aqui, pode haver correlações entre regiões variáveis; isto é, quando a posição X é um certo resíduo, posição Y deve (ou não deve) ser um resíduo particular. Estes grupos de posições variáveis às vezes são referidos aqui como um
- 20 "agrupamento". Quando os agrupamentos são compreendidos de resíduos próximos uns dos outros, e desse modo pode residir em um iniciador de oligonucleotídeo, os agrupamentos podem ser ajustados às "boas" correlações, e eliminam as combinações ruins que podem diminuir a efetividade da biblioteca. Porém, se os resíduos do agrupamento distantes da seqüência, e
- 25 desse modo residirá em oligonucleotídeos diferentes para síntese, eles podem ser desejáveis para ajustar os resíduos à correlação "boa", ou os elimina completamente como resíduos variáveis. Alternativamente, a biblioteca pode ser gerada em várias etapas, de forma que as mutações de agrupamento somente apareçam juntas. Este procedimento, isto é, o procedimento
- 30 de identificar os agrupamentos de mutação e colocá-los no mesmo oligonucleotídeo ou eliminá-los da biblioteca ou geração de biblioteca em vários passos preservando os agrupamentos, pode consideravelmente enriquecer

a biblioteca com proteína corretamente dobrada. A identificação dos agrupamentos pode ser realizada por vários modos, por exemplo, empregando-se métodos de reconhecimento padrão conhecidos, comparações de frequências de ocorrência de mutações ou empregando-se análise de energia das seqüências a serem experimentalmente geradas (por exemplo, se a energia de interação for alta, as posições são correlacionadas). Estas correlações podem ser correlações posicionais (por exemplo, posições variáveis 1 e 2 sempre alteram juntas ou nunca alteram juntas) ou correlações de seqüência (por exemplo, se há resíduo A na posição 1, há sempre resíduo B na posição 2). (Vide, Pattern Discovery in Biomolecular Data: Tools, Techniques, e Applications; (Jason T. L. Wang, Bruce A. Shapiro, Dennis Shasha eds., New York, Oxford University, 1999); e rews, Introduction to Mathematical Techniques in Pattern Recognition (New York, Wiley-Interscience, 1972); Applications of Pattern Recognition (K. S. Fu ed., Boca Raton, FL, CRC Press, 1982); Genetic Algorithms for Pattern Recognition (Sankar K. Pal e Paul P. Wang eds., Boca Raton, FL, CRC Press, 1996); Pandya, Pattern Recognition with Neural Networks in C++ (Boca Raton, FL, CRC Press, 1996; Handbook of Pattern Recognition & Computer Vision (C. H. Chen, L. F. Pau, and P. S. P. Wang, eds., 2^a ed. Singapore; River Edge, N. J., World Scientific, 1999); Friedman, Introduction to Pattern Recognition: Statistical, Structural, Neural, e Fuzzy Logic Approaches (River Edge, NJ., World Scientific, 1999, Series title: Series in machine perception e artificial intelligence; vol. 32); todos dos quais estão expressamente incorporados por referência. Além disso, os programas empregados para pesquisar quanto aos motivos de consensos podem ser empregados também.

Os oligonucleotídeos com inserções ou deleções de códons podem ser empregados para criar uma biblioteca expressando proteínas de comprimento diferente. Em particular, a avaliação de seqüência computacional quanto às inserções ou deleções pode resultar em bibliotecas secundárias que definem proteínas de comprimento diferentes, que podem ser expressas por uma biblioteca de oligonucleotídeo agrupado de comprimentos diferentes.

Em outra modalidade, os polipeptídeos de CKI mutantes da invenção são criados embaralhando-se uma família (por exemplo, um grupo de mutantes); isto é, alguns grupos das seqüências de topo (se uma lista classificada-ordenada for empregada) podem ser embaralhados, com ou sem PCR propenso ao erro. "Emaranhamento" neste contexto significa uma recombinação de seqüências relacionadas, geralmente de um modo aleatório. Pode incluir "embaralhar" como e definido exemplificado nas Patentes dos Estados Unidos N^{os}. 5.830.721; 5.811.238; 5.605.793; 5.837.458 e PCT US/19256 todas das quais estão aqui incorporadas por referência.

Este grupo de seqüências também pode ser um grupo artificial; por exemplo, de uma tabela de probabilidade (por exemplo, gerada empregando SCMF) ou um grupo de Monte Carlo. Similarmente, a "família" pode ser as 10 seqüências de topo e as 10 seqüências de base, as 100 seqüências de topo, e similares. Isto também pode ser feito empregando PCR propenso ao erro.

Desse modo, em ambiente virtual o emaranhamento pode ser realizado empregando os métodos computacionais descritos aqui (por exemplo, iniciando com duas bibliotecas ou duas seqüências, recombinações aleatórias das seqüências podem ser gerada e avaliada).

PCR propenso ao erro pode ser realizado para gerar uma biblioteca de polipeptídeos de CKI variante. Vide a Patente dos Estados Unidos N^{os}. 5.605.793, 5.811.238, e 5.830.721, que estão desse modo incorporadas por referência. Isto pode ser feito na seqüência ideal ou nos membros de topo da biblioteca, ou algum outro grupo artificial ou família. Neste método, o gene para a seqüência ideal encontrada na avaliação computacional da biblioteca primária pode ser sintetizado. PCR propenso ao erro é então realizado no gene de seqüência ideal na presença de oligonucleotídeos que codificam para as mutações nas posições variantes da biblioteca (oligonucleotídeos de influência). A adição dos oligonucleotídeos criará uma influência que favorece a incorporação das mutações na biblioteca. Alternativamente, somente os oligonucleotídeos para certas mutações podem ser empregados para influenciar a biblioteca.

O emaranhamento de gene pode ser realizado com PCR propenso ao erro no gene para a seqüência ideal, na presença de oligonucleotídeos de influência, para criar uma biblioteca de seqüência de DNA que reflète a proporção das mutações encontradas na biblioteca de CKI. A escolha dos oligonucleotídeos de influência pode ser feita em uma variedade de modos; eles podem ser escolhidos com base em sua freqüência, por exemplo, oligonucleotídeos codificando posições de freqüência mutacional elevada podem ser empregados; alternativamente, oligonucleotídeos que contêm as posições mais variáveis podem ser empregados, tal que a diversidade seja aumentada; se a biblioteca secundária é classificada, alguns números de posições de classificação de topo podem ser empregados para gerar oligonucleotídeos de influência; posições aleatórias podem ser escolhidas; algumas classificações de topo e algumas classificações baixas podem ser escolhidas; e os similares. O que é importante é gerar seqüências novas com base nas seqüências e posições variáveis preferidas.

Em outra variação, PCR empregando um gene tipo silvestre ou outro gene pode ser empregado. Nesta modalidade, um gene de partida é empregado (por exemplo, o gene tipo silvestre, o gene codificando a seqüência otimizada total, ou uma seqüência de consenso obtida, por exemplo, de seqüências homólogas de alinhamento de organismos diferentes). Nesta modalidade, os oligonucleotídeos são empregados os quais correspondem às posições variantes e contêm os aminoácidos diferentes da biblioteca. PCR é feito empregando iniciadores de PCR na terminação. Isto fornece dois benefícios. Primeiro, isto geralmente requer menos oligonucleotídeos e pode resultar em menos erro. Segundo, tem vantagens experimentais pelo fato de que se o gene tipo silvestre for empregado, ele não precisa ser sintetizado.

Os polipeptídeos de CKI mutantes podem ser de qualquer número de organismos, com polipeptídeos de CKI de plantas sendo particularmente preferido. As plantas adequadas incluem, por exemplo, a classe de plantas altas tratáveis por técnicas de transformação, incluindo ambas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, bem como certas plantas mais bai-

xas tal como algas. São incluídas as plantas de uma variedade de níveis ploidia, incluindo poliplóide, diplóide e haplóide. Em modalidades específicas, a planta é *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glicina max*, milho, arroz, trigo, alfafa, algodão, álamo, e similares.

5 Como descrito acima, os polipeptídeos de CKI mutantes da invenção são antagonistas negativos dominantes de polipeptídeo de CKI do tipo silvestre. Em certas modalidades, os Polipeptídeos de CKI mutantes fisicamente interagem com somente uma ou ambas de suas proteínas de ciclina ou CDK correspondentes (isto é, a proteína de ciclina ou CDK endó-

10 gena, de ocorrência natural das espécies das quais o CKI mutante foi derivado) tal que um complexo de CDK/ciclina compreendendo o CKI mutante seja protegido para inibição de CDK/ciclina cinase pela proteína de CKI tipo silvestre.

 Em uma modalidade alternativa, não mutuamente exclusiva, os

15 Polipeptídeos de CKI mutantes interagem fisicamente com somente uma ou ambas as proteínas de ciclina ou CDK heterólogas (isto é, uma proteína de ciclina ou CDK de ocorrência natural de uma espécie que é diferente da espécie da qual o CKI mutante foi derivado), tal que um complexo do CDK/ciclina heterólogo compreendendo o CKI mutante seja protegido de

20 inibição de CDK/ciclina cinase por uma proteína de CKI tipo silvestre que corresponde às proteínas de CDK e ciclina no complexo (isto é, por uma proteína de CKI tipo silvestre endógena às proteínas de CDK e ciclina).

 Em algumas modalidades, os polipeptídeos de CKI mutantes da invenção são os antagonistas altamente específicos para a proteína de CKI

25 tipo silvestre correspondente. Em modalidades alternativas, os polipeptídeos de CKI mutantes da invenção são os antagonistas específicos para mais do que um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre. Por exemplo, um polipeptídeo de CKI de *Arabidopsis* mutante pode ser um antagonista específico de um polipeptídeo de CKI de *Arabidopsis* tipo silvestre somente, ou específico pa-

30 ra polipeptídeos de CKI tipo silvestre de *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Glicina max*, milho, arroz, algodão, e/ou álamo. Além disso, um polipeptídeo de CKI de *Brassica* mutante pode ser antagonista específico de um polipeptídeo de

CKI de *Brassica* tipo silvestre somente, ou é um antagonista específico para polipeptídeo de CKI mutante tipo silvestre de *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Glicina max*, milho, arroz, trigo, alfafa, algodão, e/ou álamo.

Os polipeptídeos de CKI mutantes exibem atividade biológica substancialmente diminuída quando comparado com o polipeptídeo de CKI tipo silvestre, incluindo, por exemplo, ligação modificada a uma de uma proteína de CDK ou ciclina e inibição diminuída de complexos de CDK/ciclina cinase. Tal atividade biológica diminuída pode ser testada e validada empregando ensaios *in vivo* e/ou *in vitro*. Os ensaios adequados incluem, porém não estão limitados, ensaios de atividade de CDK/ciclina cinase; ensaios de ligação de CDK ou ciclina; e ensaios de proliferação celular. Uma diminuição substancial na atividade biológica quando comparado com polipeptídeo de CKI do tipo silvestre significa que a atividade biológica do polipeptídeo de CKI variante é menor do que 80% ou menor do que 70%, tipicamente menor do que 60% ou menor do que 50%, mais tipicamente menor do que 40% ou menor do que 30%, e preferivelmente menor do que 20% ou menor do que 10% que de um polipeptídeo de CKI correspondente do tipo silvestre de.

Em algumas modalidades, o Polipeptídeo de CKI mutante inclui uma modificação, quando comparado com um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre, além daqueles descritos aqui (isto é, as proteínas de CKI mutantes podem conter modificações adicionais quando comparadas a uma proteína de CKI do tipo silvestre correspondente exceto aquelas empregadas para gerar proteínas negativas dominantes). Os exemplos incluem, porém não estão limitados, às substituições de aminoácido introduzidas para permitir expressão solúvel em *E. coli* e substituições de aminoácido introduzidas para otimizar o comportamento da solução. Além disso, como descrito aqui, quaisquer das mutações descritas aqui podem ser combinadas de qualquer modo para formar polipeptídeos de CKI variantes adicionais. Além disso, os polipeptídeos de CKI mutantes podem ser feitos os quais sejam mais longos do que a proteína do tipo silvestre correspondente, por exemplo, pela adição de rótulos de purificação ou epitopo, a adição de outras seqüências de fusão, e similares ou eles podem ser mais curtos.

Os polipeptídeos de CKI mutantes também podem ser identificados como sendo codificados por ácidos nucléico de CKI mutantes. No caso do ácido nucléico, a identidade de seqüência total da seqüência de ácido nucléico é comensurável com a identidade de seqüência de aminoácido porém leva em conta a degeneração no código genético e influência de códon de organismos diferentes. Conseqüentemente, a identidade de seqüência de ácido nucléico pode ser mais baixa ou mais elevada do que aquela da seqüência de proteína, identidade de seqüência com mais baixa sendo típica.

Como será apreciado por aqueles na técnica, devido à degeneração do código genético, um número extremamente grande de ácidos nucléico pode ser feito, todos dos quais codifica o polipeptídeo de CKI mutante da presente invenção. Desse modo, tendo identificado uma seqüência de aminoácido particular, qualquer número de ácidos nucléico diferentes codificando a proteína mutante pode ser feito simplesmente se modificando a seqüência de um ou mais códons de modo que não altere a seqüência de aminoácido do polipeptídeo de CKI mutante.

Os polipeptídeos de CKI mutantes e ácidos nucléicos da presente invenção são preferivelmente recombinantes (a menos que feito sinteticamente). Como notado supra, os mutantes são tipicamente preparados por mutagênese específica de sítio de nucleotídeos no DNA codificando uma proteína de CKI correspondente, empregando mutagênese de PCR ou casete ou outra técnica bem-conhecida na técnica, para produzir DNA codificando o mutante, e por conseguinte expressando o DNA em cultura de célula de recombinante. Os mutantes de seqüência de aminoácido são caracterizados pela natureza predeterminada da mutação, uma característica que os coloca à parte de variação interespecies ou alélicas de ocorrência natural da seqüência de aminoácido de proteína CKJ mutante. Como descrito acima, as variantes tipicamente exibem ligação similar de uma proteína de ciclina ou CDK (conseqüentemente, quando comparado a uma proteína de CKI do tipo silvestre correspondente, o mutante exhibe uma diminuição substancial em sua atividade inibidora; embora as variantes também podem ser selecionadas as quais tenham características variantes adicionais).

Ao mesmo tempo em que o local ou região para introduzir uma variação de seqüência de aminoácido é predeterminado, a mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, para otimizar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, a mutagênese aleatória pode ser conduzida no códon ou região alvo e as proteínas de CKI variantes expresas avaliadas quanto à combinação ideal de atividade desejada. As técnicas para produzir mutações de substituição em sítios predeterminados em DNA que tem uma seqüência conhecida são bem-conhecidas, por exemplo, mutagênese de iniciador M13 e mutagênese de PCR. A avaliação dos mutantes é feita empregando ensaios de atividades de proteína CKI mutante para características ótimas.

Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são de resíduos únicos. Em outras modalidades, os resíduos de aminoácido múltiplos são substituídos (por exemplo, 2, 3, 4, ou mais aminoácidos podem ser substituídos). As inserções são tipicamente na ordem de cerca de 1 a cerca de 20 aminoácidos, embora inserções consideravelmente maiores possam ser toleradas. As deleções variam de cerca de 1 a cerca de 20 resíduos, ou de cerca de 1 a cerca de 30 resíduos, embora em alguns casos as deleções possam ser muito maiores. Em certas modalidades, os polipeptídeos de CKI mutantes são quimeras derivadas de duas ou mais proteínas de CKI do tipo silvestre, com pelo menos uma modificação na região de ligação de CDK ou ciclina como descrito aqui.

As substituições, deleções, inserções, ou qualquer combinação destes, são empregadas para chegar a um mutante final. Geralmente, a modificação(s) é feita com respeito a relativamente poucos aminoácidos para minimizar a alteração da molécula. Porém, alterações maiores podem ser toleradas em certas circunstâncias.

Ao usar um ácido nucléico da presente invenção codificando um polipeptídeo de CKI mutante, uma variedade de vetores pode ser feita. Qualquer vetor que contém seqüências de réplicon e controle que seja derivada de uma espécie compatível com a célula hospedeira pode ser empregado na prática da invenção. Os vetores podem ser vetores extracromossô-

micos de auto-replicação ou vetores que integram em um genoma hospedeiro. Geralmente, os vetores de expressão incluem regiões de ácido nucléico reguladoras transcricionais e translacionais operavelmente ligadas ao ácido nucléico codificando o polipeptídeo de CKI mutante. O termo "seqüências de controle" se refere às seqüências de DNA necessárias para a expressão de uma seqüência de codificação operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As seqüências de controle que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma seqüência operadora, e um sítio de ligação de ribossoma. As regiões reguladoras de ácido nucléico transcricionais e translacionais geralmente serão apropriadas para a célula hospedeira empregada para expressar o polipeptídeo.

Em certas modalidades, os ácidos nucléicos de CKI são modificados para realçar a expressão de gene em célula hospedeira empregando a otimização de códon, que envolve substituir uma seqüência de códon com um códon de translação (correspondendo ao mesmo aminoácido) que seja altamente empregado nas espécies de célula na qual a molécula de DNA deve ser expressa. Os exemplos de seqüências de codificação de mutante BnKRP1 (BnKrp1 F151A; F153A e Y149A; F151A; F153A) que foram otimizadas para expressão em milho é mostrado na figura 3. Os procedimentos de otimização de códon são geralmente bem-conhecidos na técnica e podem ser empregados por aqueles versados na técnica para obter outras seqüências de Krp1 mutante otimizadas de códon de acordo com a presente invenção.

Numerosos tipos de vetores de expressão apropriados, e seqüências reguladoras adequadas são conhecidos na técnica para uma variedade de células hospedeiras. Em geral, as seqüências reguladoras transcricionais e translacionais podem incluir, por exemplo, seqüências promotoras, sítios de ligação ribossômica, seqüências de partida e interrupção transcricionais, seqüências de partida e interrupção translacionais, e seqüências realçadoras e ativadoras. Em modalidades típicas, as seqüências reguladoras incluem seqüências de partida e interrupção promotoras transcricionais. Os vetores também tipicamente incluem uma região poliligadora que contém

vários sítios de restrição para inserção de DNA estrangeiro. A construção de vetores adequados que contêm DNA codificando seqüências de replicação, seqüências reguladoras, genes de seleção fenotípicos, e o DNA de CKI variante de interesse, é preparada empregando procedimentos de DNA recombinante padrão. Os plasmídeos isolados, vetores virais e fragmentos de DNA são clivados, talhados, e ligados juntos em uma ordem específica para gerar os vetores desejados, como é bem-conhecido na técnica (vide, por exemplo, Maniatis, supra, e Sambrook e outros, supra).

As seqüências promotoras codificam promotores constitutivos ou induzíveis. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural ou promotores híbridos. Os promotores híbridos, que combinam elementos de mais de um promotor, também são conhecidos na técnica, e são úteis na presente invenção. Em uma modalidade típica, os promotores são promotores fortes, permitindo a expressão elevada em células, particularmente células de planta. Os promotores particularmente adequados para uso de acordo com a presente invenção são descritos também infra.

Além disso, o vetor de expressão pode compreender elementos adicionais. Por exemplo, o vetor de expressão pode ter dois sistemas de replicação, desse modo permitindo ser mantido em dois organismos, por exemplo, em células de planta ou inseto para expressão em um hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Além disso, para vetores de expressão de interação, o vetor de expressão contém pelo menos uma seqüência homólogo ao genoma de célula hospedeira, e preferivelmente duas seqüências homólogas que flanqueiam o constructo de expressão. O vetor de integrando pode ser direcionado para um loco específico na célula hospedeira selecionando-se a seqüência homóloga apropriada para inclusão no vetor. Os constructos para vetores de integração são bem-conhecidas na técnica.

Em certas modalidades, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Os genes de seleção são bem-conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira empregada. Os genes de seleção adequados, por

exemplo, podem incluir genes codificando para resistência a ampicilina e/ou tetraciclina, que permite que células transformadas com estes vetores cresçam na presença destes antibióticos.

Em um aspecto da presente invenção, um ácido nucléico de CKI mutante é introduzido em uma célula, ou sozinho ou em combinação com um vetor. Por "introduzido em" ou equivalentes gramaticais é entendido que os ácidos nucléicos entram nas células de uma maneira adequada para integração, amplificação, e/ou expressão subsequente do ácido nucléico. O método de introdução é amplamente ditado pelo tipo de célula alvejado. Os métodos exemplares incluem precipitação de CaPO_4 , fusão de lipossoma, lipofectin[®], eletroporação, infecção viral, e similares. Os métodos particularmente adequados para introdução em células de planta são conhecidos na técnica e também são descritos infra (vide Seção II, "Transgenic Plants"). Tais métodos incluem, por exemplo, bombardeio de células com microprojéteis carregados de DNA. Os ácidos nucléicos de CKI mutantes podem estavelmente integrar no genoma da célula hospedeira, ou podem existir transitoriamente ou estavelmente no citoplasma (por exemplo, através do uso de plasmídeos tradicionais, utilizando seqüências reguladoras padrão, marcadores de seleção, e similares).

Os procariotas podem ser empregados como células hospedeiras para as etapas iniciais de clonagem da presente invenção. Eles são particularmente úteis para produção rápida de quantidades grandes de DNA, para produção de modelos de DNA de filamento único empregados para mutagenese direcionada ao sítio, para avaliar muitos mutantes simultaneamente, e para seqüenciamento de DNA dos mutantes gerados. As células hospedeiras procarióticas adequadas incluem linhagem de *E. coli* KI 2 94 (ATCC Nº. 31.446), linhagem de *E. coli* W3110 (ATCC Nº. 27.325) *E. coli* XI 776 (ATCC Nº. 31.537), e *E. coli* B; porém muitas outras linhagens de *E. coli*, tal como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539, e muitas outras espécies e gêneros de procariotas incluindo bacilos tal como *Bacillus subtilis*, outras enterobacteriáceas tal como *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcesans*, e várias espécies de *Pseudomonas* podem todas ser empregadas como

hospedeiros. As células hospedeiras procarióticas são ou outras células hospedeiras com paredes celulares rígidas são tipicamente transformadas empregando o método de cloreto de cálcio como descrito na seção 1.82 de Sambrook e outros, supra. Alternativamente, a eletroporação pode ser empregada para transformação destas células. As técnicas de transformação de procariota são apresentadas, por exemplo, em Dower, em Genetic Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan e outros, Meth. Enzymol., 204:63, 1991. Os plasmídeos tipicamente empregados para transformação de *E. coli* incluem pBR322, pUCI8, pUCI9, pUCI18, pUCI 19, e Bluescript MI 3, todos dos quais estão descritos em seções 1.12-1.20 de Sambrook e outros, supra. Porém, muitos outros vetores adequados estão disponíveis também.

Os polipeptídeos de CKI mutantes da presente invenção são produzidos tipicamente cultivando-se células hospedeiras transformadas com um vetor de expressão que contém um ácido nucléico codificando o polipeptídeo de CKI mutante, sob as condições apropriadas para induzir ou causar expressão do polipeptídeo de CKI mutante. Para modulação de divisão de célula, a proteína de CKI é expressa em sua forma intracelular normal. Para aplicações da presente invenção que incluem colheita ou isolamento de um polipeptídeo de CKI mutante, o CKI mutante pode ser expresso como uma proteína intracelular ou, alternativamente, em uma forma que é segregada da célula hospedeira. Muitas proteínas eucarióticas normalmente segregadas da célula contêm uma sequência de sinal de secreção endógena como parte da sequência de aminoácido. Desse modo, as proteínas normalmente achadas no citoplasma podem ser alvejadas para secreção ligando-se uma sequência de sinal à proteína. Isto é facilmente realizado ligando-se o DNA codificando uma sequência de sinal a extremidade 5' do DNA codificando a proteína e então expressando esta proteína de fusão em uma célula hospedeira apropriada. O DNA codificando a sequência de sinal pode ser obtido como um fragmento de restrição de qualquer gene codificando uma proteína com uma sequência de sinal. Desse modo, as seqüências de sinal procarióticas, de levedura, e eucarióticas podem ser empregadas aqui,

dependendo do tipo de célula hospedeira utilizada para praticar a invenção. As seqüências de DNA e aminoácido codificando a porção de seqüência de sinal de vários genes eucarióticos incluindo, por exemplo, hormônio de crescimento humano, pró-insulina, e pré-albumina, são conhecidas (vide, Stryer, Biochemistry (W.H. Freeman and Company, Nova Iorque, NY, 1988, p.769)), e podem ser empregadas como seqüências de sinal em células hospedeiras eucarióticas apropriadas. As seqüências de sinal de levedura, tal como, por exemplo, ácido fosfatase (Arima e outros, Nuc. Acids Res. 11:1657, 1983), α -fator, alcalino fosfatase e invertase podem ser empregados para direcionar a secreção de células hospedeiras de levedura. As seqüências de sinal procarióticas de genes codificando, por exemplo, LamB ou OmpF (Wong e outros, Gene 68:193, 1988), MalE, PhoA, ou beta-lactamase, como também outros genes, podem ser empregadas para alvejar proteínas expressas em células procarióticas no meio de cultura.

As condições apropriadas para a expressão de polipeptídeo de CKI mutante variarão com a escolha do vetor de expressão e da célula hospedeira, e serão facilmente averiguadas por alguém versado na técnica por experimentação rotineira. Por exemplo, o uso de promotores constitutivos no vetor de expressão requererá otimização do crescimento e proliferação da célula hospedeira, ao mesmo tempo em que o uso de um promotor induzível requer as condições de crescimento apropriadas para indução. Além disso, em algumas modalidades, o tempo da colheita é importante. Por exemplo, os sistemas baculovirais empregados em expressão de célula de inseto são vírus líticos, e desse modo a seleção de tempo de colheita pode ser importante para produção do produto.

Os promotores mais geralmente empregados em vetores procarióticos incluem os sistemas promotores de p-lactamase (penicillinase) e lactose (Chang e outros, Nature 375:615, 1978; Itakura e outros, Science 198:1056, 1977; Goeddel e outros, Nature 281 :544, 1979) e um sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel e outros, Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; Publicação de Pedido EPO No. 36.776), e os sistemas de alcalino fosfatase. Ao mesmo tempo em que estes são os mais geralmente emprega-

dos, outros promotores microbianos foram utilizados, e detalhes com respeito às suas seqüências de nucleotídeo foram publicados, permitindo um trabalhador versado funcionalmente ligá-los em vetores de plasmídeo (vide Siebenlist e outros, Cell 20:269, 1980).

5 Um exemplo ilustrativo de um sistema promotor responsivo que pode ser empregado na prática desta invenção é o sistema de glutathione-S-transferase (GST) no milho. GSTs são uma família de enzimas que pode desintoxicar vários compostos eletrofílicos hidrofóbicos que freqüentemente são empregados como herbicidas pré-emergentes (Weigand e outros, Plant
10 Molecular Biology 7:235-243, 1986). Estudos mostraram que os GSTs estão diretamente envolvidos na causa desta tolerância a herbicida realçada. Esta ação principalmente é mediada por um produto de transcrição de mRNA de 1,1 kb específico. Em resumo, o milho tem um gene inativo de ocorrência natural já presente que pode responder aos estímulos externos e que pode
15 ser induzido para produzir um produto de gene. Este gene foi previamente identificado e clonado. Desse modo, em uma modalidade desta invenção, o promotor é removido do gene responsivo de GST e unido a uma seqüência de codificação de CKI mutante. Se o gene de CKI mutante é derivado de uma fonte de DNA genômica que é necessário para remover o promotor nativo durante construção do gene quimérico. Este gene construído é a combinação de um promotor que responde a um estímulo químico externo e um
20 gene responsável pela produção bem-sucedida de uma proteína de CKI mutante.

Um promotor induzível é um promotor que é capaz de direta ou
25 indiretamente ativar a transcrição de um ou mais genes ou seqüências de DNA com respeito a um indutor. Na ausência de um indutor os genes ou seqüências de DNA não serão transcritos. Tipicamente o fator de proteína, que se liga especificamente a um promotor induzível para ativar a transcrição, está presente em uma forma inativa que é então direta ou indiretamente
30 convertida para forma ativa pelo indutor. O indutor pode ser um agente químico tal como uma proteína, metabolito, um regulador de crescimento, herbicida ou um composto fenólico ou uma tensão fisiológica imposta direta-

mente por calor, frio, sal, ou elementos tóxicos ou indiretamente pela ação de um agente de doença ou patógeno tal como um vírus. Uma célula de planta que contém um promotor induzível pode ser exposta a um indutor externamente aplicando-se o indutor à célula ou planta tal como por pulverização, irrigação, aquecimento ou métodos similares. Se for desejável ativar a expressão do gene-alvo para um tempo particular durante o desenvolvimento da planta, o indutor pode ser então aplicado neste momento.

Os exemplos de tais promotores induzíveis incluem os promotores de choque térmico, tal como o promotor de choque térmico de 70KD induzível de *Drosophila melanogaster* (Freeling e outros, Ann. Rev. Of Genetics 19:297-323); um promotor induzível por frio, tal como o promotor induzível por frio de *B. napus* (White e outros, Plant Physiol. 106, 1994); e o promotor de álcool desidrogenase que é induzido por etanol (Nagao e outros, Surveys of Plant Molecular e Cell Biology Vol. 3, p 384-438 (BJ. Mifflin ed., Oxford University Press, Oxford, 1986).

Um promotor constitutivo é um promotor que é capaz de ativar direta ou indiretamente a transcrição de um ou mais genes ou seqüências de DNA em todos os tecidos de uma planta transgênica. Tipicamente, um promotor constitutivo tal como o promotor 35 S de CaMC (Odell, Nature 313:810-812, 1985) é empregado. Outros exemplos de promotores constitutivos úteis em plantas incluem o promotor de actina de arroz (Elroy e outro, Plant Cell 2:163-171, 1990), histona HE de milho (Lepetit e outros, Mol Gen. Genet. 231:276-285, 1992) e similares.

Os transgenes de CKI da presente invenção podem ser expressos empregando um promotor tal como é o promotor BCEA (embrião de *B. campestris*) que foi mostrado direcionar níveis elevados de expressão em desenvolvimento de semente muito precoce (isto é, é transcrito antes do promotor de napin). Este é um período antes de acumulação de produto de armazenamento porém de biossíntese de pigmento rápida na semente de Brassica (derivada de Johnson-Flanagan e outros, J. Plant Physiol. 136:180, 1989; Johnson-Flanagan e outros, Physiol. Plant 81:301, 1991). Os promotores de proteína de armazenamento de semente também foram mostrados

direcionar um nível elevado de expressão de uma maneira específica da semente (Voelker e outros., Plant Cell 1:95, 1989; Altenbach e outros., Plant Mol. Biol. 13:513, 1989; Lee e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6181, 1991; Russell e outros, Transgenic Res. 6:157-68, 1997). O promotor de napin foi mostrado direcionar a expressão de gene de oleosina em Brassica transgênica, tal que a oleosina se acumule em cerca de 1% da proteína de semente total (Lee e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6181, 1991). Na escolha de um promotor, pode ser desejável usar um promotor regulado de maneira desenvolvida ou específico de tecido que permita a supressão ou superexpressão em certos tecidos sem afetar a expressão em outros tecidos. "Promotores específicos de tecido" se referem às regiões de codificação que direcionam a expressão de gene principalmente em tecidos específicos tal como, por exemplo, raiz, folhas, troncos, pistilo, antera, pétalas de flores, tegumento, *nucellus* de semente, ou camadas epidérmicas. Os estimuladores, realçadores ou ativadores de transcrição podem ser integrados em promotores específicos de tecido para criar um promotor com um nível elevado de atividade que retém especificidade de tecido. Por exemplo, os promotores utilizados na superexpressão serão preferivelmente específicos de tecido. A superexpressão no tecido errado como folhas, ao tentar superexpressar em áreas de armazenamento de semente, poderia ser danoso. Os promotores particularmente adequados são aqueles que permitem, por exemplo, a expressão específica de semente, específica de raiz, específica de folha, específica de fruta, e similares. Isto pode ser especialmente útil uma vez que as sementes, raízes, folhas, e frutos são de interesse particular. Alguns promotores específicos para tipos de tecido diferentes já estão disponíveis ou podem ser isolados por técnicas bem-conhecidas (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N^{os}. 5.792.925; 5.783.393; 5.859.336; 5.866.793; 5.898.096; e 5.929.302) e como também descrito abaixo. A Tabela 1 lista outros promotores específicos de embrião que podem ser empregados para praticar a presente invenção.

Tabela 1. Promotores Específicos de Embrião

Promotor	Embrião	Endosperma	Temporização	Referência
Oleosina de <i>Arabidopsis</i>	Forte, uniforme	Nenhum	Traços de calor, estágio cotilédonário precoce a tardio mais elevado	Al e outro, <i>Plant Mol. Biol.</i> 25:193-205, 1994
ESP de <i>Vicia faba</i>	Forte, uniforme	Nenhum	Precoce não conhecido, forte em cotilédone tardio	Baumlein e outro, <i>Mol. Gen. Genet.</i> 225:459-467, 1991
Legumin de <i>Vicia faba</i>	Forte, preferencial em cotilédones	Camada de aleurona (tardio)	Precoce não conhecido, forte em cotilédone tardio	Baumlein e outro, <i>supra</i> 1991.
Napin de Brassica		?	Tardio	Kohn-Murase, <i>Plant Mol. Biol.</i> 26:1115-1124, 1994
Albumina S1 de <i>Arabidopsis</i>	No eixo somente	Nenhum	estágio cotilédonário precoce a tardio mais elevado	Guerche e outro, <i>Plant Cell</i> 2:469-478, 1990
Albumina S2	No eixo e cotilédones	Nenhum	estágio cotilédonário precoce a tardio mais elevado	Guerche e outro, <i>supra</i> , 1990.

Em modalidades particulares da presente invenção, um promotor específico de semente que é particularmente ativo durante o desenvolvimento da planta embrionária de uma semente imatura é de interesse. A expressão de um mutante negativo dominante da presente invenção precocemente em desenvolvimento de semente pode ser desejável para aumentar as divisões de célula precocemente em desenvolvimento de semente. Mais divisões de célula neste estágio podem levar a embriões maiores. A composição de embrião é aproximadamente 33% de óleo, então um embrião maior levará a aumentos no conteúdo de óleo. Um promotor adequado para expressão da presente invenção em embrião e nenhuma expressão ou expressão menor em outros tecidos de planta é de interesse para aumentar o conteúdo de óleo da semente. De interesse particular são aquelas seqüências promotoras que iniciam expressão em desenvolvimento de embrião de fase específica precoce. Um promotor de fase específica precoce é um promotor que inicia a expressão de uma proteína antes do dia 7 após a polinização bengala em *Arabidopsis* ou uma fase equivalente em outras espécies de planta. Os exemplos de seqüências promotoras de interesse particular incluem um promotor para o gene de permease de aminoácido (AAP1) (por exemplo, o promotor AAP1 de *Arabidopsis thaliana*), um promotor para o gene de oleato 12-hidroxilase:desaturase (por exemplo, o promotor designado LFAH12 de *Lesquerella fendleri*), um promotor para o gene de albumina 2S2 (por exemplo, o promotor 2S2 de *Arabidopsis thaliana*), um promotor de gene de elongase de ácido graxo (FAEI) (por exemplo, o promotor de FAEI de *Arabidopsis thaliana*), e o promotor de gene de cotilédone folhoso (LEC2) (por exemplo, o promotor LEC2 de *Arabidopsis thaliana*). Os promotores AAP1, LFAH12, 2S2, e FAE1 são inativo no estágio precoce de desenvolvimento de embrião. Eles se tornam transcricionalmente ativos em estágios progressivamente posteriores em desenvolvimento que começam com AAP1 seguido por LFAH12, 2S2, e então FAE. Todos os quatro promotores então permanecem ativos por estágios de desenvolvimento embrionário posteriores. O promotor de LEC2 tem um perfil de expressão inverso. É ativo em desenvolvimento de embrião muito precoce e então sua atividade declina

- gradualmente por estágios posteriores. Outros promotores específicos de embrião de interesse incluem os promotores dos seguintes genes: os promotores de Seedstick (Pinvopich e outros, *Nature* 424:85-88, 2003), Fbp7 e Fbp11 (Petúnia Seedstick) (Colombo e outros, *Plant Cell* 9:703-715, 1997),
- 5 Banyuls (Devic, *Plant J.*, 19:387-398, 1999), ABI3 (Ng e outros, *Plant. Mol. Biol.* 54:25-38, 2004), agl-15, Agll8 (Lehti-Shiu e outros, *Plant Mol. Biol.* 58:89-107, 2005), Phel (Kohler, *Genes Develop.* 17:1540-1553, 2003), emb175 (Cushing e outros, *Planta* 221:424-436, 2005), LII (Kwong e outros, *Plant Cell* 15:5-18, 2003), Led (Lotan, *Cell* 93:1195-1205, 1998), Fusca3
- 10 (Kroj e outros, *Development* 130:6065-6073, 2003), TT12 (Debeaujon e outros, *Plant Cell* 13:853-871, 2001), TT16 (Nesi e outros, *Plant Cell* 14:2463-2479, 2002), A-RZf (Zou e Tatlor, *Gene* 196:291-295, 1997), TTGI (Walker e outros, *Plant Cell* 11:1337-1350, 1999), TT1 (Sagasser e outros, *Genes Dev.* 16:138-149, 2002), TT8 (Nesi e outros, *Plant Cell* 12:1863-1878, 2000), e
- 15 Gea-8 (cenoura) (Lin e outros, *J. Exp. Botany* 50:1139-1147, 1999). Os promotores específicos de embrião de monocotilédones incluem Globulina, Knox (arroz) (Postma-Haarsma, *Plant Mol Biol* 39:257-271, 1999), Oleosina (Plant, *Plant Mol Biol.* 25:193-205, 1994), Keddie, *Plant. Biol.* 24:327-340, 1994), Peroxiredoxin (Per1) (Haslekas e outros, *Plant Mol. Biol.* 36:833-845,
- 20 1998), Haslekas e outros, *Plant Mol Biol.* 53:313-326, 2003), HvGAMYB (Diaz e outros, *Plant J.* 29:453-464, 2002) e SAD1 (Isabel-LaMoneda e outros, *Plant J.* 33:329-340, 1999) de Cevada, e promotores de proteína ricos em prolina híbridos de Zea Milho (Jose-Estanyol e outros, *Plant Cell* 4:413-423, 1992; Jose-Estanyol e outros, *Gene* 356:146-152, 2005).
- 25 Os promotores de proteínas de armazenamento de semente também são de interesse particular uma vez que as proteínas de armazenamento de semente podem representar até 90% da proteína de semente total em muitas plantas. As proteínas de armazenamento de semente são estritamente reguladas, sendo expressas quase exclusivamente em semen-
- 30 tes de uma maneira altamente específica de tecido e específica de estágio (Higgins e outros, *Ann. Rev. Plant Physiol* 35:191-221, 1984; Goldberg e outro, *Cell* 56:149-160, 1989). Além disso, diferentes proteínas de armazena-

mento de semente podem ser expressas em estágios diferentes de desenvolvimento de semente. A expressão de genes específicos de semente foi estudada em grandes detalhes (vide, revisões por Goldberg e outros, supra, e Higgins e outros, supra). Os exemplos de promotores específicos de semente incluem LFAH1 2 de Arabidopsis e outras plantas, e as regiões reguladoras 5' de um gene de oleosina de Arabidopsis como descrito na Patente dos Estados Unidos Nº. 5.977.436 por Thomas e outros (incorporado em sua totalidade por referência), o qual quando operavelmente ligado à sequência de codificação de um gene heterólogo ou sequência complementar a um gene de planta nativo, direcionam expressão do gene heterólogo ou sequência complementar em uma semente de planta.

Os promotores de proteína de armazenamento de semente adequados para plantas dicotiledôneas incluem, por exemplo, feijão β -faseolina, lectina, e promotores de fitoemaglutinina (Sengupta-Gopalan, e outros, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 82:3320-3324, 1985; Hoffinan e outro., Plant Mol Biol. 11 :171-129, 1988; Voelker e outros, EMBO J. 6:3571-3577, 1987); promotor de napin de semente de colza (canola) (Radke e outros, Theor. Appl. Genet. 75:685-694, 1988); promotores de conglucina e glicina de soja (Chen e outros, EMBO J. 7:297-302, 1988; Nielson e outros, Plant Cell 1:313-328, 1989, Harada e outros, Plant Cell 1:415-425, 1989; Beachy e outros, EMBO J. 4:3047 - 3053, 1985); o promotor de lecitina de soja (Okamuro, Proc.Natl. Acad. Sci USA 83:8240 - 8244, 1986); promotor inibidor de tripsina Kunitz de soja (Perez-Grau e outros, Plant Cell 1:1095 -1109, 1989; Jofuku e outros, Plant Cell 1:1079-1093, 1989); promotor de patatina de batata (Rocha - Sosa e outros, EMBO J. 8:23-29, 1989); promotores de convicilina, vicilina, e legumina de ervilha (Rerie e outros OL₁ Mol Gen. Genet. 259:148-157, 1991; Newbigin e outros . *Plant* 180:461-470, 1990; Higgins e outro, Plant Mol. Biol. 11:683-695, 1988; Shirsat e outros, Mol Gen. Genetics 215:326 - 331, 1989); e promotor de esporamina de batata-doce (Hattori e outros, Plant Mol.Biol 14:595-604, 1990).

Para plantas monocotiledôneas, os promotores de proteína de armazenamento de semente úteis na prática da invenção incluem, por e-

xemplo, promotores de zeína milho (Schernthaner e outro, EMBO J. 7:1249-1255, 1988; Hoffman e outros, EMBO J. 6:3213-3221, 1987 (zeína de milho de 15 kD)); promotor de oleosina de milho de 18 kD (Lee e outros, Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 88:6181-6185, 1991); promotor de cera; promotor contraído-1; promotor globulina 1; promotor contraído-2; promotor de glutelina de arroz; promotor de hordeína de cevada (Marris e outros, Plant Mol. Biol. 10:359-366, 1988); RP5 (Su e outros, J. Plant Physiol. 158:247-254, 2001); promotores de 2 milho e EBE1 (Magnard e outro, Plant Mol Biol. 53:821-836, 2003) e promotores de glutenina e gliadina de trigo (Patente dos Estados Unidos Nº. 5.650.558; Colot e outros, EMBO J. 6:3559-3564, 1987).

Também adequado para prática da presente invenção são os promotores de genes para isocitrateliase e malato sintase de *B. napus* (Comai e outros, Plant Cell 1 :293-300, 1989); delta-9 desaturase de açafoa (Thompson e outros, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:2578-2582, 1991) e rícino (Shanklin e outros, Proc. Natl Acad. Sci USA 88:2510-2514, 1991); proteína de portador de acila (ACP) de Arabidopsis (Poste-Beittenmiller e outros, Acids Res., 1989), *B. napus* (Safford e outros, Eur. J. Biochem. 174:287-295, 1988), e *B. campestris* (Rosa e outros, Nucl. Acids Res. 15:7197, 1987); β -cetoacil-ACP sintetase de cevada (Siggaard-Andersen e outros, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:4114-4118, 1991); oleosina de milho (Lee e outro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6181-6185, 1991), soja (Nº. de Acesso Genbank X60773) e *B. napus* (Lee e outros, Plant Physiol. 96:1395-1397, 1991).

Outros promotores úteis na prática da invenção são conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Além disso, os métodos conhecidos podem ser empregados para isolar os promotores adicionais adequado para uso de acordo com a presente invenção. Por exemplo, técnicas de avaliação diferenciais podem ser empregadas para isolar promotores expressos em tempos específicos (desenvolvendo), tal como durante o desenvolvimento da fruta.

Os promotores de genes específicos de semente operavelmente ligados às seqüências de codificação heterólogas em constructos de gene

quiméricas também mantêm seus padrões de expressão espacial e temporal em plantas transgênicas. Tais exemplos incluem o uso de promotor de gene de proteína de armazenamento de semente *Arabidopsis thaliana* 2S para expressar peptídeos de encefalina em sementes de *Arabidopsis* e *B. napus* (Vandekerckhove e outros, *Bio/Technology* 7:929-932, 1989), promotores de lectina de feijão e β -faseolina de feijão para expressar luciferase (Riggs e outros, *Plant Sci* 63:47-57, 1989), e promotores de glutenina de trigo para expressar cloranfenicol acetila transferase (Colot e outros, supra).

10 Atingir o nível apropriado de expressão dos fragmentos de ácido nucléico da invenção pode requerer o uso de genes quiméricos diferentes que utilizam promotores diferentes. Tais genes quiméricos podem ser transferidos em plantas hospedeiras ou juntos em um único vetor de expressão ou consecutivamente empregando mais de um vetor.

Além disso, os realçadores são freqüentemente requeridos ou
15 úteis para aumentar a expressão do gene da invenção. É necessário que estes elementos sejam operavelmente ligados à seqüência que codifica as proteínas desejadas e que os elementos reguladores sejam operáveis. Os realçadores ou elementos tipo realçadores podem ser fragmentos de ácido nucléico nativos ou quiméricos. Isto incluiria realçadores virais tal como a-
20 aqueles encontrados no promotor 35S (Odell e outros, *Plant Mol Biol* 10:263-272, 1988), realçadores dos genes de opina (Fromm e outros, *Plant Cell* 1:977 - 984, 1989), ou realçadores de qualquer outra fonte que resulte na transcrição aumentada quando colocado em um promotor operavelmente
25 ligado ao fragmento de ácido nucléico da invenção. Por exemplo, um constructo pode incluir o promotor CaMV 35S com realçador transcricional dual ligado ao indutor não translado 5' de vírus de Tabaco Etch (TEV). O indutor de TEV atua como um realçador translacional para aumentar a quantidade de proteína feita.

Os elementos de promotor adequados, tal como aqueles descri-
30 tos aqui, podem ser fundidos às seqüências de ácido nucléico de CKI mutante e ao terminador adequado (região de poliadenilação) de acordo com procedimentos bem-estabelecidos.

Plantas Transgênicas

Em outro aspecto da presente invenção, as plantas transgênicas compreendendo um transgene de CKI mutante são fornecidas. As plantas transgênicas expressando um polipeptídeo de CKI mutante podem ser obtidas, por exemplo, transferindo-se um vetor transgênico (por exemplo, um vetor de plasmídeo ou viral) codificando o polipeptídeo mutante em uma planta. Tipicamente, quando o vetor for um plasmídeo, o vetor também inclui um gene marcador selecionável tal como, por exemplo, o gene de neomicina fosfotransferase II (nptII) codificando resistência a canamicina. O método mais comum de transformação de planta é realizado por clonagem de um transgene-alvo em um vetor de transformação de planta que é então transformado em *Agrobacterium tumifaciens* que contém um Ti-plasmídeo auxiliar como descrito em Hoeckema e outros (Nature 303:179-181, 1983). As células de *Agrobacterium* que contém o vetor de transgene são incubadas com fatias de folha da planta a ser transformada como descrito por An e outros (Plant Physiology 81 :301-305, 1986). (Também vide, Hooykaas, Plant Mol. Biol. 13:327-336, 1989). A transformação de células hospedeiras de planta cultivada normalmente é realizada por *Agrobacterium tumifaciens*, como descrito acima. As culturas de células hospedeiras que não têm barreiras de membrana de célula rígidas são normalmente transformadas empregando o método de fosfato de cálcio como originalmente descrito por Graham e outros (Virology 52:546, 1978) e modificadas como descrito nas seções 16.32-16.37 de Sambrook e outros, supra. Porém, outros métodos para introduzir o DNA em células, tal como Polibreno (Kawai e outros, Mol. Cell. Biol 4:1172, 1984), fusão de protoplasto (Schafmer, Proc. Natl. Acad. Sc. USA 77:2163, 1980), eletroporação (Neumann e outro, 1982 EMBO J. 1:841, 1982), e microinjeção direta em núcleos (Capecchi, Cell 22:479, 1980) também podem ser empregados. Os calos de planta transformados podem ser selecionados pelo marcador selecionável desenvolvendo-se as células em um meio contendo, por exemplo, canamicina e quantidades apropriadas de um fitohormônio tal como ácido acético de naftaleno e benziladenina para indução de broto e calo. As células de planta podem ser então regeneradas e as

plantas resultantes transferidas para o solo empregando técnicas bem-conhecidas por aqueles versados na técnica.

Além dos métodos descritos acima, um grande número de métodos é conhecido na técnica para transferir o DNA clonado em uma ampla variedade de espécies de planta, incluindo, gimnosperma, angiospermas, monocotilédones e dicotilédones (vide, por exemplo, *Methods in Plant Molecular Biology* (Glick e Thompson eds., CRC Press, Boca Raton, FL5 1993); Vasil, *Planta Mol. Biol.* 25:925-937, 1994; e Komari e outros, *Current Opinions Plant Biol.* 1:161-165, 1998 (revisões gerais); Loopstra e outros, *Plant Mol. Biol.* 15:1-9, 1990; e Brasileiro e outros, *Plant Mol. Biol.* 17:441-452, 1991 (transformação de árvores); Eimert e outros., *Plant Mol. Biol.* 19:485 - 490, 1992 (transformação de Brassica); Hiei e outros, *Plant J.* 6:271-282, 1994; Hiei e outros, *Plant Mol Biol.* 35:205-218, 1997; Chan e outros, *Plant Mol Biol* 22:491-506, 1993; Patentes dos Estados Unidos N^{os}. 5.516.668 e 5.824.857 (transformação de arroz); Patente dos Estados Unidos N^o. 5.955.362 (transformação de trigo); 5.969.213 (transformação de monocotilédone); 5.780.798 (transformação de milho); 5.959.179 e 5.914.451 (transformação de soja). Os exemplos representativos incluem captação de DNA facilitada por eletroporação através de protoplastos (Rhodes e outros, *Science* 240:204-207, 1988; Bates, *Methods Mol. Biol.* 111:359-366, 1999; DHalluin e outros, *Methods Mol Biol* 111:367-373, 1999; Patente dos Estados Unidos N^o. 5.914.451); tratamento de protoplastos com polietileno glicol (Lyznik e outros, *Plant Molecular Biology* 13:151-161, 1989; Datta e outros, *Methods Mol Biol*, 111 :335-334, 1999); bombardeio de e de células com microprojéteis carregados de DNA (Klein e outros, *Plant Physiol.* 91:440-444, 1989; Boynton e outros, *Science* 240:1534-1538, 1988; Register e outros, *Plant Mol. Biol.* 25:951-961, 1994; Barcelo e outros, *Plant J.* 5:583-592, 1994; Vasil e outros, *Methods Mol Biol.* 111:349-358, 1999; Christou, *Plant Mol. Biol* 35:197-203, 1997; Finer e outros, *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 240:59-80, 1999). Adicionalmente, as técnicas e estratégias de transformação de planta são revisadas em Birch, *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48:297, 1997; Forester e outros, *Exp. Agric.* 33:15-33, 1997. Variações menores tornam

estas tecnologias aplicáveis a ampla faixa de espécies de planta.

No caso de transformação de monocotilédone, o bombardeio de partícula é tipicamente o método de escolha. Porém, os monocotilédones, tal como milho, também podem ser transformados empregando-se métodos de transformação de *Agrobacterium* como descrito na Patente dos Estados Unidos 5.591.616 por Hiei e outros. Outro método para realizar a transformação de monocotilédone, por exemplo, milho, mistura células de culturas de suspensões embriogências com uma suspensão de fibras (5% em peso/volume, Silar SC-9 whiskers) e DNA de plasmídeo (1 µg/ul) que é então colocado ou verticalmente em uma cabeça de amostra múltipla em um misturador de vórtice Vortex Genie II (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) ou horizontalmente no cabo de um misturador de amálgama dental Mixomat (Degussa Canadá Ltd., Burlington, Ontário, Canadá). A transformação é então realizada por mistura em velocidade máxima durante 60 segundos (por exemplo com um Vortex Genie II) ou agitando-se em velocidade fixa durante 1 segundo (Mixomat). Este processo resulta na produção de populações de célula através das quais transformantes estáveis podem ser selecionados. As plantas são regeneradas dos calos estavelmente transformados e estas plantas e suas progênes podem ser mostradas por análise de hibridação do Sul serem transgênicas. As vantagens principais da abordagem são sua simplicidade e baixo custo. Ao contrário do bombardeio de partícula, equipamento dispendioso e abastecimento não são requeridos. O uso de pêlos para transformação de células de planta, particularmente de milho, é descrito, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos 5.464.765 por Coffee e outros.

A Patente dos Estados Unidos 5.968.830 por Dan e outros, descreve métodos para transformar e regenerar a soja. A Patente dos Estados Unidos 5.969.215 por Hall e outros, descreve as técnicas de transformação para produzir plantas *Beta vulgaris* transformadas, tal como a beterraba açucareira.

Cada uma das técnicas de transformação acima tem vantagens e desvantagens. Em cada uma das técnicas, DNA de um plasmídeo é criado

geneticamente tal que contenha não somente o gene de interesse, porém também genes marcadores avaliáveis e selecionáveis. Um gene marcador selecionável é empregado para selecionar somente aquelas células que têm cópias integradas do plasmídeo (a construção é tal que o gene de interesse e os genes avaliáveis e selecionáveis sejam transferidos como uma unidade). O gene avaliável fornece outra verificação para o cultivo bem sucedido de somente aquelas células que carregam os genes de interesse.

A transformação de *Agrobacterium* tradicional com marcadores selecionáveis de resistência antibiótica é problemática por causa de oposição pública que tais plantas apresentam um risco impróprio de propagação de tolerância anibiótica para animais e seres humanos. Tais marcadores antibióticos podem ser eliminados de plantas transformando-se as plantas empregando as técnicas de *Agrobacterium* similares às aquelas descritas na Patente dos Estados Unidos 5.731.179 por Komari e outros. As questões de resistência antibiótica também podem ser eficazmente evitadas pelo uso de seqüências de codificação *bar* ou *pat*, tal como é descrito na Patente dos Estados Unidos Número 5.712.135. Estes DNAs marcadores preferidos codificam segundas proteínas ou polipeptídeos inibindo ou neutralizando a ação de herbicidas inibidores de glutamina sintetase, fosfinotricina (glufosinato) e sal de amônio de glufosinato (Basta, Ignite).

O plasmídeo contendo um ou mais destes genes é introduzido nos protoplasto de planta ou células calosas por quaisquer das técnicas previamente mencionadas. Se o gene marcador for um gene selecionável, somente aquelas células que incorporaram o pacote de DNA sobrevivem sob seleção com o agente fitotóxico apropriado. Uma vez que as células apropriadas são identificadas e propagadas, as plantas são regeneradas. A progênie das plantas transformadas deve ser testada para assegurar que o pacote de DNA foi de modo bem sucedido integrado no genoma de planta.

Há numerosos fatores que influenciam o sucesso de transformação. O desígnio e construção da construção do gene exógeno e seus elementos reguladores influenciam a integração da seqüência exógena no DNA cromossômico do núcleo de planta e a capacidade do transgene ser expres-

so pela célula. Um método adequado para introduzir a construção de gene exógeno no núcleo de célula de planta de uma maneira não letal é essencial. De modo importante, o tipo de célula no qual a construção é introduzida deve, se plantas inteiras serão recuperadas, ser de um tipo que seja ameno para regeneração, determinado um protocolo de regeneração apropriado.

Métodos de Uso

De acordo com outro aspecto da presente invenção, a divisão célula em uma célula de planta é modulada, por exemplo, aumentada. As células de planta tratáveis por modulação, tal como um aumento de divisão de célula que usa os métodos descritos aqui, são células de planta que expressam um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre que tem regiões de ligação de CDK e ciclina separadas. Geralmente, os métodos incluem expressar dentro da célula de planta um polipeptídeo de CKI mutante como descrito aqui, e permitir o polipeptídeo de CKI mutante inibir a atividade biológica de CKI do tipo silvestre dentro da célula de planta. O polipeptídeo de CKI mutante é expresso de ácido nucléico recombinante codificando a proteína mutante. Além disso, em certas modalidades, o método também inclui introduzir na célula de planta o ácido nucléico recombinante codificando o polipeptídeo de CKI mutante. Os ácidos nucléicos recombinantes codificando o polipeptídeo de CKI mutante, incluindo a construção de tais moléculas recombinantes e sua introdução nas células de planta, geralmente são descritos supra, e são também exemplificados nos Exemplos, infra. A modulação de divisão de célula pode ser realizada em uma planta célula *in vivo*, tal como descrito aqui anteriormente com respeito às plantas transgênicas. Alternativamente, o método pode ser realizado em uma célula de planta *in vitro*.

Como descrito aqui anteriormente, o polipeptídeo de CKI mutante inclui uma seqüência de aminoácido de CKI tendo pelo menos uma modificação com relação a um polipeptídeo de CKI de referência. Com respeito ao método para modulação de divisão de célula, o polipeptídeo de CKI de referência pode ser qualquer polipeptídeo de CKI de planta tipo silvestre expresso dentro da célula de planta na qual a modulação de divisão de célula será realizada (tipicamente o CKI tipo silvestre endógeno). Alternativamente,

porque o uso de uma proteína de CKI mutante como descrito aqui pode permitir a atividade antagonista negativa dominante contra homólogos estruturais ou membros da família do CKI tipo silvestre do qual o mutante é derivado, o polipeptídeo de CKI referência pode ser um polipeptídeo de CKI tipo silvestre heterólogo ao polipeptídeo de CKI do tipo silvestre expresso com a

5 célula de planta que é capaz de fornecer função do tipo silvestre substancialmente equivalente. Desse modo, em alguns casos, uma proteína de CKI mutante, não derivada da proteína de CKI endógena, é expressa em uma célula de planta para inibir a função endógena de CKI tipo silvestre (por exemplo, um polipeptídeo de CKI mutante derivado de uma proteína de KRP

10 tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* pode ser empregado para inibir a função de KRP tipo silvestre em células de planta não heterólogas tal como, por exemplo, células de *Brassica napus*, *Glycine max*, milho e outro). Outros polipeptídeos de CKI mutantes heterólogos derivados de outras plantas, tal

15 como *Brassica napus*, e similares, também podem ser empregados.

Além disso, em certas modalidades do método, uma pluralidade de CKIs relacionados é simultaneamente inibida em uma planta célula que usa um CKI mutante da presente invenção. Por exemplo, em algumas modalidades, todos os CKIs endógenos dentro de uma família (por exemplo,

20 membros da família de KRP) são simultaneamente inibidos. Como notado acima, uma proteína de CKI mutante, como descrito aqui, permite a atividade antagonista negativa dominante dentro de membros de família ou homólogos estruturais do CKI tipo silvestre do qual a variante é derivada, desse modo permitindo tal inibição simultânea de homólogos múltiplos ou membros

25 de família. Desse modo, em modalidades típicas, uma pluralidade de (e preferivelmente todos) CKIs que tem similaridade ou identidade de sequência substancial dentro da região de ligação de CDK ou ciclina-alvo é inibida em uma célula de planta. Por exemplo, em certas modalidades, quando os membros familiares de KRP compartilham identidade de sequência substancial dentro da região de ligação de CDK, que é principalmente responsável

30 pela inibição de atividade de ciclina-CDK cinase, uma pluralidade de, e preferivelmente todos, membros da família de KRP endógena em uma célula de

planta é inibida por expressão de um CKI de KRP mutante para modular a divisão de célula.

Como descrito acima, eficazmente ao bloquear as proteínas de CKI endógenas de inibir as atividades de ciclina/CDK, a divisão de célula em uma célula de planta é modulada. Tal modulação inclui aceleração de progressão pelo ciclo celular e, finalmente, proliferação celular aumentada. Consequentemente, ao usar os métodos apresentados aqui *in vivo* (por exemplo, plantas transgênicas, vide supra), um aumento nas produções de colheita e/ou tamanho de semente, vigor de planta aumentado, massa de raiz aumentada, tamanho de fruto aumentado, e similares podem ser obtidos.

A produção de colheita aumentada pode se manifestar em uma variedade de forma que dependem do tecido de planta e espécies de planta específicos nos quais o ciclo celular de planta foi modulado bloqueando-se as proteínas de CKI endógenas de inibir as atividades de ciclina/CDK.

Em colheitas de semente tal como milho, arroz, trigo, cevada, soja, canola, a produção aumentada pode tomar a forma de número de semente total aumentado, tamanho de semente aumentado, ou ambos número de semente e tamanho de semente aumentados. Em uma modalidade, a produção aumentada é obtida em variedades transgênicas de quaisquer das colheitas de semente através de expressão de um transgene codificando uma proteína de CKI mutante que resulta em divisão de célula aumentada e número de semente total aumentado, sementes maiores, ou tanto o número de semente quanto o tamanho de semente aumentado. Em uma modalidade, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor constitutivo. Em outra modalidade exemplar, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor específico de semente alvejando o efeito da proteína de CKI mutante para a semente que é o componente agronomicamente importante de uma colheita de semente.

Para colheitas de semente oleaginosa, tal como soja, canola, camelina, linho, milho, açafoa, ou girassol, e outro, onde o produto desejado

é óleo, a produção aumentada toma a forma de produção de óleo maior por planta. O óleo é derivado do embrião na semente. Em uma modalidade, a produção de óleo aumentada é obtida em variedades transgênicas de quaisquer das colheitas de semente oleaginosa através de expressão de um transgene codificando uma proteína de CKI mutante que causa a divisão de célula aumentada levando ao número de semente total aumentado, tamanho de embrião aumentado, ou tanto número de semente quanto tamanho de embrião aumentado. O número de semente total aumentado por planta resulta em produção de óleo total aumentada por planta. O tamanho de embrião aumentado resulta em maior conteúdo de óleo por semente e produção de óleo total aumentada por planta. Em uma modalidade preferida, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor específico de embrião determinando a divisão de célula aumentada em desenvolvimento de embrião precoce que resulta em um embrião maior, uma quantidade de óleo aumentada por semente, e um aumento correspondente na produção de óleo total por planta.

A produção de biomassa de não semente é o componente de produção principal de colheitas tal como alfafa, alface, tabaco, eucalipto, e álamo. A produção aumentada em tais colheitas seria vista no crescimento total aumentado da planta que resulta em acumulação aumentada de biomassa. Em uma modalidade, a biomassa aumentada é obtida em variedades transgênicas de quaisquer das colheitas de biomassa através de expressão de um transgene codificando uma proteína de CKI mutante que causa divisão de célula aumentada que leva a biomassa e crescimento aumentado. Em uma modalidade, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor determinando expressão constitutiva da proteína de CKI mutante codificando transgene na maioria ou todos os tecidos da planta. Em uma modalidade preferida, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor específico de tecido que alveja a expressão de um transgene ao componente agronomicamente importante da planta como a folha em alface ou tabaco ou o tronco em eucalipto ou álamo para aumentar a acumulação de biomassa no

tecido-alvo.

O açúcar ou celulose é o componente de produção principal de colheitas desenvolvidas para produção de etanol incluindo cana-de-açúcar, beterraba açúcareira, milho, e *Panicum virgatum*. Em uma modalidade, açúcar aumentado é obtido em variedades transgênicas de quaisquer das colheitas de produção de açúcar tal como cana-de-açúcar ou beterraba açúcareira através de expressão de um transgene codificando uma proteína de CKI mutante que causa divisão de célula aumentada, crescimento aumentado do tecido de acumulação de açúcar da planta, e conteúdo de açúcar total aumentado por planta. Em uma modalidade, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante em colheitas produtoras de açúcar é controlada por um promotor determinando a expressão constitutiva da proteína de CKI mutante codificando transgene na maioria ou todos os tecidos da planta. Em uma modalidade preferida, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor específico de tecido alvejando a expressão de transgene para o tecido de acumulação de açúcar da planta tal como a cana em cana-de-açúcar ou a raiz em beterraba açúcareira desse modo aumentando a proliferação de célula e crescimento do tecido de armazenamento e acumulação de açúcar da planta que resulta no conteúdo de açúcar total aumentado. Em outra modalidade, a celulose aumentada é obtida em variedades transgênicas de quaisquer das colheitas produtoras de celulose, tal como milho ou *switchgrass* através de expressão de um transgene codificando uma proteína de CKI mutante, que causa divisão de célula aumentada e síntese de parede de célula desse modo aumentando o conteúdo de celulose que é um componente da parede de célula. Em uma modalidade, a expressão do transgene de proteína de CKI mutante é controlada por um promotor determinando a expressão constitutiva da proteína de CKI mutante codificando transgene na maioria ou todos os tecidos da planta. O aumento geral conseqüente na proliferação de célula resulta na deposição de parede de célula aumentada e portanto conteúdo de celulose total aumentado da planta.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, porém não limitar, a invenção reivindicada.

Exemplo 1. Produção/purificação de um complexo de ciclina:CDK ativo e a produção/purificação de moléculas de Krp.

5 Células de inseto e meios

O sistema de expressão de baculovírus é um sistema eucariótico versátil para expressão de gene heteróloga. Este sistema fornece duplicação de proteína correta, formação de ligação de dissulfeto e outras modificações pós-translacionais importantes. Todos os métodos foram tomados do sistema de vetor de expressão de *Baculovirus*. Procedimentos e métodos manuais. (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA. 6^a ed.). As células de inseto Sf9 foram desenvolvidas a 27°C em meio de célula de inseto TNM-FH (BD Biosciences) para os estudos reportados. Deveria ser notado que meios alternativos são bem-conhecidos pelo técnico versado e são também úteis.

15 Similarmente, as linhagens de célula de inseto alternativas tal como células de Sf21 e High Five TM também trabalharão para produção de vírus e produção de proteína.

Mancha do Oeste e Imunoprecipitações.

A proteína recombinante expressa em células de inseto foi monitorada através de mancha do oeste. Os extratos de proteína (35,0 g) foram fervidos na presença de tampão de Laemmli, executados em 10% ou 12% de géis SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de PVDF empregando um aparato de transferência submerso (BioRad). Seguinte a transferência, a membrana foi bloqueada em TBS-T (25 mM de Tris pH 7,5; 75 mM de NaCl; 0,05% de Tween) contendo 5% de pó de leite seco sem gordura. Anti-

20 corpo primário foi empregado em diluição de 1: 1000 durante a noite em tampão de bloqueio de TBS-T. As manchas foram lavadas três vezes 15 minutos em temperatura ambiente. Um anticorpo secundário apropriado conjugado para peroxidase de raiz forte (HRP) foi empregado a diluição de

25 1:10.000 em tampão de bloqueio de TBS-T. As manchas foram incubadas em anticorpo secundário durante 1 hora e então lavadas três vezes em TBS-T, 15 minutos cada. As manchas foram então processadas como descrito no

30

protocolo de sistema ECL (Amersham Biosciences). Os anticorpos geralmente empregados foram: anticorpo monoclonal anti-flag M2 (Sigma), anticorpo monoclonal ou policlonal anti-HA (Babco), anticorpo anti-PSTAIR (Sigma - Aldrich), monoclonal ou policlonal anti-myc (A-14) (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos secundários empregados foram IG-HRP anticumundongo, e IG-HRP anticoelho (GE Healthcare).

As imunoprecipitações foram realizadas habitualmente para monitorar a formação de complexo entre moléculas de AtciclinaD2;1, AtCDKA e Krp. Os extratos de proteína (14,0 µg) foram diluídos em 0,5 ml de tampão de ligação (100 mM de tampão de fosfato de sódio pH 7,0, 150 mM de NaCl, 1% de Triton 100 mais inibidores de protease). A mistura de Proteína/anticorpo foi chacoalhada suavemente a 4°C durante cerca de duas horas e em seguida o anticorpo apropriado foi adicionado. (2 µg de anticorpo anti-flag M2; 5 µl de anticorpo anti-HA; 5 µ de anti-myc policlonal). A proteína A sefarose de foi adicionada para produzir um volume de leite de 10 µl. Os imunoprecipitados foram então suavemente misturados durante 1 hora a 4°C e lavados 3 vezes com 1 ml de tampão de ligação. Os complexos de proteína ligados às contas de proteína-A sefarose foram então fervidos na presença de tampão de Laemmli. Os complexos de proteína foram resolvidos em 10% ou 12% de géis de SDS-PAGE e transferidos para membrana de PVDF. As membranas foram manchadas como descrito acima.

Construção de Vetor de Baculovírus

As seqüências de cDNA de ciclina de Arabidopsis D2; 1 (AtciclinaD2; 1) e CDKA de Arabidopsis (AtCDKA) foram epitopos rotulados e clonados em um vetor de transferência de baculovírus (BD Biosciences). Outros sistemas de vetor de transferência conhecidos pelo técnico também podem ser empregados. AtCiclinaD2; 1 foi rotulado com o epitopo FLAG (Sigma - Aldrich) na N-terminação adicionando-se as seqüência de aminoácido Met Asp Tyr Lys Ala Phe Asp Asn Leu (MDYKAFDNL) (SEQ ID NO.: 18) por PCR e então clonadas no vetor de transferência p AchLT (BD Biosciences). Outros sistemas de vetor de transferência de Baculovírus tal como Baculodirect (Invitrogen), também podem ser empregados para este propósito. A se-

qüência de aminoácido de epitopo de hemaglutinina (HA) Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 19) foi colocada na estrutura com as terminações 5' de AtCDKA por PCR e então clonada no vetor de transferência VL1393 (AB Vector.CA). A ciclina e CDK foram epitopos alve-
 5 jados para permitir a identificação através de mancha do Oeste e para experiências de imunoprecipitação. A ciclina e/ou CDK também podem ser empregados sem rótulo. Outros sistemas de vetor de transferência compatíveis também podem ser empregados.

Produção de Vírus Recombinante

10 O genoma de Baculovírus empregado é Baculovirus Baculogold Bright (BD Biosciences). Os genomas de Baculovírus alternativos também podem ser empregados. A versão rotulada de Flag de AtciclinaD2;1 foi introduzida em uma região dispensável do genoma viral de baculovírus empregando recombinação homóloga. A recombinação homóloga ocorreu quando
 15 o vetor de transferência que contém ciclina D2; 1 foi co-transfectado com o DNA de Baculovirus Baculogold Bright BD linearizado em células de inseto Sf9. As células de SfP foram semeadas em 2×10^6 células em discos de 60 mm e transitoriamente co-transfectadas com 2 µg de vetor de transferência ciclina D2;1 (pAChLT-ciclinaD2;1) mais 0,5 µg de DNA de Baculovirus Baculogold Bright BD linearizado empregando reagente de transfecção Fugene 6
 20 de acordo com o protocolo do fabricante (Roche Diagnostics). Após 4 horas de transfecção a solução de Fugene/DNA foi removida e substituída com 3 ml de meio de TNM-FH. Quatro (4) dias depois, o sobrenadante foi coletado e subsequente mente empregado para infectar mais células para amplificação do vírus. Esta amplificação foi repetida até que o título de vírus fosse
 25 pelo menos 10^9 de partículas de vírus/ml. O vírus foi amplificado infectando-se células de Sf9 a uma multiplicidade de infecção (moi) de < 1 . O título de vírus foi monitorado empregando microscopia de fluorescência e luz.

A versão rotulada de HA de AtCDKA 1 foi introduzida em uma
 30 região dispensável do genoma viral de baculovírus empregando recombinação homóloga. A recombinação homóloga ocorreu quando o vetor de transferência que contém ciclina D2;1 foi co-transfectado com o DNA de Baculovi-

rus Baculogold Bright BD linearizado em células de inseto Sf9. As células de Sf9 foram semeadas a 2×10^6 células em discos de 60 mm e transitoriamente co-transfectadas com 2 µg de vetor de transferência AtCDKA (pVL1393-AtCDKA) mais 0,5 µg de DNA de Baculovirus Baculogold Bright BD linearizado empregando reagente de transfecção Fugene 6 de acordo com protocolo do fabricante (Roche Diagnostics). Após 4 horas de transfecção a solução de Fugene/DNA foi removida e substituída com 3 ml de meio de TNM-FH. Quatro (4) dias depois, o sobrenadante foi coletado e subsequentemente empregado para infectar mais células para amplificação de vírus. Esta amplificação foi repetida até que o título de vírus fosse pelo menos 10^9 partículas de vírus/ml. O vírus foi amplificado infectando-se células de Sf9 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de < 1 . O título de vírus foi monitorado empregando microscopia de fluorescência e luz.

Produção de Proteína Recombinante em Células de Inseto.

A produção de proteína de AtCiclinaD2;1 rotulada com Flag: AtCiclinaD2;1 Rotulado foi obtida infectando-se células de Sf9 frugiperda com baculovírus de AtCiclinaD2;1. Para este fim, as células de Sf9 que foram crescidas em suspensão a 2×10^6 /ml foram infectadas com baculovírus recombinante a um MOI > 5 (porém outros MOIs mais elevados ou ligeiramente mais baixos também funcionarão) durante cerca de 4 a 5 dias e em seguida colhidas. As células foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm a 4°C. O pélete de célula foi lavado com meio fresco e em seguida centrifugado a 3000 rpm a 4°C. O pélete foi congelado a -80°C ou imediatamente lisado. O tampão de Lise consistiu em 20 mM de Hepes pH 7,5, 20 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20% de glicerol, 20 mM de $MgCl_2$ mais inibidores de protease (Compleat Mini, EDTA free, Boehringer Mannheim), 1 comprimido por 10 ml de tampão de lise. O lisado de célula foi sonificado em gelo 2 vezes durante 15 segundos. O lisado de proteína foi então centrifugado a 40.000 rpm em um rotor Beckman TLA 100.2 durante 2 horas. O sobrenadante que contém o AtCiclinaD2;1 rotulado foi aliquoteado e congelado a -20°C. A expressão foi monitorada por mancha do Oeste empregando anticorpo monoclonal anti-Flag M2 (Sigma - Aldrich).

A produção AtCDKA rotulado foi obtida por infecção de células de Sf9 de *S. frugiperda* com baculovírus AtCDKA e processada da mesma maneira como descrito acima. A expressão foi monitorada por mancha do Oeste empregando anticorpo monoclonal ou policlonal anti-HA (Babco). A

5 expressão também pode ser monitorada por mancha do Oeste empregando anticorpo anti-PSTAIR (Sigma-Aldrich).

Um complexo de cinase ativo de AtcyclinaD2; 1/AtCDKA foi preparado por co-infecção de células de *S. frugiperda* de S& com baculovírus de AtcyclinaD2;1 (MOI > 5) mais AtCDKA (MOI > 5). O complexo ativo foi

10 purificado como descrito acima. A expressão de proteína foi monitorada por mancha do Oeste de extratos de célula de inseto empregando anticorpo anti-Flag M2 ou anticorpo anti-HA. A interação de AtcyclinaD2;1 e AtCDKA foi monitorada através de co-imunoprecipitação como descrito infra.

Ensaio de Cinase

15 Um ensaio *in vitro* foi desenvolvido para testar várias moléculas de KRP/ICK quanto à capacidade de inibir os complexos de ciclina/CDK.

A atividade de cinase em extratos de proteína de células de inseto infectadas com baculovírus individual ou uma co-infecção com os dois baculovírus foi monitorada com um ensaio de cinase padrão. Histona H1

20 (HHI) foi o substrato de princípio empregado porém a proteína de retinoblastoma de tabaco recombinante (Nt Rb) também pode ser empregada como o substrato (vide Koroleva e outros, Plant Cell 16, 2346-79, 2004). Os ensaios de cinase foram realizados como segue: 7 µg de extrato de proteína de célula de inseto foram adicionados a um coquetel de tampão de cinase (KAB: 50

25 mM de Tris pH 8,0, 10 mM de MgCl₂, 10 uM de ATP mais 0,5 µCi/ml ³²PγATP e 2 µg de HHI) para um volume final de 30 µl. As reações foram incubadas a 27°C durante 30 minutos. A reação de cinase foi interrompida com um volume igual (30 µl) de 2X de tampão Laemmli. A incorporação de [³²P] fosfato foi monitorada por auto-radiografia e/ou Molecular Dynamics

30 PhosphorImager seguinte SDS-PAGE em 12% de géis. As condições de tampão alternativas para realizar ensaios de CDK cinase também podem ser empregadas. (Vide, por exemplo, Wang e Fowke, Nature 386:451-452, 1997;

Azzi e outros, Eur. J. Biochem. 203:353-360, 1992; Sirpo e outros, Mol Cell Biol. 14:4889-4901, 1994.)

Resultados: Extrato de proteína de células de inseto infectadas com AtciclinaD2;1 sozinho ou AtCDKA sozinho mostrou nenhuma atividade de cinase empregando HHI como o substrato. As células de inseto co-infectadas com vírus AtciclinaD2;1 e vírus de AtCDKA contiveram uma atividade de cinase robusta. As cinases tipo CDK ativo (tipo cdc2) também podem ser purificadas de extratos de tecido de proteína de planta ou de extratos de célula de cultura de tecido de planta empregando-se contos de agarose de pl3sucI (Vide, Wang e Fowke, Nature 386:451-452, 1997; Azzi e outros, Eur. J. Biochem. 203:353-360, 1992) e empregadas em um ensaio similar descrito acima e em experiências de competição descritas abaixo nos Exemplos 2 até 8.

Clonagem de CDNAs de Krp em vetor de expressão bacteriano.

15 Clonagem de AtKrp1

O cDNA de AtKrp1 foi clonado de cDNA de Arabidopsis por PCR empregando os seguintes oligonucleotídeos:

(começo) 51 ATGGTGAGAAAATATAGAAAAGCT-S (SEQ ID NO:20); (fim) S'-TCACTCTAACTTTACCCATTCGTA-S (SEQ ID NO:21).

20 O fragmento de PCR resultante foi subclonado em vetor de p-CRII-TOPO (Invitrogen). O vetor resultante AtKrp1 Nº 359 foi seqüenciado para verificar a seqüência correta para GenBank Nº U94772.

5' RACE de clonagem de Krp1 de *Brassica napus*

Blastn foi empregado no Centro Nacional para site da Internet de Informação de Biotecnologia para encontrar seqüências de Brassica homólogas aos cds de AtKRPI. A pesquisa produziu dois candidatos de EST, CD820320 e CD829052 que se mostraram ser seqüências idênticas. CD820320 foi levado pelo blastx de Jorja para verificar que a seqüência de nucleotídeo transladada do EST significativamente se equiparou a seqüência de proteína de At KRP1.

CD829052 é 646 bp e inclui os últimos 106 aminoácidos de uma seqüência de KRPI de *Brassica oleracea* e 321 bp do 3' UTR. Um iniciador

de 5' RACE (GSP|brasskrpl_5'RACE: 5'-CTCTGATAATTTAACCCACTCGT AGCGTCCTTCTAATGGCTTCTC -3'; SEQ ID NO: 22) foi designado para restaurar um KRP1 de Bn de tamanho natural. O iniciador de RACE conteve os últimos 45 nucleotídeos da seqüência de codificação de CD820320.

- 5 cDNA 5' RACE pronto foi feito de folha de DH12075 de *Brassica napus* empregando o Kit de Amplificação de cDNA SMART RACE (Clontech). 5'RACE foi realizado neste cDNA de acordo com as instruções do *kit*, exceto que tampão e enzima de pfu (Stratagene) foram empregados em vez de KlenTaq. As condições de PCR foram: uma desnaturação inicial a 94°C
- 10 durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos, 72°C durante 3 minutos. O produto de PCR resultante foi uma faixa muito lânguida de cerca de 600 bp. 2,5. µl deste produto de PCR foram então reamplificados empregando as condições de PCR acima. O produto de PCR resultante foi clonado no vetor TOPO Blunt (Invitrogen) e
- 15 transformado em células alfa ouro (Bioline). O DNA de plasmídeo de dois transformantes foi recuperado e as inserções seqüenciadas com iniciadores dianteiro e inversos M13. A seqüência de uma inserção candidata foi idêntica a CD820320 e foi designada Bn KRP1-II (nenhuma seqüência nova adicional veio de RACE). A seqüência da outra inserção candidata, Bn designada KRP1-I, foi 94% idêntica a Bn KRPI-II no nível de nucleotídeo na região
- 20 de codificação, e 86% idêntica no nível de aminoácido para os últimos 106 resíduos. A RACE recobrou a seqüência de codificação total de Bn KRP1-I com um 108 bp adicional de 5' UTR em vetor TOPO Blunt (pTG313). A seqüência de codificação BnKrp1 (SEQ ID NO:23) é mostrada abaixo:

```

1  atggtgagaaaatgcagaaaaactaaaggagcggtgggagcttcgtctacgtatatgcagcttcgcagccggagaatcgt      80
81  ttacagatcggaagctagctcgtcgtcgtctgtgtgcgcgagtaacaacaatggagttatagatcttgaggagg      160
161  aaagagatggtagactgaaacgtcgtcgtgtgcgcgagtagtaagaggaagctatttgaaaacctagagaaaaagaa      240
241  tctatggagaattcacagcaaatcgtagctggtttgattccgccgtgaaagaatcatcgattgtgttgacccggag      320
321  aacatctttgtcaacgacggaggagaaggggaaatcagcgacggagcaaccaccaacggcagtgaggattgaagatttt      400
401  tcgtggaagctgagaaacagctccatgataattcaagaagaagtataacttgatttcgaaaaggagaagccattagaa      480
481  ggacgctacgagtggttaaattatcagagtaa 513

```

- 25 O vetor de expressão bacteriano pETI 6b contém a seqüência de

codificação de 6 Histidinas (6XHis, ou (His)₆ ou hexaHis) em série para permitir a purificação de proteína por cromatografia por afinidade de metal imobilizado (Novagen). Este vetor foi modificado de um tal modo para também incluir um epitopo de poli-Myc imediatamente a jusante e na estrutura com a sequência de codificação de 6XHis (pET16b-5MYC). O cDNA de AtKrp1 de tamanho natural foi amplificado de cds de pTG N° 359 TopoIIAtKrp1 empregando dois oligonucleotídeos que flanqueiam a sequência de codificação inteira. Estes oligonucleotídeos contiveram sítios de enzima de restrição que facilitam a clonagem no vetor de pET16B-5MYC (5'AtKrp1 Bam HI/NdeI: ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATATAG (SEQ ID NO:24) e 3'AtKrp1Xho I: ATCGCTCGAGTCACTCTAACTTTAC (SEQ ID NO:25). O fragmento de PCR resultante foi subclonado no sítio de BamHI e Xho I de pET16b-5myc. O vetor resultante AtKrp N° 385 conteve o cDNA tipo silvestre AtKrp1 na estrutura com os rótulos 6XHis e myc.

Os seguintes dois oligonucleotídeos foram empregados para amplificar o cDNA de BnKrp1 que adiciona um sítio de 5' B α mHI/NdeI e sítio de restrição XhoI na terminação 3' de BnKRP1 (5' BnKrpI B α mHINdeI ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEQ ID NO:26) e 3' BnKrp 1 XhoI; ATCGCTCGAGTCACTCTGATAATTAAAC (SEQ ID NO:27). O fragmento de PCR foi amplificado de pTG N° 313 (TopoII BnKrp1) e subclonado no sítio de B α mHI e XhoI de pET16b-5myc e seqüenciado. O vetor resultante BnKrp N° 461 conteve o cDNA tipo silvestre BnKrp1 na estrutura com os rótulos de 6XHis e myc.

Purificação e expressão de proteína Krp recombinant em bactérias.

Todos os plasmídeos de expressão bacterianos pET1 6b e pET1 6b-5MYC carregando inserções foram transformados em BL21 Star (DE3) (Invitrogen). As colônias bacterianas desta transformação fresca foram empregadas para inocular 400 ml de LB que contém 100 μ g/ml de ampicilina e crescidas a 37°C. Quando a cultura alcançou um OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 de proteína recombinante, a expressão foi induzida com 0,5 mM de isopropil-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As células foram então crescidas a 30°C durante três horas. As células foram coletadas por centrifugação em um rotor

JLA 10.500 Beckman. Pélete de célula bacteriana foi armazenado a -80°C ou lisado imediatamente. As bactérias foram lisadas em 10 ml de tampão de lise de fosfato (100 mM de tampão de fosfato pH 7,0, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X100) contendo inibidores de protease e necessitando de EDTA. A

5 cultura bacteriana ressuspensa foi sonicada 4X 20 segundos em gelo úmido a 40% de força. As células lisadas foram centrifugadas a 14.000 rpm em rotor Beckman JA 20.1 durante 15 minutos a 4°C . O pélete de célula foi lavado com 10 ml de tampão de lise de fosfato e o pélete de célula foi coletado novamente através de centrifugação. As moléculas de KRP rotuladas foram

10 principalmente insolúveis. KRP rotulados insolúveis foram solubilizados em tampão de Uréia (8M de uréia, 100 mM de Tris pH 7,5). O pélete de célula ressuspensa foi brevemente sonificado 3X 15 segundos em gelo úmido a 40% de força. As proteínas insolúveis em uréia foram eliminadas por centrifugação a 14.000 rpm em rotor Beckman JA20.1 durante 15 minutos a 4°C .

15 Os KRPs rotulados foram purificados em batelada empregando resina de afinidade de metal de Co^{2+} BD Talon equilibrada em tampão de Uréia. A purificação em batelada foi incubada a 4°C 3 horas durante a noite sob rotação lenta. A suspensão foi carregada em uma coluna e resina foi lavada com 36 volumes de cama de leito de tampão de uréia seguido por um leito de 12

20 volumes de tampão de uréia que contém 5 mM de Imidazol pH 7,5. A proteína de KRP rotulada ligada foi eluída empregando tampão de uréia que contém 300 mM de Imidazol pH 7,5. As frações foram monitoradas para KRP rotulado por SDS-page e/ou por ensaio de proteína Bradford (BioRad). A reduplicação do KRP1 rotulado desnaturado foi realizada empregando diálise

25 de diluição em etapas. As frações que contêm a maioria de proteína de KRP rotulada foram combinadas e dialisadas em uma Uréia IM, 100 mM de Tris pH7,5, 150 mM de NaCl e 5mM de β -mercaptoetanol mais 5mM de benzamidina durante 20 horas a 4°C . O tampão de diálise foi então alterado para 0,5 M de Uréia, 100 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl e 5 mM de β -

30 mercaptoetanol mais 5mM de benzamidina e continuou durante um adicional de 12 horas. A proteína recombinante foi coletada, quantificada por ensaio de Bradford e armazenada a 4°C .

Mutagênese de Krps.

As versões do tipo silvestre de membros da família de AtKRP e membros da família de BnKRP foram subclonadas no vetor de pCRII-TOPO básico (Invitrogen) para propósitos de seqüenciamento e mutagênese.

5 O mesmo fragmento de PCR de cDNA do tipo silvestre de AtKRP1 contendo o sítio 5'-BamH β construído e o sítio 3' Xho β (vide "Clonagem de cDNAs de Krp em vetor de expressão bacteriano", supra) foi subclonado no vetor de pCRII-TOPO (Invitrogen) para mutagênese. O vetor resultante Topo-AtKrp N $^{\circ}$ 385B conteve o cDNA tipo silvestre de AtKRPI e foi verificado corrigir a seqüência empregando seqüenciamento automatizado padrão. O mesmo fragmento de cDNA tipo silvestre de BnKRPI de acima foi subclonado em vetor pCRII-TOPO (Invitrogen) para mutagênese. O vetor resultante Topo-BnKrp N $^{\circ}$ 539 conteve o cDNA tipo silvestre BnKRPI que e foi verificado corrigir seqüência empregando análise de seqüenciamento automatizada padrão.

A mutagênese direcionada ao sítio foi realizada de acordo com o protocolo para o *kit* de mutagênese direcionada ao sítio Stratagene's Quik Change.

Para construir BnKrp1 N $^{\circ}$ 462 com substituições de aminoácidos múltiplas na região de ligação de ciclina putativa (E129A, E130A, I131 A, D132A) o BnKrp1DbleMutN $^{\circ}$ 1 de sentido (GGAGCAACCACCAACGGCAGT GGCTGCTGCTGCTTTTTTCGTG; SEQ ID NO:28) e BnKrp1DbleMutN $^{\circ}$ 1b de anti-sentido (CACGAAAAAAGCAGCAGCAGCCACTGCCGTTGGTGGTTG CTCC; SEQ ID NO:29) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpN $^{\circ}$ 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas. O produto de mutante foi em seguida subclonado no sítio de BamHII/XhoI de pET16b-5MYC para finalmente produzir BnKrp1N $^{\circ}$ 462.

Para construir BnKrp1 N $^{\circ}$ 512 com duas substituições de aminoácidos nos resíduos altamente conservados da região de ligação de CDK (F151A, F153A) o oligonucleotídeo de BnKrp1DbleMutN $^{\circ}$ 2 de sentido (CCT TCTAATGGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEQ

ID NO:30) e oligonucleotídeo de BnKrp1DbleMutNº 2b de anti-sentido (TTC AAGAAGAAGTATAACGCTGATGCTGAAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEQ ID NO:31) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e então e subclonado no sítio de BamHI/XhoI de pET16b-5MYC. As mesmas substituições de aminoácido também foram introduzidas em AtKRP1 empregando AtKrp1-Topo Nº 385B como o modelo empregando os seguintes oligonucleotídeos QC ICK1 cds F173A, F175A-codificação" 5'-TTCAAGAAG AAGTACAATGCCGATGCCGAGAAGGAGAAGCCATTA-S; (SEQ ID NO:32) e "QC ICK1cds F173 A, F175A-noncod" 5'-TTATGGCTTCTCCTTCTGGG CATCGGCATTGTACTTCTTCTTGAA-3 (SEQ ID NO:33).

Para BnKrp1Nº 463 com substituições de aminoácidos da região de ligação de ciclina putativa e resíduos altamente conservados na região de ligação de CDK (E 129 A, E 130A, I131 A, D132A,+ F151A,F153A) o oligonucleotídeo de BnKrp1DbleMutNº 2 de sentido ((CCTTCTAATGGCTTCTCCT TTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEQ ID NO:30) e oligonucleotídeo de BnKrp1DbleMutNº 2b de anti-sentido (TTCAAGAAGAAGTATA ACGCTGATGCTGAAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEQ ID NO:32) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com BnKrpNº 462 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclonado no sítio de BamHI/XhoI de pET16b-5MYC.

Para construir BnKrp1 Nº 586 com uma única substituição de aminoácidos na região de ligação de CDK (K148A) o oligonucleotídeo de BnKrp1K148A de sentido (GATAATTTCAAGAAGGCGTATAACTTTGAT TTC; SEQ ID NO:34) e oligonucleotídeo de BnKrp1K148A de anti-sentido (GAAATCAAAGTTATACGCCTTCTTGAAATTATC; SEQ ID NO:35) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e então subclonado no sítio de BamHI/XhoI de pET16b-5MYC.

Para construir BnKrp1 N° 587 com uma única substituição de aminoácidos na região de ligação de CDK (Y149A) o oligonucleotídeo de BnKrp1Y149A de sentido (AATTTCAAGAAGAAGGCTAACTTTGATTTTCGAA; SEQ ID NO:36) e oligonucleotídeo de BnKrp1Y149A de anti-sentido (TTCG
5 AAATCAAAGTTAGCCTTCTTCTTGAAATT; SEQ ID NO:37) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpN° 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi sequenciado para verificar a presença de mutações desejadas e então subclonado no sítio de BamHI / XhoI de pET16b-5MYC.

10 Para construir BnKrp1 N° 588 com uma única substituição de aminoácidos na região de ligação de CDK (N150A) o oligonucleotídeo de BnKrp1N150A de sentido (TTCAAGAAGAAGTATGCCTTTGATTTTCGAAAAG; SEQ ID NO:38) e oligonucleotídeo de BnKrp1N150A de anti-sentido (CTT
15 TTCGAAATCAAAGGCATACTTCTTCTTGAA; SEQ ID NO:39) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpN° 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi sequenciado para verificar presença de mutações desejadas e então subclonado no local de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

Para construir BnKrp1 N° 572 com uma única substituição de aminoácidos na região de ligação de CDK (F151A) o oligonucleotídeo de BnKrp1F151A de sentido (AGAAGAAGTATAACGCTGATTTTCGGAAAGGA; SEQ ID NO:40) e oligonucleotídeo de BnKrp1F151A de anti-sentido (TCCT
20 TTTTCGAAATCAGCGTTATACTTCTTCT; SEQ ID NO:41) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpN° 539
25 como o modelo. O produto de mutagênese foi sequenciado para verificar a presença de mutações desejadas e então subclonado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

Para construir BnKrp1 N° 573 com uma única substituição de aminoácidos na região de ligação de CDK (F153A) o oligonucleotídeo de BnKrp1F153A de sentido (AGTATAACTTTGATGCCGAAAAGGAGAAGCC; SEQ ID NO:42) e oligonucleotídeo de BnKrp1F153A de anti-sentido (GG
30 CTTCTC CTTTTCGGCATCAAAGTTATACT; SEQ ID NO:43) foram empre-

gados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e então subclonado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- 5 Para construir BnKrp1 Nº 553 com duas substituições de amino-
ácidos na região de ligação de CDK (K157A; P 158A) o oligonucleotídeo de
BnKrp1KP→AA de sentido (GATTTTCGAAAAGGA GGCGGCATTAGAAG-
GACGCT; SEQ ID NO:44) e o oligonucleotídeo de BnKrp1KP→AA de anti-
sentido (AGCGTCCTTCTAATGCCGCCTCCTTTTCGAAATC)(SEQ ID NO:45)
10 foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com
TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüencia-
do para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclo-
nado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- Para construir BnKrp1 Nº 554 com duas substituições de amino-
15 ácidos na região de ligação de CDK (R162A; Y163A) o oligonucleotídeo de
BnKrp1RY→AA de sentido (GCCATTAGAAGGA GCCGCCGAGTGGGTTA-
AATT; SEQ ID NO:46) e o oligonucleotídeo de BnKrp1RY→AA de anti-
sentido (AATTTAACCCACTCGGCGGCTCCTTCTAATGGC; SEQ ID NO:47)
foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com
20 TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüencia-
do para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclo-
nado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- Para construir BnKrp1 Nº 555 com duas substituições de amino-
ácidos na região de ligação de CDK (E164A; W165A) o oligonucleotídeo de
25 BnKrp1EW→AA de sentido (AGAAGGACGCTAC GCGGCGGTAAATTATC
AGA; SEQ ID NO: 48) e o oligonucleotídeo de BnKrp1EW→AA de anti-
sentido (TCTGATAATTTAACCGCCGCGTAGCGTCCTTCT; SEQ ID NO: 49)
foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com
TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüencia-
30 do para verificar a presença de mutações desejadas e seguida subclonado
no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

 Para construir BnKrp1 Nº 556 com duas substituições de amino-

ácidos na região de ligação de CDK (K167 A; L168A) o oligonucleotídeo de BnKrp1KL→AA de sentido (CGCTACGAGTGGGTTGCAGCATCAGAGTG AGAGC; SEQ ID NO: 50) e o oligonucleotídeo de BnKrp1KL→AA de anti-sentido (GCTCTCACTCTGATGCTGCAACCCACTCGTAGCG; SEQ ID NO:51)

- 5 foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpNº 539 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclonado no local de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- Para construir BnKrp1 Nº 574 com substituições de aminoácido múltiplas na região de ligação de CDK (F151A; F153A; E164A; W165A) o oligonucleotídeo BnKrp1F151A, F153A (CCTTCTAATGGCTTCTCCTTTTCA GCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEQ ID NO: 52) de anti-sentido F151A, oligonucleotídeo de F153A (TTCAAGAAGAAGTATAACGCTGATG CTGAAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEQ ID NO:53) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com BnKrp1 Nº 555 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclonado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- Para construir BnKrp1 Nº 598 com substituição de aminoácidos múltipla na região de ligação de CDK (Y149A;F151A;F153A) o oligonucleotídeo de BnKrp1Y149A de sentido (AATTTCAAGAAGAAGGCTAACGCTGATGCTGAA; SEQ ID NO:54) e o oligonucleotídeo de BnKrp1Y149A de anti-sentido (TTCAGCATCAGCGTTAGCCTTCTTCTTGAAATT; SEQ ID NO: 55) foram empregados para mutagênese direcionada ao sítio QuikChange com TopoBnKrpNº 512 como o modelo. O produto de mutagênese foi seqüenciado para verificar a presença de mutações desejadas e em seguida subclonado no sítio de pET16b-5MYC BamHI/XhoI.

- Para construir BnKrp1 Nº 547, os dois seguintes oligonucleotídeos foram empregados para amplificar o cDNA de BnKrp1 sem no máximo dois aminoácidos C-terminais, isto é, Ser e Glu que adicionam um sítio de 5' BamHI/NdeI e sítio de restrição XhoI na terminação 3' de BnKRP1 (5' BnKrp1 BamHI/NdeI: ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEQ ID NO:26)

e 3' BnKrp1 SE>stop XhoI: CTCGAGTCAAGCAGCTAATTTAACCCACTCGT A (SEQ ID NO:56). O fragmento de PCR foi amplificado de pTG N° 313 (Topoll BnKrp1) e subclonado no sítio de BamHI e XhoI de pET1 6b-5myc e seqüenciado. O vetor resultante BnKrp N° 547 conteve o cDNA de BnKrp1 na estrutura com os rótulos de 6XHis e myc.

Para construir BnKrp 1 N° 614, os dois seguintes oligonucleotídeos foram empregados para amplificar o cDNA de BnKrp1 sem o domínio de ligação de CDK total. 5' BnKrp1 BamHI/NdeI: ACGGATCCCATATGGTG AGAAAATGC (SEQ ID NO: 26) e o 31 BnKrp1 Δ cdk: CTCGAGTCACTTCTT GAAATTATC (SEQ ID NO: 57) que contém um sítio a XhoI. O fragmento de PCR foi amplificado de pTG N° 420 (Topoll BnKrp1) e subclonado em Topoll (Invitrogen) e seqüenciado. O fragmento de BamHI/XhoI foi em seguida subclonado em pET16b- 5myc. O vetor resultante BnKrp N° 614 conteve o cDNA de BnKrp1 sem a seqüência de codificação para a região de ligação de CDK na estrutura com os rótulos de 6XHis e myc.

Exemplo 2. Homologia de aminoácido entre p27^{KIP1} de mamífero e KRPs de planta.

A família de CIP1/KIP1 de CKIs utiliza duas regiões de contato para ligar e inibir o complexo de cinase. Com base neste modo de ligação e inibição, a alteração das capacidades de ligação destas duas regiões poderia resultar potencialmente em uma proteína negativa dominante que ainda pudesse interagir com o complexo (pelo domínio intacto), não mais inibir a atividade de cinase e interferir com o CKI tipo silvestre de inibir um complexo de ciclina/CDK ativo. Por exemplo, se a região de ligação de ciclina foi tornada não funcional, a proteína mutante ainda interagiria através da região de ligação de CDK com o complexo de cinase através do domínio intacto. Similarmente, se a região de ligação de CDK foi tornada não funcional, a proteína mutante ainda interagiria através da região de ligação de ciclina com o complexo de cinase.

A família AtKrp de CKI's compartilha homologia em toda a proteína total com a maior homologia residente na maioria dos 40 a 45 aminoácidos de terminal C (vide Wang e outros, Nature 386:451-452, 1997; Wang e

outros, Plant J. 15:501-510, 1998; Lui e outros, Plant J. 21 :379-385, 2000; De Veylder e outros, Plant Cell 13:1653-1667, 2001; Jasinski e outros, Plant Physiol 130:1871-1882, 2002; Zhou e outros, Plant Cell Rep. 20:967-975, 2002; Zhou e outros, Plant J. 35:476-489, 2003). Entretanto, somente aproximadamente os últimos 23 aminoácidos da familiar de Krp mostram homologia ao p27^{Kip1} mamífero (vide figura 1).

As experiências de ligação *in vitro* foram realizadas para ajudar a elucidar as interações de ligação entre um KRP representativo, isto é BnKrp1, e o AtcyclinaD2;1 e o AtCDKA. As interações de ligação de outro membro da família de KRP podem ser elucidadas empregando as mesmas experiências de ligação *in vitro* descritas abaixo. As experiências de ligação *in vitro* empregando versões de mutante BnKRP1 contendo substituições de aminoácido de aminoácidos altamente conservados na região de ligação de CDK revelaram que esta região somente foi necessária para a ligação ao CDK, ao mesmo tempo em que a ligação a Atcyclina ainda estava intacta. De modo mais importante um domínio de ligação de CDK intacto é requerido absolutamente para inibição do complexo de AtCyclinaD2/CDKA. Os aminoácidos se situando imediatamente a montante da região de ligação de CDK, em uma região que os presentes inventores sugerem ser a região de ligação de ciclina, são conservados entre os membros de família de KRP (vide figura 1) porém não em p27^{KIP1}. A mutação de vários resíduos conservados neste domínio de ligação de ciclina sugerido ab-roga a interação com AtcyclinaD2;1, ao mesmo tempo em que a interação com AtCDKA permanece intacta. De modo interessante, este mutante de região de ligação de ciclina putativo ainda inibe o complexo de AtcyclinaD2/CDKA cinase contudo não tão eficazmente quanto o KRPI tipo silvestre. A concentração inibidora que reduz a atividade de cinase em 50% (IC₅₀) foi 0,035 µg para o KRP1 tipo silvestre (BnKrp N° 461) ao mesmo tempo em que o IC₅₀ para o mutante de ligação de ciclina (BnKrpN° 462) foi 1,25 µg.

Observações similares foram vistas com a contraparte de p27^{KIP1} de mamífero (vide Vlach e outros, EMBO J. 16:5334-44, 1997). O IC₅₀ do mutante de ligação de ciclina p27^{KIP1} foi aumentado em comparação ao

p27^{KIP1} tipo silvestre. Em contraste entretanto, as concentrações elevadas do mutante de ligação de p27^{KIP1} CDK foram ainda capazes de inibir o complexo de cinase. Isto é explicado provavelmente pela presença da hélice 310 em p27^{KIP1} de mamífero que está ausente na planta Krps (vide exemplo 3 para uma explicação).

Estes dados indicam que duas regiões em KRPs existem que são similares à contraparte de p27^{KIP1} de mamífero responsável pela interação com o complexo de cinase ativo. De modo interessante, o mutante de domínio de ciclina ainda poderia inibir o complexo de cinase, sugerindo que a região de ligação de CDK fosse principalmente responsável pela inibição de cinase de ciclina/CDK. Similarmente a região de ligação de ciclina de p27^{KIP1} desempenhou um papel aditivo na inibição de complexos de CDK ativos. Ainda estes resultados ilustram que em contraste com p27^{KSP1}, a região de ligação de CDK de KRP1 desempenha um papel mais significativa na inibição de cinase.

Então ao focar na homologia elevada entre a família de KRP e p27^{KIP1} na região de ligação de CDK os resíduos serão alterados para finalmente criar uma molécula de BnKrp1 negativa dominante que ainda pode ligar o complexo, interferir com BnKrp1 tipo silvestre de inibir o complexo de cinase, contudo não inibir o próprio complexo.

Exemplo 3. Estrutura de proteína de p27^{KIP1} de mamífero em complexo com ciclina/CDK empregada para identificar os aminoácidos principais que contatam CDK que são conservados em KRPs de planta.

Para facilitar o desígnio das moléculas de Krp negativas dominantes que interfeririam finalmente com a função de KRP tipo silvestre a estrutura previamente publicada de p27^{KIP1} de mamífero em complexo com complexo de ciclina A-CDK2 cinase foi empregada (vide Russo e outros, Nature 382:325-331, 1996). As informações estruturais junto com a informação de alinhamento foram combinadas para identificar os aminoácidos principais que quando alterados para alanina ou outros resíduos de aminoácido resultaram em uma proteína com características negativas dominantes. Estas características dominantes são como segue: 1) Krp mutante se liga aos

complexos de ciclina/CDK, 2) proteína mutante substancialmente não inibe a formação de complexo de ciclina/CDK até mesmo a concentrações elevadas e 3) proteína mutante deveria competir substancialmente com a molécula de KRP tipo silvestre para ligar a complexos de ciclina/CDK. Os Krps mutantes *in vivo*, que cumprem estas características resultariam em atividade de ciclina/CDK cinase elevada na célula que finalmente levaria à proliferação de célula aumentada e um índice mitótico mais elevado.

A atividade de ciclina A/CDK2 cinase de mamífero pode ser completamente interrompida pela ligação de p27^{KIP1}. O mecanismo pelo qual p27^{KIP1} inibe complexo de ciclina A/CDK2 cinase foi mostrado ser um processo complexo (vide Russo e outros, supra). p27^{KIP1} utiliza dois meios para inibir o complexo de cinase ativo. O primeiro componente para a inibição envolve a hélice 310 de p27^{KIP1} que é aparentemente não conservada em quaisquer das famílias de KRP de planta de CKIs. A hélice 310 se insere na fenda catalítica da cinase para imitar o substrato de ATP. A ocupação desta região de fenda pela hélice 310 eficazmente bloqueia a ligação de ATP e atividade de cinase. Porém até mesmo na ausência da hélice 310, p27^{KIP1} ainda foi capaz de inibir o complexo de cinase (vide Polyak e outros, Cell 78:59-66, 1994).

A comparação da estrutura cristalina de p27^{KIP1} ligado a ciclina A/CDK2 e o complexo Idnase sozinho ilustrou que o lóbulo N-terminal de CDK2 sofre alterações conformacionais significantes em p27 p27^{KIP1} de ligação (vide Russo e outros, supra). Na realidade, as β -folhas específicas no lóbulo N-terminal da cinase que normalmente ajudam a coordenar o ATP no sítio ativo são perdidas na ligação de p27^{KIP1}. A ligação de p27^{KIP1} induz uma reduplicação que envolve resíduos de β -grampo, β -filamento e uma hélice 310 de p27^{KIP1} e aminoácidos de β -folha do lóbulo N-terminal de CDK2 que reduplica para formar um β -sanduíche intermolecular (vide id.). Esta conformação de alteração sozinha é capaz de significantemente inibir a atividade de ciclina A/CDK2 cinase. Os resíduos no p27^{KIP1} que formam este β -sanduíche são altamente conservados em todos os membros de família de p27^{KIP1} de mamífero e também bem conservados em todos os membros de

família de KRP. Com baseado nos resultados apresentados no Exemplo 1₅ e a falta de uma hélice 310 conservadora, a região de ligação de CDK conservada nos membros de família de KRP provavelmente se liga ao complexo de cinase ativo e inibe a atividade de cinase induzindo-se alterações conformacionais no lóbulo N-terminal da AtCDKA cinase. Porém, outra região de KRP não pode ser excluída como de fato imitando a ligação de ATP inserindo-se na fenda catalítica da mesma maneira que a hélice 310 faz em p27^{KIP1} de mamífero.

A maioria dos 23 aminoácidos carboxi-terminais da família de KRP mostra a maior identidade de aminoácido para o p27^{KIP1} de mamífero (vide figura 1). Vários resíduos conservados em BnKrp1 foram sistematicamente alterados com base na identidade de sequência com p27^{KIP1} de mamífero, desempenhando um papel na formação do β -sanduíche entre o CKI e o complexo de cinase. Cada mutante foi comparado com o BnKrp1 tipo silvestre (BnKrpN^o 461) quanto a sua capacidade de inibir o complexo de cinase. Em alguns casos o mutante que BnKrp1 também foi monitorado para se ligar a AtciclinaD2;1 ou ao AtCDKA. Os resultados para estas experiências estão resumidos abaixo na Tabela 2.

As mutações foram introduzidas como descrito em detalhes no Exemplo 4, "Polipeptídeos de CKI de KRP Mutantes".

No máximo na extremidade N-terminal da região de ligação de CDK reside o motivo Lys Tyr Asn Phe Asp Phe (KYNFDF) (SEQ ID NO:58). Este motivo é altamente conservado nos membros da família de KRP de ambas espécies de Arabidopsis e Brassica napus. Estes resíduos são para a maior parte conservada em p27^{KIP1}. Em p27^{KIP1} eles formam uma porção de uma volta de β -grampo que no final forma o β -sanduíche com de CDK2 no complexo de ciclina A-CDK2. Cada destes resíduos conservados, foi alterado para alanina e testado quanto à sua capacidade de inibir o complexo de cinase (vide Tabela 2). Muitas únicas mutações de substituição de aminoácido não afetaram a capacidade de inibir o complexo de cinase *in vitro*. Porém, BnKrp1 N^o 587 e BnKrp1 N^o 572, mostraram resultados interessantes. Em cada caso, a inibição de cinase foi atenuada comparada à proteína tipo

silvestre sugerindo que esta região de KRP1 desempenha um papel na inibição de cinase.

As cadeias laterais de ambas fenilalaninas 62 e 64 em p27^{KIP1} contatam CDK2, desempenham um papel integral na formação do β -sanduíche e são conservados em KRP1. (Vide figura 1). Uma vez que a atividade inibidora de Krp1 F151 A (BnKrp1 N° 572) foi parcialmente comprometida, ambas as fenilalaninas 151 e 153 foram alteradas para alanina. Este mutante duplo, BnKrp1 N° 512 não mais inibiu o complexo de cinase apesar de sua capacidade de ainda ligar o complexo de cinase por ciclinaD2; 1. Pode ainda haver alguma ligação residual deste mutante à porção de CDK do complexo.

A tirosina 149 de KRP1 não é conservada em p27^{KIP1}; porém, se situa na posição N-terminal do β -grampo que contata CDK2 e forma parte do β -sanduíche. A tirosina 149 é altamente conservada em membros de família de KRPs de Arabidopsis e Brassica. Quando Tirosina 149 foi alterada para alanina (BnKrp1 N° 587), a atividade inibidora foi parcialmente comprometida, sugerindo que a tirosina desempenha um papel importante na ligação e/ou inibição de CDKA. Então, a mutação desta posição (Y149A) pode ser combinada com o mutante duplo Krp1 F151A; F153 A. Este mutante triplo foi esperado reter sua ligação ao complexo de cinase ao mesmo tempo em que perdendo sua capacidade de inibir a atividade de cinase.

A região C-terminal para o motivo de KYNFDF (SEQ ID NO:58) em KRP1 também contém vários aminoácidos que são conservados em p27^{KIP1}. (Vide figura 1). Muitos destes resíduos são conservados no β -filamento de p27^{KIP1} que forma uma porção do β -sanduíche. Vários destes aminoácidos conservados foram alterados em pares para alanina (vide Tabela 2 para sumário). Em todos menos um caso, a função de inibidora não foi significativamente prejudicada. A exceção foi o Krp1 N° 545 (E164A;W165A) mutante que foi um inibidor muito mais fraco do que o KRPI tipo silvestre. O triptofano 165 estende sua cadeia lateral no β -sanduíche. As fenilalaninas 151, 153 e E164 e W165 foram todas alteradas para alanina (Krp1 N° 574). Este BnKrp1 mutante composto também não inibiu o complexo de cinase até

mesmo quando empregado em concentrações elevadas.

A truncação da região de ligação de CDK completa de KRP1 foi também incapaz de inibir o complexo de cinase. Isto não foi surpreendente uma vez que a região inteira responsável pela ligação do CDK foi deletada.

- 5 Porém acredita-se que provavelmente uma tal truncação resultará em uma proteína instável.

Exemplo 4. Polipeptídeos de KRP CKI Mutante.

- Como uma melhora sobre as técnicas anteriores empregadas para silenciar a expressão de gene no nível de RNA pós-transcricional, a
- 10 supressão dos membros da família de KRP em plantas foi realizada ao nível de proteína empregando uma estratégia dominante-negativa. O princípio básico da estratégia negativa dominante é construir um gene para produzir uma proteína mutante que impede as cópias normais da mesma proteína de realizar sua função. Neste caso, a proteína de KRP normal forma um com-
- 15 plexo de multi-subunidade com complexo de ciclina/CDK para inativar a atividade de cinase. Então, expressando uma versão de mutante de KRP1 tipo silvestre interferirá com as cópias normais de KRP1 de inibição da atividade de ciclina/CDK cinase. Além disso, determinado o grau elevado de homologia entre os 7 membros da família de KRP de Brassica, o mutante KRP1 se
- 20 comportará como um negativo dominante para outros membros da família ou possivelmente todos os membros da família. Finalmente, as regiões de ligação de CDK e ciclina de KRPs são bem-conservadas em outras espécies de planta. Então, este KRP1 negativo dominante protegerá os complexos de ciclina/CDK cinase de inibição por KRPs endógeno em outras plantas tal
- 25 como, por exemplo, milho, trigo, Canola, soja, arroz, algodão, álamo e similares.

- Previamente, os mutantes negativos dominantes foram empregados para ajudar a elucidar várias vias de transdução de sinal. Em particular, Ras negativo dominante, um GTPase é a proteína negativa dominante
- 30 mais geralmente empregada até hoje e desempenhou um papel principal na estratégia empregada para estudar outros GTPases (Feig e Cooper, Mol. Cell. Biol. 8:3235-3243, 1988). Similarmente, as versões negativas dominan-

tes de CDKs foram empregadas para identificar funções para CDKs em controle de ciclo celular (van den Heuvel e Harlow, Science 262:2050-2054, 1993).

A família de KIP/CIP de CKIs difere da família de INK de inibidores no mecanismo que eles usam para inibir o complexo de cinase. Ao mesmo tempo e que a família de INK somente se liga ao CDK, a família de CIP/KIP tem duas regiões conservadas que independentemente se ligam a ciclina e CDK. O fato que a família de CIP 1/KIP 1 de CKIs e a família de KRP de CKIs utilizam duas regiões de contato para ligar o complexo, lhes tornam um candidato ideal para a estratégia negativo dominante. Isto é porque a região de ligação de CDK pode ser alvejada para mutantes que abolem a interação com o CDK ao mesmo tempo em que mantendo a região de KRP1 que liga a ciclina intacta.

Na presente invenção, a canola, *Brassica napus* (Bn), KRPs e moléculas KRP de *Arabidopsis thaliana* (At) de agrião de orelha de camundongos, foram clonadas e sua capacidade de inibir a atividade de ciclina/CDK foi confirmada. Para este fim, um ensaio *in vitro* foi desenvolvido para testar várias capacidades de KRPs de inibir os complexos de ciclina/CDK. A ciclina de *Arabidopsis* D2;1 (AtciclinaD2;1) e *Arabidopsis* CDKA (AtCDKA) foram epitopos rotulados e clonados em um sistema de vetor de expressão de baculovírus (BD Biosciences). AtCiclinaD2;1 foi rotulado com o epitopo de FLAG (Sigma-Aldrich) na N-terminação. O epitopo de hemaglutinina (HA) foi colocado na estrutura com a extremidade 5' de AtCDKA. A produção de proteína de AtciclinaD2;1 foi obtida infectando-se células de Sf9 de *S. frugiperda* com baculovírus de AtciclinaD2;1. A produção de AtCDKA foi obtida por infecção de células de Sf9 de *S. frugiperda* com baculovírus de CDKA. Um complexo ativo de ciclina D2;1/CDKA foi realizado por co-infecção de Sf9 de *S. frugiperda* com AtciclinaD2;1 mais Baculovírus de AtCDKA. A ciclina, CDK e o complexo ativo foram purificados e analisados quanto à atividade de cinase. A atividade de cinase monitorada empregando um ensaio de cinase padrão com Histona H1 (HHI) como o substrato ou empregando-se NtRb recombinante (Nakagami e outros, Plant Cell 14:1847-1857,

2002). As células de inseto infectadas de Ciclina D2; 1 não produziram nenhum complexo ativo. Similarmente, as células infectadas de CDKA não produziram nenhuma cinase ativa. Quando células foram infectadas com ambos o Atciclina D2;1 e AtCDKA, a atividade de cinase foi facilmente detectada. Os complexos de CDK de ciclina ativos também podem ser purificados de extratos de tecido de proteína de planta ou de extratos de célula de cultura de tecido de planta empregando-se contas de agarose de p13suc1 (Wang e outros, Plant J. 15:501-510, 1998).

Os Krps foram designados para conter um rótulo de epítipo de polihistidina N-terminal (rótulo HIS) por subclonagem da estrutura de cDNA de Krp com a sequência de codificação para o rótulo HIS no vetor de pET16b (Novagen). A expressão de proteína Krp mutante e tipo silvestre foi induzida em bactérias e subsequente purificada como uma proteína de fusão de rótulo HIS empregando Ni-agarose.

Todo (Bn)Krps de *Brassica napus* tipo silvestre testado (BnKRP 1, BnKRP4, BnKRP5) foi extremamente eficaz na inibição do complexo de ciclina D2;1/CDKA. Em todos os casos a inibição também foi responsiva a dose. Vários outros AtKrps (AtKRP 1, AtKRP2) de *Arabidopsis* também foram inibidores eficazes.

A família de CIP 1/KIP1 de CKIs utiliza duas regiões de contato para ligar e inibir o complexo de cinase. Baseado neste modo de ligação e inibição, a alteração das capacidades de ligação de uma destas duas regiões poderia resultar potencialmente em uma proteína mutante com características negativas dominantes. Por exemplo, se a região de ligação de ciclina é feita não funcional, a proteína mutante ainda interagiria pela região de ligação de CDK com o complexo de cinase pelo domínio intacto. Similarmente, se a região de ligação de CDK é feita não funcional, a proteína mutante ainda interagiria pela região de ligação de ciclina com o complexo de cinase.

Os membros da família de ICK/KRP limitaram a identidade de aminoácido à família de p27^{KIP1} de mamífero. Esta identidade é limitada a maioria dos 24 a 30 aminoácidos C-terminais. Na realidade o local do domínio de ligação de ciclina/CDK de p27^{KIP1} de mamífero fica situado na N-

terminação da proteína ao mesmo tempo em que a região homóloga nos Krps de planta é encontrada na maioria da porção C-terminal da proteína. (Vide, figura 1, mostrando alinhamento de p27^{KIP1} e vários membros da família de Krp). A região de ligação de ciclina em p27^{KIP1} de mamífero não é conservada em KRPs de planta. Ainda a região imediatamente a montante da região de ligação de CDK putativa é conservada em todos os KRPs de planta. Esta região conservada embora não homóloga a p27^{KIP1} poderia ser responsável pela interação com a ciclina. As substituições de aminoácido de vários resíduos nesta região de ligação de ciclina proposta de BnKRP1 (aminoácidos 125-138) abole a ligação a ciclina porém não afeta a ligação ao CDK. Estes dados sugerem que duas regiões existam em KRPs similares a contraparte de p27^{KIP1} de mamífero que media a interação com o complexo de cinase ativo. De modo interessante, a mutação da região de ligação de ciclina não aboliu completamente a inibição do complexo de cinase, sugerindo que a região de ligação de CDK é principalmente responsável pela inibição de ciclina/CDK cinase.

Determinado o grau elevado de homologia entre as regiões de ligação de CDK de CKIs de planta e mamífero, a estrutura cristalina de p27^{KIP1} ligada ao complexo de ciclina A/CDK2 foi empregada para ajudar a identificar os resíduos de contato de p27^{KIP1} que ligam a ciclina e CDK (Russo e outros, Nature 382:325-331, 1996). Os resíduos de contato foram comparados com várias seqüências de KRP para determinar se ou não elas são conservadas na região que carrega a homologia mais elevada para p27^{KIP1}. Na maioria da extremidade N-terminal da região de ligação de CDK se situa no motivo LysTyrAsnPheAspPhe (KYNFDF) (SEQ ID NO:588). Estes resíduos são na maior parte conservados em p27. Elas formam uma β -folha que contata CDK2 no complexo de ciclina A-CDK2.

Cada um destes resíduos conservados, foi alterado para alanina e testado quanto à sua capacidade de inibir o complexo de cinase. De modo interessante, muitas destas únicas mutações de substituição de aminoácido não afetaram a capacidade de inibir o complexo de cinase *in vitro*. Entretanto, os mutantes de KRP1 F151 A e KRP1 Y149A reduziram a atividade de

CKI sem afetar a ligação ao complexo de cinase.

Uma vez que as cadeias laterais de ambas as fenilalaninas 151 e 153 contatam a atividade inibidora de CDK e KRP1 F151A foram parcialmente comprometidas, ambas as fenilalaninas 151 e 153 foram substituídas por alanina. Este mutante duplo BnKrp 1 (BnKrp1 F151A; F153A) não mais inibe o complexo de cinase apesar de sua capacidade de ligar o complexo de cinase por ciclinaD2;1. Não pode ser desconsiderado que ainda pode haver algumas ligações residuais deste mutante à porção de CDK do complexo.

A tirosina 149 em KRP1 não é conservada em p27^{KIP1}, porém no modelo estrutural de p27 mamífero um resíduo de aminoácido similar se situa na posição da β -folha que contata CDK2. Quando alterada para alanina (KRP1 Y149A) a atividade inibidora foi parcialmente comprometida, sugerindo que este resíduo de aminoácido desempenha um papel importante na inibição e/ou ligação de CDKA. Então, a mutação desta posição (Y149A) combinada com o mutante duplo KRP1 F151 A; F153A produziu uma proteína variante que não mais inibiu o complexo de cinase. É esperado que este mutante triplo (BnKrp1 Y149A; F151A; F153A) ainda retenha a ligação ao complexo de cinase ao mesmo tempo em que incapaz de inibir a atividade de cinase.

Como acima, as únicas substituições de aminoácido de Y149A e F151A ambos individualmente reduziram a capacidade do polipeptídeo de BnKrp1 mutante de inibir o complexo de cinase. O BnKRP1 Y149A; F151A duplo mutante é esperado produzir uma proteína mutante que não mais inibe o complexo de cinase.

A região C-terminal para o motivo de KYNFDF (SEQ ID NO:58) em KRP1 também contém vários aminoácidos que são conservados em p27^{KIP1}. Estes aminoácidos conservados foram alterados, em pares para alanina. Em todos menos um caso, a função inibidora não foi significativamente prejudicada. A exceção foi KRP1 E164A;W165A mutante que foi um inibidor muito mais fraco do que o KRP1 tipo silvestre. Em uma proteína derivada separada, as Fenilalaninas 151, 153 e E164 e W165 foram todas

substituídas por alanina. Este mutante múltiplo de BnKRP1 também não inibiu o complexo de cinase.

A truncação da região de ligação de CDK completa de KRP1 também foi incapaz de inibir o complexo de cinase. Isto não foi surpreendente uma vez que a região inteira responsável pela ligação do CDK foi deletada.

Os resultados da avaliação de vários mutantes de BnKrp1 quanto à atividade biológica são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade biológica de Mutantes de BnKRP1

Número da construção	Mutação de Krp	Ligação de ciclina	Ligação de CDK	Inibição da Atividade de cinase	Negativo dominante ¹
461	BnKRP1 tipo silvestre	+++	+++	+++	N/A ²
586	BnKRP1 K148A	ND ³	ND	+++	N/A
587	BnKRP1 Y149A	ND	ND	++	-
588	BnKRP1 N150A	ND	ND	+++	N/A
572	BnKRP1 F151A	+++	+/-	++	-
Tbd	BnKRP1 D152A	ND	ND	ND	N/A
573	BnKRP1 F153A	ND	ND	+++	N/A
512	BnKRP1 f151a; f153a	+++	-	- ⁴	++++
598	BnKRP1 Y149A; F151A; F153A	ND	ND	-	+++++
553	BnKRP1 K157A; P158A	ND	ND	+++	N/A
554	BnKRP1 R162A; Y163A	ND	ND	++	-
555	BnKRP1 E164A; W165A	ND	ND	- ⁴	++
574	BnKRP1 F151A; F152A; E164A; W165A	++	-	- ⁴	++
556	BnKRP1 KL-AA	ND	ND	ND	ND
547	BnKRP1 SE-pare				

¹Proteção do complexo de cinase da inibição por BnKrp1 do tipo silvestre.

²N/A significa meios não aplicáveis.

³ND significa não determinado.

⁴candidato não inibiu a atividade de cinase nem sequer quando empregado até 10 vezes a quantidade mínima de inibidor de tipo silvestre necessária para abolir a atividade de cinase.

Como anteriormente mencionado, o rompimento do domínio de ligação de ciclina resultou em uma proteína de KRP1 mutante que ainda reteve alguma atividade inibidora. Não obstante, provavelmente há outros aminoácidos dentro da região de ligação de ciclina putativa (aminoácidos 125-138) que podem ser alterados para criar uma proteína mutante que cumpre as características negativas dominantes opcionais. Além disso, ao mesmo

tempo em que a alanina foi empregada em todas as substituições nestes estudos particulares, é esperado que a substituição dos resíduos de aminoácido identificados com outro resíduo de aminoácido de não alanina seja diferente significativamente em uma ou mais propriedades físicas (outras substituições não conservadoras) também produzirá uma proteína negativa dominante. Em particular, é esperado que a substituição de um resíduo de aminoácido particular com um aminoácido de modo oposto carregado ou com um resíduo de aminoácido com uma característica de definição substancialmente diferente, tal como um resíduo hidrofílico com um resíduo hidrofóbico e vice-versa, e outro, produzirá um candidato negativo dominante até melhor.

O candidato de negativo dominante ideal não inibirá a atividade de cinase nem sequer quando empregada até 10 vezes, a quantidade mínima de inibidor tipo silvestre necessária para abolir a atividade de cinase. Vários mutantes cumpriram esta exigência (vide Tabela 2). A importância desta característica se situa no fato que quando expressos *in vivo*, os níveis da proteína mutante podem estar em níveis de excesso comparado à proteína de tipo silvestre.

As moléculas de BnKrp1 negativas dominantes identificadas neste estudo eficazmente protegem o complexo de ciclinaD2;1/CDKA de inibição de BnKrp1 tipo silvestre. A mesma molécula de KRP1 derivada negativa dominante também protege o complexo de cinase de inibição através de moléculas de KRP de outras espécies tal como milho, soja, arroz, algodão, álamo e alfafa (vide Exemplo 7).

Exemplo 5. Proteínas de BnKrp1 mutantes competitivamente bloqueiam a proteína de CKI tipo silvestre de inibir o complexo de cinase.

Os candidatos negativos dominantes que são particularmente úteis não inibirão a atividade de cinase nem sequer quando empregado até 10 vezes, a quantidade mínima de inibidor de tipo silvestre necessária para abolir a atividade de cinase. Vários mutantes cumpriram esta exigência (vide Tabela 2, figura 1, e Exemplo 2). A importância desta característica se situa no fato que quando expressos *in vivo*, os níveis da proteína mutante podem

estar em níveis de excesso comparados à proteína de tipo silvestre, e é importante que a proteína mutante substancialmente não iniba o complexo de cinase em virtualmente qualquer concentração.

Vários candidatos negativos dominantes foram testados quanto à sua capacidade de proteger o complexo de ciclinaD2;1/CDKA de BnKrp1 tipo silvestre. As experiências de competição foram realizadas como segue. Complexo de ciclinaD2;1/CDKA Cinase de ativo (7µg) foi pré-incubado com mutantes de BnKrp1 negativos dominantes candidatos (5µg ou 10µg) durante 20 minutos em tampão de IX cinase. O complexo foi então testado quanto à sua atividade de cinase na ausência ou após a adição de BnKrp1 tipo silvestre (0,5µg, 1,0 µg ou 2µg) empregando HHI como o substrato. As reações de cinase foram então resolvidas por SDS PAGE como descrito no Exemplo 1, "Ensaio de Cinase". Os resultados foram quantificados por phosphorImager (Molecular Dynamics).

BnKrp1 F151A; F153A (BnKrp1 N° 512) foi capaz de proteger o complexo de cinase de inibição pelo BnKrp1 tipo silvestre. 5µg de BnKRP1 F151 A; F153A restabeleceu até 40% da atividade de cinase na presença de 0,6 µg de KRP 1 tipo silvestre. Este efeito negativo dominante foi dependente de dose, até 60% da atividade de cinase foi restabelecida quando 10 µg de BnKRP1 F151A; F153A foi empregado.

O BnKrp1 N° 555 mutante (E164A; W165A) é um candidato de negativo dominante promissor porque também não inibiu a atividade de cinase até mesmo quando empregado em 10 µg por reação. Em experiências competitivas, este mutante protegeu o complexo de cinase ativo de inibição por KRP 1 tipo silvestre porém só restaurou atividade em 14% quando 5 µg foram empregados e em 15% quando 10 µg foram empregados. As mutações de BnKrp1 N° 512 e BnKrp1 N° 555 foram combinadas em uma proteína mutante chamada BnKrp1 N° 574 (F151A, F153A, E164A, W165A). Este mutante composto não inibiu a atividade de cinase em si próprio em quantidades de 5 µg e 10 µg. Este mutante composto foi capaz de proteger o complexo de cinase de inibição por BnKrp1 tipo silvestre porém pôde somente restaurar a atividade por até 35%. O BnKrp1 N° 598(Y149A; F151A; F153A)

mutante foi capaz de proteger o complexo de cinase de inibição pelo BnKrp1 tipo silvestre. 5 µg de BnKRP1 F151A; F153A restaurou até 55% da atividade de cinase na presença de 0,6 µg de KRP1 tipo silvestre. Este efeito negativo dominante foi dependente dose, até 80% da atividade de cinase foi restaurada quando 10 µg de BnKRP1 Y149A;F151A;F153A foram empregados.

Estes dados sugerem que a região ideal para alvejar um negativo dominante seja a região de β-grampo. Porém não só qualquer resíduo pode ser alterado. Várias únicas substituições de aminoácido falharam ao criaram um Krp negativo dominante (vide Exemplo 3) porém na realidade, a alteração demasiada dos resíduos conservados também resultou em um mutante que cumpre a maioria das exigências do negativo dominante exceto no final não se comportou como um negativo dominante. AtKrp2 é o mais intimamente relacionado com BnKrp1 e AtKRP1. O AtKrp2 mutante onde o motivo de KYNFDF (SEQ IS NO:58) foi alterado para KAAAAA (SEQ ID NO:59) teve características promissoras de uma molécula de Krp negativa dominante. Em concentrações elevadas, este BnKrp2 mutante não inibiu o complexo de cinase como esperado. De modo interessante, este mutante não protegeu a cinase de inibição por BnKrp1 tipo silvestre.

Em sumário: BnKrp1 F151A; F153A bloqueou o KRP tipo silvestre de inibir a cinase, KRP1 E164A; W165A não foi tão bem ao bloquear o KRP tipo silvestre ao mesmo tempo em que BnKrp1 (Y149A;F151A;F153A) foi o melhor candidato negativo dominante nos ensaios de competição *in vitro*. O BnKrp1 mutante duplo (Y149A;F151A) também é provável ser capaz de proteger o complexo de cinase de inibição.

Como mencionado anteriormente, o rompimento do domínio de ligação de ciclina resulta em uma proteína de KRP1 mutante que reteve alguma atividade inibidora. Não obstante provavelmente há outros aminoácidos que podem ser alterados para criar uma proteína mutante que cumpra todas as características negativas dominantes. Além disso, a alanina foi o aminoácido de escolha para todas as substituições. Em muitos dos mutantes presentes, a substituição do resíduo com um aminoácido não conservador pôde produzir um candidato negativo dominante até melhor.

Exemplo 6. BnKrp1 F151A; F153A e BnKrp1 Y149A; F151A; F153A se comportam como um negativo dominante para outros membros da família de KRP de *Brassica napus*.

Um dos objetivos principais da estratégia negativa dominante foi introduzir uma mutação em um único membro da família de KRP que se comporta como um negativo dominante não somente para sua contraparte tipo silvestre porém também para todos seus membros da família. O alinhamento da família de KRP de CKIs em *Brassica napus* e em *Arabidopsis* ilustra a identidade de sequência elevada que se situa na C-terminação extrema da proteína. Os dados foram apresentados acima demonstrando que a região conservada quase que N-terminal para o domínio de ligação de CDK é responsável pelas ciclinas de ligação. Além disso, vários grupos apresentaram dados de avaliação 2-híbridos ilustrando que várias moléculas de KRP têm especificidade de sobreposição para ligação de ciclina.

BnKRP4 difere de BnKrp1 no β -grampo. Phe 151 é conservado entre BnKrp1 e BnKRP4, porém, BnKrp1 F153 é uma prolina em BnKRP4. Isto não é necessariamente uma substituição de aminoácido conservadora e sugere que BnKRP4 pode interagir com o complexo de ciclina/CDKA diferentemente do que BnKrp1. Porém já foi mostrado que esta posição no domínio de ligação de CDK não parece desempenhar um papel significativo na inibição de ciclina/CDKA (BnKrp1 N° 573 mutante, vide Exemplo 1).

BnKRP4 foi clonado empregando os dois seguintes oligonucleotídeos para amplificar o cDNA de BnKrp4 adicionando um sítio de 5' BamHI/NdeI e sítio de restrição XhoI na extremidade 3' de BnKrp4-1 (5' BnKrp4-1 BamHI/NdeI: GGATCCCATATGGGA AAATACATAAAG (SEQ ID NO:60) e 3' BnKrp4-1 XhoI: CTCGAGCTAATCATCTACCTTCTT (SEQ ID NO: 61). O fragmento de PCR foi amplificado de pTG N° 315 (Topoll BnKrp4-1) e subclonado no sítio de BamHI e XhoI de pET16b-5myc e sequenciado. O vetor resultante BnKrp N° 605 conteve o cDNA tipo silvestre de BnKRJM na estrutura com os rótulos de 6XHis e myc. A proteína foi expressa e purificada como descrito no Exemplo 1.

BnKrp4 é um inibidor potente do complexo de AtciclinaD2;1/

CDKA cinase com um IC_{50} muito similar àquele BnKrp1 tipo silvestre. As experiências de competição foram realizadas como descrito no Exemplo 4. Neste caso, BnKrp1 N° 512 (F151A; F153A) e BnKrp1 N° 598 (Y149A; F151A; F153A) foram ambos capazes de proteger o complexo de cinase de inibição por BnKRP4 tipo silvestre. Com base nesta observação, é esperado que BnKrp1 N° 512 e BnKrp1 N° 598 se comportem como um dominante negativo para a maioria, se não todos, os membros da família de BnKRP.

Exemplo 7. BnKRP1 F151A; F153A e BnKRP1 Y149A; F151A; F153A se comportam como dominante negativo para Krps de outras espécies de planta.

O objetivo total da estratégia negativa dominante foi para introduzir uma ou mais mutações em um único membro da família de KRP que não somente se comporta como um negativo dominante para seus membros de família tipo silvestre porém também contra os membros de família de KRP através de espécies diferentes de planta. As plantas de colheita de interesse na presente invenção incluem, porém não estão limitadas, soja, canola, milho, trigo, alfafa, arroz, colheitas de vegetais tal como tomate, e ainda árvores, tal como álamo.

A sequência de nucleotídeo de AtKRP 1 (GenBank N° U94772) foi empregada para realizar uma pesquisa tBLASTn para seqüências de KRP de milho, soja, álamo, tabaco e arroz. Vários ESTs curtos mostraram homologia elevada limitada aos domínios de ligação de ciclina/CDK. Várias destas seqüências curtas foram alinhadas e ilustram a conservação desta região através de várias espécies de planta. (Vide figura 2)

No milho, uma entrada particular, acesso de Genbank N° AY986792 conteve uma estrutura de leitura aberta de 573 bp, codificando uma proteína de tamanho natural com identidade elevada para vários membros de família de Bn KRP. Esta proteína foi chamada ZmKRP4 porém não é necessariamente o homólogo de milho de BnKRP4 ou AtKRP4. Como BnKRP4₅, ZmKRP4 difere de BnKRP1 no β -grampo. Phe 151 foi conservado entre BnKRP1 e BnKRP4 e ZmKRP4. Porém, BnKRP1 F153 foi uma prolina em ambos BnKRP4 e ZmKRP4. ZmKRP4 foi amplificado de cDNA feito de

RNA total isolado de pendões de milho maduros. A sequência do oligonucleotídeo foi acumulada do Genbank acessão Nº AY986792. ZmKRP4 5'BamHI/NdeI: GGATCCCATATGGGCAAGTACATGCGC (SEQ ID NO:62) e ZmKRP4 VBamHi: GGATCCTCAGTCTAGCTTCACCCA (SEQ ID NO:63). O produto de PCR foi subclonado em TOPOII (Invitrogen) e seqüenciado. Para produto de proteína de ZmKRP4, o fragmento de BamHI de 573 bp foi clonado no sítio de BamHI de vetor de pET16b-5Myc e a orientação de inserção foi determinada por mapeamento de enzima de restrição. A proteína recombinante foi produzida como descrito no Exemplo 4.

10 Similarmente na soja, uma entrada particular, Genbank acessão Nº AY439104 conteve uma estrutura de leitura aberta de 499 bp, codificando uma proteína de tamanho natural com identidade elevada para vários membros de família de Bn KRP. Esta proteína chamada GmKRP2-2 é virtualmente idêntica a BnKRPI no β -grampo. GmKRP2-2 foi amplificado de cDNA feito de RNA total isolado de platinhas de soja jovens em desenvolvimento. O oligonucleotídeo foi designado da sequência de Genbank acessão Nº AY439104: GmKRP2-2 5'XhoI/NdeI: ctcgaggacatatggagatggctcagggtaaggca (SEQ ID NO:64) e GmKRP2-1 3'XhoI: ctcgagtcaactgaaccactcgtatcgctcc (SEQ ID NO:65). O produto de PCR foi subclonado em TOPOII (Invitrogen) e seqüenciado. Para expressão de proteína GmKRP2-2, o fragmento de XhoI de 499 bp foi clonado no sítio de XhoI de vetor de pET16b-5Myc e a orientação de inserção foi determinada por restrição de mapeamento de enzima. A proteína recombinante foi produzida como descrito no Exemplo 4.

25 Ambos ZmKRP4 e Gm Krp2-2 foram testados quanto à sua capacidade para inibir complexo de ciclinaD2; I/CDKA cinase recombinante. ZmKRP4 foi um inibidor potente do complexo de cinase com um IC_{50} muito similar àquele de BnKRP1 tipo silvestre, 0,035 μ g. Similarmente, GmKrp2-2 foi também um inibidor potente do complexo de cinase. Ambos BnKRP1 negativo dominante (BnKRP1 Nº 512 e Nº 598) foram capazes de bloquear ZmKRP4 e GmKrp2-2 de inibir o complexo de cinase. Em cada caso, a proteção foi comparável à proteção que BnKRP1 Nº 512 deu para inibição de BnKRP1. Este resultado ilustra o efeito de espécies cruzada do Krp negativo

dominante da presente invenção.

As experiências também sugerem que BnKrp Nº 512 e BnKrp Nº 598 terão um efeito similar em outros membros de família de KRP de espécies cruzadas tal como aqueles de arroz, trigo, sorgo, cana-de-açúcar, beterrabas açucareira, e outro. As moléculas de KRP destas espécies de planta, junto com outras, podem ser clonadas, expressas como proteínas recombinantes, e avaliadas em estudos similares para demonstrar que BnKrp 1 Nº 512 e BnKrp 1 Nº 598 têm um efeito similar naqueles membros de família.

Exemplo 8. Mutação paralela em outras moléculas de KRP de espécies de planta resulta em moléculas negativas dominantes.

Os resíduos alterados em BnKRP1 para produzir o efeito negativo dominante são conservados em vários membros da família de KRPs em canola, milho, soja, arroz, alfafa, álamo, tabaco, e outro. A substituição de fenilalaninas conservadas para resíduos de alanina pode ser realizada em vários KRPs destas plantas de colheita e testada quanto à sua capacidade de se comportar como moléculas negativas dominantes.

F151 e F153 são conservados em alguns porém nem todos KRPs em canola, soja, milho. A mutação destes resíduos conservados em KRPs de soja e milho resultará em uma molécula de Krp negativo dominante similar.

Exemplo 9. Plantas de canola transgênicas expressando construções de transgene designadas para conceder expressão constitutiva e específica de embrião de KRP1 (F151a;F153a).

Com base nos resultados *in vitro* presentes nos exemplos acima, a expressão da invenção em células de planta cultivada ou em plantas transgênicas é predita aumentar a atividade de CDK cinase endógena. Este aumento na atividade de CDK cinase terá uma influência positiva durante o ciclo celular. A invenção foi clonada em um vetor de expressão de planta. Um vetor de expressão de planta contém um promotor nativo ou normativo unido à invenção descrita acima. Os promotores podem variar de forte, fraco, induzível, específico de tecido, específico de órgão e específico desenvolvendo.

As mutações de BnKRP1 (F151A; F153A) equivalentes foram introduzidas em AtKRP1 empregando os seguintes oligonucleotídeos: "QC AtKRP1 cds F173A;F175A-codificação" 5' - TTCAAGAAGAAGTACAATGCC GATGCCGAGAAGGAGAAGCCATTA-S (SEQ ID NO:66) e "QC AtKRP1 cds F173A;F175A-noncod" 5'-TTATGGCTTCTCCTTCTGGGCA TCGGCATTG-TACTTCTTCTTGAA-3' (SEQ ID NO:67). AtKRP1 N° 359 foi empregado como o modelo empregando um *Kit* de Mutagênese Direcionada ao Sítio Stratagene Quikchange. AtKRP1 F173A; F175A (pTG356) foi confirmado por seqüenciamento. O promotor de LFAH12 foi inserido na extremidade 5' do AtKRP1 (F173 A; F175A) mutante em pTG 356 em duas etapas. Primeira, o promotor de LFAH12 de Sail e PstI de pCAMBIA 2381Z (pTG 254) foi subclonado em pBluescript II (Stratagene) nos sítios SalI e PstI, resultando em pTG 357. O promotor de LFAH12 foi então cortado de pTG 357 empregando PstI e BamHI e inserido em pTG 356 resultando em pTG 361. Finalmente pTG 361 foi digerido com KpnI e NotI, pLAY112 foi digerido com NotI e BglII (componente mas3' utr) e pCG 1547 foi digerido com KpnI e BamHI e uma ligação de 3 modos foi realizada. Isto resultou em um cassete de LFAH12-At ICK1 cds DN-mas 3' utr (pTG 369).

O vetor de expressão de planta contendo BnKRP1(F151 A; F153A) sob controle do promotor constitutivo 35S foi construído do seguinte modo. O fragmento de BamHI/XhoI contendo BnKRP1 (F151 A; F153A) cds foi clonado em pTG 271 (35S/TOPO Blunt) empregando os mesmos sítios. O constructo resultante (pTG529) foi cortado com KpnI e XbaI. pLAY112 foi cortado com ZlaciI e HMindIII e pCGN1547 foi cortado com KpnI e HindIII e uma ligação de 3 modos foi realizada. Isto resultou em um cassete de 35S-BnKRP1 (F151A;F153A)-mas3 utr (pTG533).

Transformação de Canola (*Brassica napus*)

A variedade de canola haplóide dupla DHI 2075 foi transformada com os constructos de expressão de transgene LFAH -12 AtKRP1 (F173A; F175A) e 35-S BnKRP1 (F151A; F153A) (também referido coletivamente neste Exemplo como "constructo de expressão de transgene de KRP1 mutante") empregando um método de transformação mediada por *Agrobacteri-*

um com base naquele de Maloney e outros. (Maloney e outros, Plant Cell Report 8:238, 1989).

As sementes esterilizadas foram germinadas em meios Vz MS (Murashige & Skoog) com 1% de sacarose em placas de Petri de 15 X 60 mm durante 5 dias com aproximadamente 40 a cerca de 60 sementes por placa. Um total de aproximadamente 1500 sementes foi germinado para cada constructo de transformação. As sementes não ficaram completamente submersas no meio de germinação. As mudas germinadas foram crescidas em um ambiente de cultura de tecido a 25°C, em um ciclo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão.

Os cotilédones foram cortados exatamente acima do meristema apical sem obter qualquer tecido de meristema. Isto foi feito agarrando-se suavemente os dois pecíolos com fórceps imediatamente acima da região de meristema apical. Cuidado foi tomado para não esmagar os pecíolos com os fórceps.

Ao empregar as pontas dos fórceps como um guia, os pecíolos foram cortados empregando um escalpelo com uma lâmina afiada Nº. 12. Os cotilédones foram liberados em uma placa de 15mm X 100mm de meio de co-cultivo. Os cotilédones corretamente cortados se separam facilmente. Se eles não o fizerem, há uma chance muito boa que o tecido meristemático tenha sido obtido e tais cotilédones não foram empregados. Cada placa manteve aproximadamente 20 cotilédones. As explantes de cotilédone foram inoculadas com *Agrobacterium* após cada placa que foi preparada evitar murchar o que teria um impacto negativo nos seguintes estágios do protocolo.

Os constructos de expressão de transgene de KRP1 mutantes foram introduzidos em eletroporação de *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* que abriga os constructos de expressão de transgene KRP1 mutante foi crescido em um meio AB com antibióticos apropriados durante dois dias em agitação a 28°C. Para inocular os explantes de cotilédone, um volume pequeno de cultura de *Agrobacterium* foi adicionado a uma placa Petri de 10 mm x 35 mm. O pecíolo de cada explante foi imerso na cultura de A-

grobacterium e a extremidade cortada colocada em meio de co-cultivo em uma placa de Petri. As placas foram seladas e colocadas em ambiente de cultura de tecido a 25°C, 16 horas de luz/8 de horas de escuro durante 3 dias.

5 Após 3 dias, as explantes foram transferidos freqüentemente em grupos para placas de Petri frescas de 25 mm x 100 mm contendo meio de indução de broto. Este médio continha um agente de seleção (20 mg/L de Canamicina) e hormônio (4,5 mg/L de BA). Somente às explantes aparentemente saudáveis foram transferidas. As explantes foram mantidas em meio
10 de indução de broto durante 14 a 21 dias. Neste momento, calos verdes e possivelmente algum desenvolvimento de broto e alguns brotos não transformados puderam ser observados. Os brotos não transformados foram facilmente reconhecidos por sua cor branca e roxa. Os brotos sensíveis a Canamicina foram removidos lhes cortando longe e todos calos aparentemente
15 saudáveis foram transferidos para as placas frescas de meio de indução de broto. As explantes foram mantidas nestas placas durante outro 14 a 21 dias.

 Após 2 a 3 semanas, os brotos que ficaram verdes escuros na cor foram transferidos para placas que contêm meio de alongamento de broto. Este meio conteve um agente de seleção (20 mg/L de Canamicina) porém não conteve qualquer hormônio. Cinco brotos foram transferidos para
20 cada placa. As placas foram seladas e retornadas para o ambiente de cultura de tecido. Os brotos transformados que pareceram vítreos foram transferidos para o meio de alongamento de broto que contém floriglucinol (150
25 mg/L). Os brotos que se tornaram verdes e saudáveis foram devolvidos para as placas de meio de alongamento de broto. As transferências repetidas de brotos vítreos para placas frescas do mesmo meio foram requeridas em alguns casos para obter brotos de aparência normal.

 Os brotos com morfologia normal foram transferidos para jarros
30 de alimentação de bebê de 4 oz. com meio de enraizamento contendo 0,5 mg/L de ácido butírico de indol. Qualquer calo em excesso foi cortado longe ao transferir os brotos para os jarros. Os brotos puderam ser mantidos inde-

finalmente nos jarros os transferindo para jarros frescos contendo 0,2mg/L de ácido butírico de indol aproximadamente a cada 6 semanas.

Uma vez que um bom sistema de raiz foi formado, os brotos de geração de T_0 foram removidos dos jarros, e as platinhas transferidas para o solo em lote. Cada plantinha T_0 independente representa uma ocorrência independente de inserção do transgene no genoma de canola e é referido como um evento. Um copo transparente foi colocado sobre a plantinha durante alguns dias, permitindo a planta aclimar ao novo ambiente. Uma vez que a planta endureceu, o copo foi removido. Os eventos transgênicos de T_0 foram então desenvolvidos para maturidade na estufa e as sementes de T_1 coletadas.

Caracterização do Evento de TQ

O número de locos de sítio de inserção de transgene foi determinado em cada evento por análise do Sul. A expressão de transgene de KRP1 mutante nos eventos de T_0 foi verificada por análise do Norte ou RT-PCR de extremidade. Os dados de expressão de transgene de KRP1 mutante foram obtidos para um único ponto de tempo no desenvolvimento de embrião, 19 dias após a polinização (DAP). A partir destes dados foi concluído que, neste ponto de tempo desenvolvendo, o promotor de LFAH 12 levou aos níveis elevados de mRNA de AtKRP1 (F173A; F175A). A expressão de transgene de 35S BnKRP1 (F151A; F153A) foi monitorada em amostras de folha que tiveram expressão de nível moderado a elevado em muitos eventos. Os dados de expressão demonstraram que ambos os promotores eram funcionais condução de expressão de transgene de KRP1 mutante em plantas de canola transgênicas.

A atividade de cinase também pode ser medida para determinar o efeito de expressão de proteína de KRP1 mutante em atividade de Ciclina-CDK cinase endógena. As quantidades equivalentes de extratos de proteína de células ou tecido de planta transgênica ou não transgênica são enriquecidas para CDK empregando resina p13Suc1 (Upstate, Chicago, IL) e os ensaios de Histona cinase são realizados como descrito no Exemplo 4 ou por Wang e outros., Plant J. 15:501-510, 1998. As reações de cinase são resol-

vidas por SDS-PAGE e fosforilação de HHI quantificada por PhosphorImager.

As plantas de T₀ foram geradas de modo bem sucedido para ambos constructos de expressão de transgene de KRP1 mutante. Os constructos testados incluíram (a) LFAH12/AtKRP1(F173A; F175A); (b) 35S Bn-KRP1(F151A; F153A).

Exemplo 10. Expressão *in vivo* acelera o crescimento/germinação precoce.

A expressão das proteínas mutantes da presente invenção em plantas transgênicas exercerá seus efeitos elevando-se a atividade de ciclina-CDK cinase. Isto terá uma influência motriz positiva no ciclo celular que finalmente resulta em tamanho de órgão aumentado. Em plantas, a redução dos níveis de expressão de KRP1 suprimindo-se a expressão de um gene de Krp endógeno no embrião empregando uma abordagem repetida invertida resulta em tamanho de semente e produção de colheita aumentados. Além de um efeito na produção, o tamanho de semente aumentado pode resultar em vigor aumentado ou na semente. As sementes maiores contêm uma maior quantidade de proteína armazenada e reserva de amido para serem utilizadas durante a germinação e crescimento da muda. Isto pode resultar em germinação precoce e crescimento precoce mais rápido. A germinação precoce e crescimento precoce rápido são características agronomicamente valiosas uma vez que eles levam ao estabelecimento mais rápido da colheita. Isto aumenta as chances de uma colheita bem-sucedida reduzindo-se a janela de vulnerabilidade às condições ambientais severas e outro que possam danificar ou arruinar uma colheita antes do estabelecimento.

O crescimento aumentado e passo desenvolvendo foram observados nas mudas germinadas em estufa de plantas de canola transgênicas transformadas com a construção de expressão negativa dominante de AtKRP1 (F173A; F175A) (pTG369) descrita no Exemplo 9. Vinte e quatro sementes de cada dos quinze eventos de transformação independentes do constructo de expressão negativa dominante de AtKRP1 (F173A;F175A) foram plantadas em péletes de turfa Jiffy em bandejas e germinadas em

uma estufa. Vinte quatro sementes de cada dos quinze eventos independentes transformados com o gene de KRP1 tipo silvestre, também sob controle do promotor de LFAH12, foram plantadas em paralelo. Adicionalmente, a variedade de canola DH12075 parental não transformada e um total de 135 eventos transgênicos transformados com quaisquer dos nove constructos de transgene não relacionados foram plantados ao mesmo tempo.

Após três semanas de crescimento, todas as mudas foram transplantadas para um campo para ser desenvolvida para semear. Cada grupo de vinte quatro mudas para cada evento foi plantado como um lote individual. Na transplantação, foram facilmente observadas diferenças no crescimento entre as mudas entre os lotes. Pela população de muda total para todas os constructos de transgene, o tamanho variou de 2,54 cm (1 polegada) de altura para cerca de 10,16 a 12,7 cm (4 a 5 polegadas) de altura. Progresso desenvolvendo também variou, variando de algumas mudas que têm somente cotilédones presentes para mudas com várias folhas verdadeiras. Os lotes de variedade parentais não transformados se incluíram no meio desta faixa. As diferenças nos lotes transgênicos foram construções específicas. A maioria dos lotes no campo que continham mudas na extremidade de topo do tamanho e faixa de desenvolvimento era lotes contendo plantas transformadas com ao constructo de expressão negativo dominante de AtKRP1 (F173A; F175A) (pTG369). Outros constructos não mostram esta característica com a maioria dos lotes mostrando crescimento e desenvolvimento comparáveis com ou menores do que a variedade parental transformada. Estes resultados indicam que a expressão de um transgene de Krp mutante negativo dominante confere uma taxa de crescimento precoce aumentada e passo desenvolvendo acelerado.

Outras características a serem monitoradas incluem, por exemplo, pré-emersão/duração da germinação, tempo de aparecimento de cotilédone, tamanho do cotilédone, tempo de primeira folha real exposta, e segunda exposição de folha verdadeira. O diâmetro de roseta também pode ser monitorado em plantas transgênicas e não transgênicas. Outras características também podem ser monitoradas entre as plantas transgênicas e não

transgênicas e incluem, por exemplo, tempo de emergência do broto e tamanho da projeção do broto, tamanho final de ramo principal, tempo da primeira flor para emergir, tempo do aparecimento da primeira vagem, e similares.

Exemplo 11. Expressão *in vivo* determina melhor enraizamento.

- 5 As sementes de canola são muito pequenas, requerem umidade relativamente elevada para germinação e devem ser plantadas perto da superfície do solo para maximizar o vigor da muda. As sementes pequenas e
- 10 plantação rasa tornam a colheita vulnerável às tensões abióticas tal como solo seco, e inundação. A expressão ubíqua ou expressão precoce no desenvolvimento da raiz dos polipeptídeos mutantes da presente invenção sob controle de vários promotores determinaria o desenvolvimento e crescimento
- 15 de raiz acelerado. A divisão de célula aumentada durante o desenvolvimento de raiz beneficiará o vigor da muda estabelecendo-se uma base de raiz firme mais cedo e possivelmente uma base de raiz maior do que o controle de planta não transgênica. O tamanho das plantas transgênicas do sistema de raiz pode ser comparado com as plantas não transgênicas.

Exemplo 12. Avaliação do Efeito de Expressão de Transgene de AtKrol (F173A:F175A) Durante o Desenvolvimento de Embrião na Produção de Canola em Experiências de Campo Replicadas.

- 20 Neste exemplo, as plantas de canola transgênicas compreendendo o transgene de KRP1(F173A;F175A) de Arabidopsis sob o controle do promotor específico de embrião LFAH 12 (pTG369) foram testadas em experiências de campo.

25 Avanço de Eventos de AtKRP1(F173A;F175A) Transgênico para Experiências de Campo.

- Para os eventos T₀ foram selecionadas para avanço, as experiências de campo com base em uma combinação de número de loco de inserção de transgene e expressão de transgene. Os eventos com expressão transgene verificada e um único loco de inserção de transgene foram designados
- 30 prioridade superior a ser levada adiante para o teste de campo. Em alguns exemplos, os eventos com locos de inserção múltiplos foram selecionados se a presença de genes múltiplos determinou um nível de expressão

de transgene total elevado devido a dosagem de gene.

As sementes T_1 de eventos selecionados foram crescidas como populações de T_1 segregantes em plotagens de campo. Cada evento foi plantado como um lote de duas fileiras, vinte quatro plantas. Para eventos com um único loco de inserção de transgene, a segregação de um transgene dentre as vinte quatro plantas de T_1 produziria uma distribuição de aproximadamente seis plantas nulas sem o transgene, doze plantas heterozigotas, e seis plantas homozigotas. Cada planta de T_1 foi ensacada individualmente antes de florescer para prevenir cruzamento externo. As sementes T_2 de cada das vinte quatro plantas de T_1 foram colhidas separadamente.

Os estoques de sementes de T_2 foram empregado para identificar qual das vinte quatro plantas T_1 parentes era nula, heterozigota, ou homozigota. Aproximadamente trinta sementes de T_2 de cada planta de T_1 foram germinadas em papel de filtro em placas de Petri com uma solução que contém o antibiótico G418, um análogo de canamicina. Considerando que as plantas foram co-transformadas com o gene de resistência *nptII* como um marcador selecionável, somente aquelas sementes que carregam o transgene do germinariam e continuam crescendo. Se todas as sementes em uma placa provassem ser sensíveis a G418, então o parente de T_1 seria identificado como uma linhagem nula. Se todas as sementes em uma placa fossem resistentes a G418, então o parente de T_1 seria identificado como uma linhagem homozigota. Se aproximadamente um quarto das sementes em uma placa fosse sensível e o restante fosse resistente, o parente de T_1 seria identificado como uma linhagem heterozigota. As sementes de T_2 de parentes de T_1 homozigotos do mesmo evento de transformação foram aumentadas para gerar estoques de semente homozigotas para teste de experiência de campo. As sementes de T_2 de parentes de T_1 nulos do mesmo evento de transformação foram aumentadas para gerar estoques de semente de irmãos nulas para teste de experiência de campo.

30 **Desígnio da Experiência de Campo**

O efeito do transgene de AtKRP1(F173A;F175A) em características de produção nas linhagens de canola transgênica foi avaliado compa-

rando-se cada linhagem transgênica diretamente com seu irmão nulo no campo em experiências replicadas de grande escala. Desde que o irmão nulo surja da segregação de transgene na geração de T₁, os irmãos nulos e homozigotos são geneticamente quase idênticos. A única diferença significativa é a presença ou ausência do transgene de AtKRP1(F173A;F175A). Esta quase identidade genética torna o irmão nulo o controle ideal para avaliação do efeito do transgene de AtKRP1(F173A;F175A). Como o objetivo principal da experiência foi a comparação da linhagem transgênica de um evento com seu segregante nulo, um desígnio de lote dividido foi escolhido. Este desígnio determina um nível elevado de avaliação com a interação entre as subentradas transgênicas e não transgênicas e as diferenças entre os sub-lotes transgênicos entre os eventos (a interação de sub-lote e lote principal) e um nível mais baixo de avaliação com as diferenças entre eventos totais ou o lote principal.

As experiências de campo foram conduzidas em locais múltiplos pelas províncias de pradaria para avaliar fenótipos de produção sob a faixa de condições ambientais nas quais a canola é tipicamente desenvolvida. Em todos os locais, cada evento transgênico foi fisicamente emparelhado com seu irmão nulo em lotes adjacentes. Cada par de lote irmãos nulos e homozigoto foi replicado quatro vezes em cada local da experiência. Os locais dos quatro pares de lote replicado em cada em cada experiência foram distribuídos aleatoriamente em cada local de experiência. Os lotes foram 1,6m por 6m e plantados a uma densidade de aproximadamente 142 sementes por metro quadrado. As plantas foram desenvolvidas para maturidade empregando práticas agronômicas padrão típicas para produção comercial de canola.

Exemplo 13. Produção Aumentada de Canola Transgênica Expressando AtKrp1 (F 173 A:F 175 A) Durante Desenvolvimento de Embrião Empregando os Promotores Específicos de Embrião.

Todos os lotes em cada local de experiência do campo de produção foram individualmente colhidos com uma máquina de ceifar. Todos os dados da produção de semente foram coletados como peso de semente to-

tal ajustado ao conteúdo de umidade de cada lote. Para todo evento transgênico em cada experiência, a média da produção total dos quatro lotes replicados de cada linhagem de homozigoto foi comparada à média da produção total dos quatro lotes replicados da linhagem de irmão nulo associada.

- 5 Esta comparação foi empregada para avaliar o efeito do transgene de AtKRP1 (F173A;F175A) na produção de semente total. Os resultados de cada um dos locais de experiência múltiplos foram combinados para determinar uma análise de experiência cruzada do efeito do transgene de AtKRP1 (F173A;F175A) na produção de semente total. A análise estatística de vari-
- 10 ância em cada local de experiência permitiu o desígnio de um limiar para significância ($P = 0,05$) para diferenças na produção de semente total entre linhagens transgênicas homozigotas e seus irmãos nulos.

As linhagens de canola de AtKRP1(F173A;F175A) transgênicas que mostraram um aumento estatisticamente significativo na produção de

15 semente total são resumidas na Tabela 3. Estes resultados demonstram que a super-expressão de AtKRP1(F173A;F175A) empregando um promotor específico de embrião (LFAH 12) resulta em produção de semente aumentada.

Tabela 3. Alteração na produção de semente de total em plantas de AtKRP1(F173A;F175A) homozigoto com relação a seus irmãos nulos. Os valores de AU são estatisticamente significantes ($P = 0,05$)

20

Evento	Promotor	Transgene	% de aumento de produção
TG39-2	LFAH12	AtKrp1(F173A; F175A)	13,0
TG39-26	LFAH12	AtKrp1(F173A; F175A)	18,6
TG39-32	LFAH12	AtKrp1(F173A; F175A)	12,0

É entendido que os exemplos e modalidades descritos aqui sejam para propósitos ilustrativos somente e que várias modificações ou alterações levando em consideração esta, sejam sugeridas pelas pessoas versadas na técnica e devam ser incluídas dentro do espírito e competência

25 deste pedido de patente e escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes, e pedidos de patente citados aqui estão desse modo incorporadas por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> TARGETED GROWTH, INC.

<120> PROTEÇÃO DE PROTEÍNA KRP MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE DE INIBIÇÃO DE COMPLEXO CICLINA-CDK ATIVO POR KRP DO TIPO SILVESTRE

<130> 25941-1-1PC

<140> PCT/US06/29349

<141> 2006-07-28

<150> US 60/703,999

<151> 2005-07-29

<160> 101

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu
1 5

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Val Arg Lys Tyr Arg Lys Ala Lys Gly Ile Val Glu Ala Gly Val
1 5 10 15

Ser Ser Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Val Arg
20 25 30

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Val Ser Val Val Gly Asp Asn Gly Val Ser
35 40 45

Ser Ser Cys Ser Gly Ser Asn Glu Tyr Lys Lys Lys Glu Leu Ile His
50 55 60

Leu Glu Glu Glu Asp Lys Asp Gly Asp Thr Glu Thr Ser Thr Tyr Arg
65 70 75 80

Arg Gly Thr Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Glu Glu Lys
85 90 95

Glu Glu Leu Ser Lys Ser Met Glu Asn Tyr Ser Ser Glu Phe Glu Ser
100 105 110

Ala Val Lys Glu Ser Leu Asp Cys Cys Ser Gly Arg Lys Thr Met
115 120 125

Glu Glu Thr Val Thr Ala Glu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Leu Met Thr
130 135 140

Glu Met Pro Thr Glu Ser Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu
145 150 155 160

Lys Gln Leu Lys Glu Lys Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu
165 170 175

Lys Glu Lys Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu Glu
180 185 190

<210> 3
<211> 209
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Ala Ala Val Arg Arg Arg Glu Arg Asp Val Val Glu Glu Asn Gly
1 5 10 15

Val Thr Thr Thr Thr Val Lys Arg Arg Lys Met Glu Glu Glu Val Asp
20 25 30

Leu Val Glu Ser Arg Ile Ile Leu Ser Pro Cys Val Gln Ala Thr Asn
35 40 45

Arg Gly Gly Ile Val Ala Arg Asn Ser Ala Gly Ala Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Val Val Ile Val Arg Arg Arg Asp Ser Pro Pro Val Glu Glu Gln Cys
65 70 75 80

Gln Ile Glu Glu Glu Asp Ser Ser Val Ser Cys Cys Ser Thr Ser Glu
85 90 95

Glu Lys Ser Lys Arg Arg Ile Glu Phe Val Asp Leu Glu Glu Asn Asn
100 105 110

Gly Asp Asp Arg Glu Thr Glu Thr Ser Trp Ile Tyr Asp Asp Leu Asn
115 120 125

Lys Ser Glu Glu Ser Met Asn Met Asp Ser Ser Ser Val Ala Val Glu
130 135 140

Asp Val Glu Ser Arg Arg Arg Leu Arg Lys Ser Leu His Glu Thr Val
145 150 155 160

Lys Glu Ala Glu Leu Glu Asp Phe Phe Gln Val Ala Glu Lys Asp Leu
 165 170 175

Arg Asn Lys Leu Leu Glu Cys Ser Met Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu
 180 185 190

Lys Asp Glu Pro Leu Gly Gly Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu Asn
 195 200 205

Pro

<210> 4
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Gly Lys Tyr Met Lys Lys Ser Lys Ile Thr Gly Asp Ile Ser Val
 1 5 10 15

Met Glu Val Ser Lys Ala Thr Ala Pro Ser Pro Gly Val Arg Thr Arg
 20 25 30

Ala Ala Lys Thr Leu Ala Leu Lys Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ala Asp
 35 40 45

Ser Ala Leu Pro Asn Asp Ser Ser Cys Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg
 50 55 60

Arg Leu Glu Lys Pro Ser Ser Leu Ile Glu Pro Lys Gln Pro Pro Arg
 65 70 75 80

Val His Arg Ser Gly Ile Lys Glu Ser Gly Ser Arg Ser Arg Val Asp
 85 90 95

Ser Val Asn Ser Val Pro Val Ala Gln Ser Ser Asn Glu Asp Glu Cys
 100 105 110

Phe Asp Asn Phe Val Ser Val Gln Val Ser Cys Gly Glu Asn Ser Leu
 115 120 125

Gly Phe Glu Ser Arg His Ser Thr Arg Glu Ser Thr Pro Cys Asn Phe
 130 135 140

Val Glu Asp Met Glu Ile Met Val Thr Pro Gly Ser Ser Thr Arg Ser
 145 150 155 160

Met Cys Arg Ala Thr Lys Glu Tyr Thr Arg Glu Gln Asp Asn Val Ile
 165 170 175

Pro Thr Thr Ser Glu Met Glu Glu Phe Phe Ala Tyr Ala Glu Gln Gln
 180 185 190

Gln Gln Arg Leu Phe Met Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Asn Asp
 195 200 205

Ile Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Glu Trp Val Gln Val Lys Pro
 210 215 220

<210> 5
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Gly Lys Tyr Ile Arg Lys Ser Lys Ile Asp Gly Ala Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser Ser Ile Ala
 20 25 30

Leu Met Asp Val Val Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly Val Leu
 35 40 45

Thr Arg Ala Lys Ser Leu Ala Leu Gln Gln Gln Gln Gln Arg Cys Leu
 50 55 60

Leu Gln Lys Pro Ser Ser Pro Ser Ser Leu Pro Pro Thr Ser Ala Ser
 65 70 75 80

Pro Asn Pro Pro Ser Lys Gln Lys Met Lys Lys Lys Gln Gln Gln Met
 85 90 95

Asn Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg Arg Leu Gln Lys
 100 105 110

Lys Pro Pro Ile Val Val Ile Arg Ser Thr Lys Arg Arg Lys Gln Gln
 115 120 125

Arg Arg Asn Glu Thr Cys Gly Arg Asn Pro Asn Pro Arg Ser Asn Leu
 130 135 140

Asp Ser Ile Arg Gly Asp Gly Ser Arg Ser Asp Ser Val Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Val Val Phe Gly Lys Asp Lys Asp Leu Ile Ser Glu Ile Asn Lys Asp
 165 170 175

Pro Thr Phe Gly Gln Asn Phe Phe Asp Leu Glu Glu Glu His Thr Gln
 180 185 190

Ser Phe Asn Arg Thr Thr Arg Glu Ser Thr Pro Cys Ser Leu Ile Arg
195 200 205

Arg Pro Glu Ile Met Thr Thr Pro Gly Ser Ser Thr Lys Leu Asn Ile
210 215 220

Cys Val Ser Glu Ser Asn Gln Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Ser His
225 230 235 240

Arg Arg Arg Pro Thr Thr Pro Glu Met Asp Glu Phe Phe Ser Gly Ala
245 250 255

Glu Glu Glu Gln Gln Lys Gln Phe Ile Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Pro
260 265 270

Val Asn Glu Gln Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Thr Lys Val Asp
275 280 285

Asp

<210> 6
<211> 189
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Gly Lys Tyr Ile Lys Lys Ser Lys Val Ala Gly Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Lys Asp Lys Ser His Pro Pro Ala Leu Gly Phe Arg Thr Arg Ala Ala
20 25 30

Ala Ala Lys Asn Leu Ala Leu His Arg Leu Arg Ser His Ser Asp Glu
35 40 45

Ala Asp Ser Phe Asn Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg Arg Leu Val Lys
50 55 60

Leu Pro Leu Leu Thr Asn Thr Arg Lys Gln Gln Lys Gln Gln Leu Ile
65 70 75 80

Pro Ser Val Asn Gln Cys Gln Thr Lys Asn Pro Arg Ala Ser Ser Gly
85 90 95

Pro Ala Lys Lys Leu Glu Pro Asp Thr Thr Thr Glu Glu Ala Cys Gly
100 105 110

Asp Asn Glu Arg Ile Ser Arg Ser Asp Cys Asn Phe Gly Asp Lys Gly
115 120 125

Phe Asp Leu Glu Ser Glu Asn Arg Ser Met Ile Ser Asp Ser Lys Ser
130 135 140

Ile Gln Ser Glu Ile Glu Asp Phe Phe Ala Ser Ala Glu Gln Gln Gln
145 150 155 160

Gln Arg Phe Phe Ile Gln Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Ser Asp Asn
165 170 175

Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Val Met Pro
180 185

<210> 7
<211> 196
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

Met Ser Glu Arg Lys Arg Glu Leu Ala Glu Glu Ala Ser Ser Thr Ser
1 5 10 15

Phe Ser Pro Leu Lys Lys Thr Lys Leu Asn Asp Ser Ser Asp Ser Ser
20 25 30

Pro Asp Ser His Asp Val Ile Val Phe Ala Val Ser Ser Ser Ser Val
35 40 45

Ala Ser Ser Ala Ala Leu Ala Ser Asp Glu Cys Ser Val Thr Ile Gly
50 55 60

Gly Glu Glu Ser Asp Gln Ser Ser Ser Ile Ser Ser Gly Cys Phe Thr
65 70 75 80

Ser Glu Ser Lys Glu Ile Ala Lys Asn Ser Ser Ser Phe Gly Val Asp
85 90 95

Leu Glu Asp His Gln Ile Glu Thr Glu Thr Glu Thr Ser Thr Phe Ile
100 105 110

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

Glu Thr Thr Thr Glu Met Glu Ser Ser Ser Ala Thr Lys Arg Lys Gln
130 135 140

Pro Gly Val Arg Lys Thr Pro Thr Ala Ala Glu Ile Glu Asp Leu Phe
145 150 155 160

Ser Glu Leu Glu Ser Pro Asp Asp Lys Lys Lys Gln Phe Ile Glu Lys
165 170 175

Tyr Asn Phe Asp Ile Val Asn Asp Glu Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Lys
 180 185 190

Trp Asp Arg Leu
 195

<210> 8
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ser Glu Thr Lys Pro Lys Arg Asp Ser Glu Tyr Glu Gly Ser Asn
 1 5 10 15

Ile Lys Arg Met Arg Leu Asp Asp Asp Asp Val Leu Arg Ser Pro
 20 25 30

Thr Arg Thr Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ala Tyr Ser Val
 35 40 45

Ser Asp Ser Gly Gly Phe Cys Ser Val Ala Leu Ser Glu Glu Glu Asp
 50 55 60

Asp His Leu Ser Ser Ser Ile Ser Ser Gly Cys Ser Ser Ser Glu Thr
 65 70 75 80

Asn Glu Ile Ala Thr Arg Leu Pro Phe Ser Asp Leu Glu Ala His Glu
 85 90 95

Ile Ser Glu Thr Glu Ile Ser Thr Leu Leu Thr Asn Asn Phe Arg Lys
 100 105 110

Gln Gly Ile Ser Ser Ser Glu Asn Leu Gly Glu Thr Ala Glu Met Asp
 115 120 125

Ser Ala Thr Thr Glu Met Arg Asp Gln Arg Lys Thr Glu Lys Lys Lys
 130 135 140

Lys Met Glu Lys Ser Pro Thr Gln Ala Glu Leu Asp Asp Phe Phe Ser
 145 150 155 160

Ala Ala Glu Arg Tyr Glu Gln Lys Arg Phe Thr Glu Lys Tyr Asn Tyr
 165 170 175

Asp Ile Val Asn Asp Thr Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Gln Trp Val Ser
 180 185 190

Leu Lys Pro
 195

<210> 9
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 9

Val Pro Pro Ala Gln Glu Ile Gln Glu Phe Phe Ala Ala Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Ala His Ala Lys Arg Phe Ala Ser Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Val Arg
 20 25 30

Gly Val Pro Leu Asp Ala Gly Arg Phe Glu Trp Thr Pro Gly Val Ser
 35 40 45

Ile

<210> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Gossypium hirsutum

<220>
 <221> característica - misc
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<220>
 <221> característica - misc
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<220>
 <221> característica - misc
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<220>
 <221> característica - misc
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<400> 10

Ile Pro Ser Xaa Ala Glu Ile Asp Glu Phe Phe Ser Val Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Tyr Glu Gln Xaa Arg Phe Ala Glu Lys Tyr Xaa Tyr Asp Ile Val Xaa
 20 25 30

Asp Val Pro Leu Asp Gly Arg Tyr
 35 40

<210> 11
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> soja

<400> 11

Val Pro Thr Glu Ser Glu Leu Glu Asp Phe Phe Ala Ala Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Gln Lys Arg Phe Thr Asp Lys Tyr Asn Tyr Asp Phe Val Lys
 20 25 30

Asp Met Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Gln Leu
 35 40 45

<210> 12

<211> 45

<212> PRT

<213> Populus tremula

<400> 12

Ile Pro Thr Thr Cys Glu Met Asp Glu Phe Phe Ala Gly Val Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Gln Gln Arg Leu Phe Ile Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Asn
 20 25 30

Asp Leu Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Glu Trp Val Arg Val
 35 40 45

<210> 13

<211> 47

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 13

Met Pro Ser Glu Lys Glu Ile Glu Glu Phe Phe Ala Ala Arg Gln Lys
 1 5 10 15

Ala Ile Leu Lys Arg Phe Arg Lys Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu Lys
 20 25 30

Glu Glu Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Arg Ile Gly Ser
 35 40 45

<210> 14

<211> 47

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 14

Ile Pro Cys Ser Ala Glu Met Asn Glu Phe Phe Ser Ala Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Pro Gln Gln Gln Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn
 20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu Asp Glx
 35 40 45

<210> 15
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 15

Val Pro Ser Ser Leu Glu Met Asp Glu Phe Phe Ala Ala Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Gln His Gln Thr Phe Arg Glu Lys Tyr Asn Phe Cys Pro Ala Ser
 20 25 30

Glu Arg Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Thr Val Leu Asp Cys
 35 40 45

<210> 16
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 16

Ile Pro Ala Ser Ala Glu Leu Glu Ala Phe Phe Ala Ala Glu Glu Gln
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Gln Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn
 20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys Leu
 35 40 45

<210> 17
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum

<400> 17

Ser Glu Ala Glu Leu Asp Glu Phe Phe Ala Ala Ala Glu Lys Asp Leu
 1 5 10 15

His Lys His Phe Ala Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Ala Lys Glu Glu
 20 25 30

Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Arg
 35 40

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Epitopo FLAG

<400> 18

Met Asp Tyr Lys Ala Phe Asp Asn Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> epítopo hemeglutina (HA)

<400> 19

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 20

atggtgagaa aatataagaaa agct

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 21

tcactctaac tttacccatt cgta

24

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador RACE

<400> 22

ctctgataat ttaaccact cgtagcggtcc ttctaattggc ttctc

45

<210> 23

<211> 513

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 23

atggtgagaa aatgcagaaa aactaaaggg acggtgggag ctctgtctac gtatatgcag 60

cttcgcagcc ggagaatcgt ttacagatcg gaaaaagcta gctcgtcgtc gtcgtcttgt 120

tgcgcgagta acaacaatgg agttatagat cttgaggagg aaagagatgg tgagactgaa 180

acgtcgtcgt gtcgacggag tagtaagagg aagctatttg aaaaccttag agaaaaagaa 240

tctatggaga attcacagca aatcgtagct ggttttgatt ccgccgtgaa agaatcatcg 300
 gattgttggtt gcagccggag aacatctttg tcaacgacgg aggagaaggg gaaatcagcg 360
 acggagcaac caccaacggc agtggagatt gaagattttt tcgtggaagc tgagaaacag 420
 ctccatgata atttcaagaa gaagtataac ttgatttcg aaaaggagaa gccattagaa 480
 ggacgctacg agtgggttaa attatcagag taa 513

<210> 24
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 24
 acggatccca tatggtgaga aaatatag 28

<210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 25
 atcgctcgag tcactctaac ttac 25

<210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 26
 acggatccca tatggtgaga aaatgc 26

<210> 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 27
 atcgctcgag tcactctgat aatttaac 28

<210> 28
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 28
ggagcaacca ccaacggcag tggctgctgc tgcttttttc gtg 43

<210> 29
<211> 43
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 29
cacgaaaaaa gcagcagcag ccaactgccgt tgggtggtgc tcc 43

<210> 30
<211> 50
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 30
ccttctaagt gcttctcctt ttcagcatca gcgttatact tcttcttgaa 50

<210> 31
<211> 50
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 31
ttcaagaaga agtataacgc tgatgctgaa aaggagaagc cattagaagg 50

<210> 32
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 32
ttcaagaaga agtacaatgc cgatgccgag aaggagaagc catta 45

<210> 33
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> mutagênese no sítio direcionado

<400> 33
ttatggcttc tccttctggg catcggcatt gtacttcttc ttgaa 45

<210> 34
<211> 33
<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 34

gataatttca agaaggcgta taactttgat ttc

33

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 35

gaaatcaaag ttatagcct tcttgaaatt atc

33

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 36

aatttcaaga agaaggctaa ctttgatttc gaa

33

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 37

ttcgaaatca aagttagcct tcttcttgaa att

33

<210> 38

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 38

ttcaagaaga agtatgcctt tgatttcgaa aag

33

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 39

cttttcgaaa tcaaaggcat acttcttctt gaa

33

<210> 40
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 40
 agaagaagta taacgctgat ttcggaaagg a

31

<210> 41
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 41
 tccttttcga aatcagcgtt atacttcttc t

31

<210> 42
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 42
 agtataactt tgatgccgaa aaggagaagc c

31

<210> 43
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 43
 ggcttctcct tttcgcatc aaagttatac t

31

<210> 44
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 44
 gatttcgaaa aggaggcggc attagaagga cgct

34

<210> 45
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 45
agcgtccttc taatgccgcc tccttttcga aatc 34

<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 46
gccattagaa ggagccgcc agtgggttaa att 33

<210> 47
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 47
aatttaaccc actcggcggc tccttctaataat ggc 33

<210> 48
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 48
agaaggacgc tacgcggcgg ttaaattatc aga 33

<210> 49
<211> 33
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 49
tctgataatt taaccgccgc gtagcgtcct tct 33

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 50
cgctacgagt gggttgcagc atcagagtga gagc 34

<210> 51
<211> 34
<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 51

gctctcactc tgatgctgca acccactcgt agcg

34

<210> 52

<211> 50

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 52

ccttctaagt gcttctcctt ttcagcatca gcgttatact tcttcttgaa

50

<210> 53

<211> 50

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 53

ttcaagaaga agtataacgc tgatgctgaa aaggagaagc cattagaagg

50

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 54

aatttcaaga agaaggctaa cgctgatgct gaa

33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> anti-sentido da mutagênese no sítio direcionado

<400> 55

ttcagcatca gcgttagcct tcttcttgaa att

33

<210> 56

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 56

ctcgagtcaa gcagctaatt taaccactc gta

33

<210> 57
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 57
 ctcgagtcac ttcttgaaat tatk

24

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 58

Lys Tyr Asn Phe Asp Phe
 1 5

<210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> AtKrp2 mutante

<400> 59

Lys Ala Ala Ala Ala Ala
 1 5

<210> 60
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 60
 ggatcccata tgggaaaata cataaag

27

<210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PCR

<400> 61
 ctcgagctaa tcattctacct tctt

24

<210> 62
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 62

ggatcccata tgggcaagta catgcgc

27

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 63

ggatcctcag tctagcttca ccca

24

<210> 64

<211> 35

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 64

ctcgaggaca tatggagatg gctcaggtta aggca

35

<210> 65

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PCR

<400> 65

ctcgagtcaa ctgaaccac tcgtatcgtc c

31

<210> 66

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> mutagênese no sítio direcionado

<400> 66

ttcaagaaga agtacaatg c gatgccgag aaggagaagc catta

45

<210> 67

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> mutagênese no sítio direcionado

<400> 67

ttatggcttc tccttctggg catcggcatt gtacttcttc ttgaa

45

<210> 68

<211> 168
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 68

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
 35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
 50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
 65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
 100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
 165

<210> 69
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 69

Met Gly Lys Tyr Ile Lys Lys Ser Lys Ile Thr Gly Asp Ile Asp Ser
 1 5 10 15

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

Ala Lys Thr Leu Ala Leu Lys Arg Leu Asn Ser Ser Ser Ala Pro Asp
 35 40 45

Ser Ser Cys Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg Arg Leu Glu Lys Pro Pro
50 55 60

Ser Leu Ala Glu Pro Arg Gln Val Lys Pro Gly Ile Lys Glu Ser Gly
65 70 75 80

Ser Lys Ile Asp Ser Val Asn Ser Ser Val Ala Gly Ser Gly Asp Glu
85 90 95

Cys Phe Cys Arg Glu Asn Ser Pro Glu Phe Gln Thr Arg Gln Ser Thr
100 105 110

Arg Glu Ser Thr Pro Cys Asn Phe Val Glu Asp Leu Glu Thr Ile Val
115 120 125

Thr Pro Gly Ser Ser Thr Arg Ser Met Arg Thr Pro Ala Arg Asp Ser
130 135 140

Thr Val Pro Thr Ile Gly Glu Leu Glu Glu Phe Phe Ala Tyr Ala Glu
145 150 155 160

Gln Gln Gln Gln Arg Leu Phe Met Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val
165 170 175

Asn Asp Val Pro Leu Pro Gly Gly Tyr Glu Trp Val Gln Val Ser Pro
180 185 190

<210> 70

<211> 248

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 70

Met Gly Lys Tyr Ile Lys Lys Lys Lys Leu Asp Gly Glu Ala Leu Ser
1 5 10 15

Leu Ile Asp Val Ser Pro Ser Pro Leu Gly Val Leu Thr Arg Ala Lys
20 25 30

Ser Leu Ala Leu Gln Arg Arg Leu Gln Lys Pro Pro Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Pro Asn Pro Pro Pro Ser Lys Gln Glu Ile Thr Asp Cys Ser Gly Gly
50 55 60

Ser Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg Arg Leu Gln Lys Lys Pro Pro Pro
65 70 75 80

Ile Val Val Ile Arg Ser Ser Lys Arg Arg Lys Gln Arg Arg Glu Glu
85 90 95

Glu Gly Arg Asn Pro Asn Pro Asn Pro Gln Asn His Asp Ser Ile Arg
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Asp Gly Ser Ser Arg Ser Asp Ser Val Ala Glu Ser
 115 120 125

Val Val Phe Gly Lys Glu Lys Asp Phe Asn Gly Gly Ile Asn Arg Glu
 130 135 140

Leu Asp Gly Ser Glu Ser Phe Asn Trp Thr Thr Ser Arg Glu Ser Thr
 145 150 155 160

Pro Cys Ser Leu Ile Arg Lys His Glu Thr Ile Thr Ser Pro Gly Ser
 165 170 175

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

Asp Ser Phe Ser Gly Ser His Arg His Leu Pro Thr Thr Pro Glu Met
 195 200 205

Asp Glu Phe Phe Ser Ala Ala Glu Glu Glu Gln Gln Lys Gln Phe Ile
 210 215 220

Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn Glu Gln Pro Leu Pro Gly Arg
 225 230 235 240

Phe Glu Trp Lys Lys Val Asp Asp
 245

<210> 71
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Brassica napus

<400> 71

Met Gly Arg Tyr Ile Lys Lys Ser Lys Ile Ala Gly Gly Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Ala Lys Asp Ile Ser His Gln Thr Ala Ser Gly Phe Arg Thr Arg Ala
 20 25 30

Ala Lys Asn Leu Ala Leu Gln Arg Leu Arg Ser His Ser Thr Pro Pro
 35 40 45

Phe Val Asp Ala Asp Ser Phe Arg Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Arg Arg
 50 55 60

Leu Val Lys Leu Pro Leu Leu Ala Asp Thr Arg Lys Gln Gln Gln Arg
 65 70 75 80

Gln Leu Ala Asn Ser Val Gly Lys Arg Gln Thr Thr Asn Pro Arg Ala
85 90 95

Asn Pro Val Leu Ser Ser Glu Pro Thr Asn Leu Glu Glu Asp Arg Gly
100 105 110

Ser Asn Leu Val Lys Phe Glu Ser Gly Cys Ser Leu Gly Glu Lys Gly
115 120 125

Leu Glu Phe Glu Ser Gly Asp Arg Glu Thr Thr Pro Cys Ser Leu Arg
130 135 140

Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Gln Ser Val Pro Ser His Glu Ile Glu
145 150 155 160

Glu Phe Phe Ala Phe Ala Glu Gln Gln Gln Gln Arg Phe Phe Thr Glu
165 170 175

Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Ser Glu Asn Pro Leu Pro Gly Arg Tyr
180 185 190

Glu Trp Ile Lys Val Val Pro
195

<210> 72

<211> 190

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 72

Met Ser Glu Arg Asp Pro Asn Cys Lys Arg Asp Ala Arg Ser Leu Glu
1 5 10 15

Ala Ser Ser Gln Asn Asp Ser Gln Leu Lys Lys Lys Lys Leu Asp Asp
20 25 30

Asp Phe Val Phe Leu Ala Val Pro Ser Pro Ser Met Ala Ser Ser Asp
35 40 45

Asp Ser Ser Arg Gly Gly Cys Ser Val Thr Ser Ala Gly Glu Asp Asp
50 55 60

Asp Lys Ser Ser Ile Ile Cys Phe Ser Ser Glu Ser Asn Glu Ile Val
65 70 75 80

Arg Lys Ser Pro Thr Val Ser Val Asp Leu Glu Thr His Gln Ile Ser
85 90 95

Asp Asp Leu Ser Val Ser Gly Arg Ile Ala His Arg Asn Glu Ala Asn
100 105 110

Pro Glu Ser Glu Glu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Glu Met Glu Ser Ser
115 120 125

Ser Ala Asp Asp Arg Lys Ser Ser Pro Glu Val Ser Lys Ser Pro Thr
130 135 140

Pro Gly Glu Ile Asp Glu Phe Leu Ser Glu Leu Glu Ser Lys Asp Gln
145 150 155 160

Lys Arg Phe Met Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Asn Asp Lys Pro
165 170 175

Leu Gln Gly Arg Tyr Lys Trp Asp Arg Val Lys Pro Leu Lys
180 185 190

<210> 73
<211> 70
<212> PRT
<213> humano

<400> 73

Asn Leu Phe Gly Pro Val Asp His Glu Glu Leu Thr Arg Asp Leu Glu
1 5 10 15

Lys His Cys Arg Asp Met Glu Glu Ala Ser Gln Arg Lys Trp Asn Phe
20 25 30

Asp Phe Gln Asn His Lys Pro Leu Glu Gly Lys Tyr Glu Trp Gln Glu
35 40 45

Val Glu Lys Gly Ser Leu Pro Glu Phe Tyr Tyr Arg Pro Pro Arg Pro
50 55 60

Pro Lys Gly Ala Cys Lys
65 70

<210> 74
<211> 513
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Krp1 F151A;F153A otimizado para expressão em milho

<400> 74
atggtccgga agtgccggaa gacgaaaggc accgtggggg ctagtagcac ctatatgcaa 60
cttaggtcaa gaaggatcgt ctaccgtagc gagaaggcta gttcctctag ttgcgtcatgc 120
tgtgcttcaa ataacaacgg cgtgatcgac cttgaggagg agcgggatgg agagacagag 180
acctcttcgt gcaggcgctc cagcaaacgt aaactcttcg agaatcttag ggagaaggag 240
agtatggaaa attctcagca aatcgtagcc ggatttgatt cggcgggtgaa agagtctagc 300

gactgctgct gttccagaag gacgagtctg tctactaccg aggagaaggg gaaaagcgcc 360
 accgagcaac cgccgacggc tgtcgagatt gaggatttct ttgtcgaggc ggagaaacag 420
 ctccacgaca attttaagaa gaaatataac gctgacgctg aaaaggagaa gccactggag 480
 ggcaggtacg agtgggttaa attgtccgag tga 513

<210> 75
 <211> 513
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Krp1 Y149A;F151A;F153A otimizado para expressão em milho

<400> 75
 atggtccgga agtgccggaa gacgaaaggc accgtggggg ctagtagcac ctatatgcaa 60
 cttaggtcaa gaaggatcgt ctaccgtagc gagaaggcta gttcctctag ttcgtcatgc 120
 tgtgcttcaa ataacaacgg cgtgatcgac cttgaggagg agcgggatgg agagacagag 180
 acctcttcgt gcaggcgctc cagcaaacgt aaactcttcg agaatcttag ggagaaggag 240
 agtatggaaa attctcagca aatcgtagcc ggatttgatt cggcggtgaa agagtctagc 300
 gactgctgct gttccagaag gacgagtctg tctactaccg aggagaaggg gaaaagcgcc 360
 accgagcaac cgccgacggc tgtcgagatt gaggatttct ttgtcgaggc ggagaaacag 420
 ctccacgaca attttaagaa gaaagcgaac gctgacgctg aaaaggagaa gccactggag 480
 ggcaggtacg agtgggttaa attgtccgag tga 513

<210> 76
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 76

Ile Pro Ser Ser Thr Glu Met Asn Glu Tyr Phe Ala Ala Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Arg Gln Gln Gln Ala Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn
 20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys Leu Asp
 35 40 45

<210> 77
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 77

Val Pro Ser Ser Arg Glu Met Asn Glu Tyr Phe Ala Ala Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Arg Gln Gln Gln Asp Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Ala Asn
 20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Phe Glu Trp Val Lys Leu Asp
 35 40 45

<210> 78
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 78

Ile Pro Ser Ser Leu Glu Met Glu Glu Phe Phe Ser Ala Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Gln Glu Gln His Asn Phe Arg Glu Lys Tyr Asn Phe Cys Pro Val Asn
 20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Ala Arg Leu Asp Cys
 35 40 45

<210> 79
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Soja

<400> 79

Met Pro Thr Glu Leu Glu Leu Glu Glu Phe Phe Ala Ala Ser Glu Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Gln Lys Arg Phe Gln Asp Arg Tyr Asn Tyr Asp Ile Val Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Gln Leu Lys Pro
 35 40 45

<210> 80
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Soja

<220>
 <221> característica - misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa pode ser qualquer aminoácido ocorrendo naturalmente

<400> 80

Met Pro Thr Glu Leu Glu Xaa Glu Glu Phe Phe Val Ala Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Gln Lys Arg Phe Gln Asp Lys Tyr Asn Tyr Asp Ile Val Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Gln Leu Lys Pro
 35 40 45

<210> 81
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Soja

<400> 81

Met Pro Thr Glu Leu Glu Leu Asp Glu Phe Phe Ala Ala Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Arg Lys Arg Phe Ser Asp Lys Tyr Asn Tyr Asp Ile Val Lys
 20 25 30

Gly Val Ser Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
 35 40 45

<210> 82
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Soja

<400> 82

Pro Pro Lys Ala Glu Ile Glu Glu Phe Phe Ala Met Ala Glu Lys Tyr
 1 5 10 15

Glu Gln Lys Lys Phe Thr Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Ile Val Arg Asp
 20 25 30

Leu Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Gln Trp Val Arg Leu
 35 40

<210> 83
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Soja

<400> 83

Ile Pro Thr Ser Arg Glu Met Asp Glu Phe Phe Ala Glu Ile Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Gln Gln Lys Lys Phe Ile Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Asn
 20 25 30

Glu Lys Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Glu Trp Glu Lys Leu Lys Pro
 35 40 45

<210> 84
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Populus tremula

<400> 84

Ile Pro Thr Thr Arg Glu Met Asp Glu Phe Phe Gly Pro Ala Glu Glu
1 5 10 15

Glu Gln Leu Arg Gln Phe Thr Glu Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Val Ser
20 25 30

Asp Lys Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Glu Lys Leu
35 40 45

<210> 85
<211> 43
<212> PRT
<213> Populus tremula

<400> 85

Thr Asp Glu Glu Ile Glu Lys Phe Phe Gly Glu Ile Gln Asn Asn Ile
1 5 10 15

Pro Gln Cys Phe Lys Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Asp Lys Asp Glu
20 25 30

Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Ala Arg Leu
35 40

<210> 86
<211> 45
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 86

Val Pro Ser Ser Leu Glu Met Glu Glu Phe Phe Ala Ala Ala Glu Gln
1 5 10 15

Gln Gln His Gln Ala Phe Arg Glu Arg Tyr Asn Phe Cys Pro Val Asn
20 25 30

Asp Cys Pro Leu Pro Gly Arg Tyr Glu Trp Thr Arg Leu
35 40 45

<210> 87
<211> 46
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 87

Pro Pro Glu Glu Glu Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Ala Glu Ser Ser
1 5 10 15

Val Ala Arg Arg Phe Ala Ala Lys Tyr Asn Tyr Asp Ile Val Lys Asp
20 25 30

Ala Pro Met Asp Gly Arg Tyr Glu Trp Val Arg Val Arg Pro
35 40 45

<210> 88
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> BnKrp1 F145A;Y149A

<400> 88

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
 35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
 50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
 65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
 100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Ala Lys Lys Lys Ala Asn Phe Asp Phe Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
 165

<210> 89
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> BnKRP1 F145A;Y149A;F151A

<400> 89

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Ala Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Phe Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
165

<210> 90

<211> 168

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F145A;Y149A;F151A

<400> 90

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Ala Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
165

<210> 91
<211> 168
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> BnKrp1 Y149A;F151A

<400> 91

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Phe Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
 165

<210> 92
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> BnKrp1 Y149A;F153A

<400> 92

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
 35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
 50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
 65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
 100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Phe Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
165

<210> 93
<211> 168
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> BnKrp1 F151A;F153A

<400> 93

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
165

<210> 94
<211> 168
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A

<400> 94

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu
165

<210> 95

<211> 168

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;E164A

<400> 95

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Ala Trp Val Lys Leu
165

<210> 96

<211> 168

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;W165A

<400> 96

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
 100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
 145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Ala Val Lys Leu
 165

<210> 97
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> BnKrp1 F151A;F153A;E164A;W165A

<400> 97

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
 20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
 35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
 50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
 65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
 100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
 115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
 130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu
165

<210> 98

<211> 168

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A

<400> 98

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Ala Trp Val Lys Leu
165

<210> 99

<211> 168

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;W165A

<400> 99

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Glu Ala Val Lys Leu
165

<210> 100

<211> 168

<212> FRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A;W165A

<400> 100

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Ala Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu
165

<210> 101
<211> 168
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> BnKrp1 E164A;W165A

<400> 101

Met Val Arg Lys Cys Arg Lys Thr Lys Gly Thr Val Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Cys Ala Ser Asn Asn Asn Gly Val
35 40 45

Ile Asp Leu Glu Glu Glu Arg Asp Gly Glu Thr Glu Thr Ser Ser Cys
50 55 60

Arg Arg Ser Ser Lys Arg Lys Leu Phe Glu Asn Leu Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

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

Lys Glu Ser Ser Asp Cys Cys Cys Ser Arg Arg Thr Ser Leu Ser Thr
100 105 110

Thr Glu Glu Lys Gly Lys Ser Ala Thr Glu Gln Pro Pro Thr Ala Val
115 120 125

Glu Ile Glu Asp Phe Phe Val Glu Ala Glu Lys Gln Leu His Asp Asn
130 135 140

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu
145 150 155 160

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu
165

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo inibidor de quinase dependente de ciclina (CKI) de planta mutante, isolado, compreendendo:

uma sequência de aminoácido CKI tendo pelo menos uma modificação com relação a um polipeptídeo CKI de planta do tipo silvestre, o referido polipeptídeo CKI do tipo silvestre compreendendo (a) uma região de ligação de ciclina que confere afinidade de ligação a uma ciclina e (b) uma região de ligação de quinase dependente de ciclina (CKI) que confere afinidade de ligação a uma CDK;

em que a referida pelo menos uma modificação está dentro da região de ligação de CDK de modo a conferir, com relação ao polipeptídeo CKI do tipo silvestre, uma afinidade de ligação modificada do polipeptídeo de CKI mutante para a CDK;

em que o polipeptídeo de CKI mutante substancialmente mantém, com relação ao polipeptídeo CKI do tipo silvestre, afinidade de ligação à ciclina ; e

em que o polipeptídeo de CKI mutante pode competir com a referida CKI do tipo silvestre para ligação à região de ligação de CDK.

2. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipeptídeo de CKI de planta do tipo silvestre é um membro da família de proteína relacionada com KIP (KRP) .

3. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 2, em que o referido membro da família KRP é um polipeptídeo de CKI de *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, milho, trigo, arroz, alfafa, algodão, ou álamo.

4. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 2, em que o referido membro da família KRP é um polipeptídeo KRP1 de *Arabidopsis* ou *Brassica*.

5. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 2, em que a referida pelo menos uma modificação é dentro de uma região que correspondem aos aminoácidos 145-168 de KRP1 de *Brassica* (BnKRP1).

6. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 5, que compreende pelo menos duas modificações dentro da região que correspondem aos aminoácidos 145-168 de KRP1 de *Brassica* (BnKRP1).

7. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 5, em que a referida pelo menos uma modificação compreende uma substituição de aminoácido.

8. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 7, em que a substituição de aminoácido é uma substituição de não-alanina por alanina ou uma substituição não-conservativa.

9. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 7, que compreende pelo menos duas substituições de aminoácido, cada substituição de aminoácido estando em uma posição independentemente selecionada do grupo consistindo em:

- (a) uma posição que corresponde ao aminoácido 145 de Bn-KRP1;
- (b) uma posição que corresponde ao aminoácido 149 de Bn-KRP1;
- (c) uma posição que corresponde ao aminoácido 151 de Bn-KRP1;
- (d) uma posição que corresponde ao aminoácido 153 de Bn-KRP1;
- (e) uma posição que corresponde ao aminoácido 164 de Bn-KRP1; e
- (f) uma posição que corresponde ao aminoácido 165 de Bn-KRP1.

10. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 9, em que uma ou mais, e opcionalmente todas, das pelo menos duas substituições de aminoácido são substituição(ões) de não-alanina por alanina ou são substituição(ões) de aminoácido não-conservativas.

11. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 5, em que a referida pelo menos uma modificação, ou as pelo menos duas modificações, é (são) dentro do motivo KYNFDF.

12. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 11, em que a referida pelo menos duas modificações dentro do motivo KYNFDF compreendem substituições de aminoácido em posições que correspondem aos aminoácidos 151 e 153 de BnKRP1.

5 13. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 12, em que pelo menos uma das substituições de aminoácido nas posições que correspondem aos aminoácidos 151 e 153 de BnKRP1 é uma substituição de não-alanina por alanina ou é uma substituição de um aminoácido com um aminoácido opostamente carregado.

10 14. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 12, em que cada uma das substituições de aminoácido nas posições que correspondem aos aminoácidos 151 e 153 de BnKRP1 é uma substituição de não-alanina por alanina ou é uma substituição de um aminoácido com um aminoácido opostamente carregado.

15 15. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, também compreendendo uma substituição de aminoácido em uma posição que corresponde ao aminoácido 149 de BnKRP1.

20 16. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 15, em que a substituição de aminoácido na posição que corresponde ao aminoácido 149 de BnKRP1 é uma substituição de não-alanina por alanina ou é uma substituição não-conservativa.

25 17. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 16, também compreendendo uma substituição de aminoácido em pelo menos uma de, ou em cada uma de:

(a) uma posição que corresponde ao aminoácido 164 de BnKRP1, e

(b) uma posição que corresponde ao aminoácido 165 de BnKRP1.

30 18. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com a reivindicação 17, em que a substituição de aminoácido em pelo menos uma de (a) e (b), ou em cada uma de (a) e (b), é uma substituição de não-alanina por

alanina, ou uma substituição não-conservativa.

19. Polipeptídeo CKI de planta mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 18, que é um polipeptídeo BnKRP1 mutante.

20. Polipeptídeo BnKRP1 mutante de acordo com a reivindicação 19, que é

- (i) BnKRP1 F151A; F153A;
- (ii) BnKRP1 Y149A; F151A; F153A;
- (iii) BnKRP1 E164A; W165A; ou
- (iv) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.

21. Polipeptídeo de CKI mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a referida pelo menos uma modificação compreende a truncação da região de ligação de CDK.

22. Polipeptídeo de CKI mutante de acordo com a reivindicação 21, que é um polipeptídeo BnKRP1 mutante.

23. Ácido nucléico recombinante codificando o polipeptídeo de CKI mutante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

24. Vetor compreendendo um réplicon e o ácido nucléico recombinante como definido na reivindicação 23.

25. Vetor de acordo com a reivindicação 24, que é um vetor de expressão que também compreende uma região promotora operacionalmente ligada ao ácido nucléico recombinante.

26. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 25, em que a região promotora é operacional em uma célula de planta.

27. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 26, em que a região promotora compreende um promotor CaMV 35S ou um promotor LFAH12.

28. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 25, em que a região promotora é transcricionalmente ativa de um modo específico em um tecido e/ou órgão.

29. Célula hospedeira compreendendo o ácido nucléico recombinante como definido na reivindicação 33.

30. Célula hospedeira compreendendo o vetor como definido em

qualquer uma das reivindicações 24 a 28.

31. Método de produzir um polipeptídeo de CKI mutante, o referido método compreendendo:

5 cultivar a célula hospedeira como definido na reivindicação 29 ou 30 sob condições adequadas para a expressão do ácido nucléico codificando o polipeptídeo de CKI mutante.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, também compreendendo recuperar o referido polipeptídeo de CKI mutante.

33. Planta transgênica compreendendo um transgene codifican-
10 do um polipeptídeo de CKI mutante, a referida planta transgênica expres-
sando um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre, o referido polipeptídeo CKI
do tipo silvestre compreendendo (a) uma região de ligação de ciclina que
confere afinidade de ligação a uma ciclina e (b) uma região de ligação de
CDK que confere afinidade de ligação a uma CDK, em que o referido poli-
15 peptídeo de CKI mutante compreende uma seqüência de aminoácido CKI
tendo pelo menos uma modificação com relação a um polipeptídeo de CKI
de referência, o referido polipeptídeo de CKI de referência selecionado do
grupo que consiste em

- 20 (i) o polipeptídeo de CKI de planta do tipo silvestre expresso
pela planta transgênica, e
(ii) um polipeptídeo CKI do tipo silvestre heterólogo a (i) e ca-
paz de fornecer função de CKI do tipo silvestre dentro de
uma célula da planta transgênica substancialmente equiva-
lente à função de CKI do tipo silvestre de (i);

25 em que a referida pelo menos uma modificação está dentro da
região de ligação de CDK de modo a conferir, com relação ao polipeptídeo
de CKI de referência, uma afinidade de ligação modificada de polipeptídeo
de CKI mutante para a CDK, e em que o polipeptídeo de CKI mutante subs-
tancialmente mantém, com relação ao polipeptídeo de CKI de referência,
30 afinidade de ligação à ciclina.

34. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 33, que é
uma planta monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea.

35. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 34 e 35, em que o dito polipeptídeo de CKI de referência é um membro da família de proteína relacionada com KIP (KRP).

36. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que o referido membro da família KRP é um polipeptídeo de CKI de *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, milho, trigo, arroz, alfafa, algodão, ou álamo.

37. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 36, em que o referido membro da família KRP é um polipeptídeo de KRP1.

38. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a referida pelo menos uma modificação, ou as pelo menos duas modificações, é (são) dentro de uma região que corresponde aos aminoácidos 145-168 de Brassica KRP1 (BnKRP1).

39. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 38, em que a referida pelo menos uma modificação, ou as pelo menos duas modificações, compreende(m) uma substituição de aminoácido.

40. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 39, em que a substituição de aminoácido é uma substituição de não-alanina por alanina, ou é uma substituição de um aminoácido com um aminoácido opostamente carregado.

41. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 39, em que a pelo menos uma modificação, ou as pelo menos duas modificações, é (são) dentro do motivo KYNFDF.

42. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 41, em que a pelo menos uma modificação, ou as pelo menos duas modificações, dentro do motivo KYNFDF compreende(m) substituições de aminoácido em posições que correspondem aos aminoácidos 151 e 153 de BnKRP1.

43. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 42, em que pelo menos uma das substituições de aminoácido, ou cada uma substituição nas posições que correspondem aos aminoácidos 151 e 153 de BnKRP1 é uma substituição de não-alanina por alanina, ou é uma substituição de um aminoácido com um aminoácido opostamente carregado.

44. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 42 e 43, em que o polipeptídeo de CKI mutante também compreende uma substituição de aminoácido em uma posição que corresponde ao aminoácido 149 de BnKRP1.

5 45. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 44, em que a substituição de aminoácido na posição que corresponde ao aminoácido 149 de BnKRP1 é uma substituição de não-alanina por alanina, ou é uma substituição não-conservativa.

10 46. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 e 45, em que o polipeptídeo de CKI mutante também compreende uma substituição de aminoácido em pelo menos uma de, ou em cada uma de:

- (a) uma posição que corresponde ao aminoácido 164 de BnKRP1, e
- 15 (b) uma posição que corresponde ao aminoácido 165 de BnKRP1.

20 47. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 46, em que a substituição de aminoácido em pelo menos uma de, ou em pelo menos em cada uma de, (a) e (b) é uma substituição de não-alanina por alanina, ou é uma substituição não-conservativa.

48. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 47, em que o polipeptídeo de CKI de referência é um polipeptídeo BnKRP1.

25 49. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 48, em que o polipeptídeo de CKI mutante é

- (i) BnKRP1 F151A; F153A;
- (ii) BnKRP1 Y149A; F151A; F153A;
- (iii) BnKRP1 E164A; W165A; ou
- (iv) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.

30 50. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 49, em que a referida pelo menos uma modificação compreende a truncção da região de ligação de CDK.

51. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 50, em que o polipeptídeo de CKI de referência é um polipeptídeo BnKRP1.

52. Planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 a 51, que é selecionada do grupo que consiste em *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, milho, trigo, arroz, alfafa, algodão, álamo, e camelina.

53. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 52, em que o polipeptídeo de CKI de referência é um polipeptídeo de CKI de *Arabidopsis thaliana*.

54. Método de produzir planta transgênica como definida em qualquer uma das reivindicações 38 a 53, compreendendo:

introduzir em uma planta um vetor compreendendo o transgene codificando o polipeptídeo de CKI mutante.

55. Método de modular divisão celular em uma célula de planta expressando um polipeptídeo de CKI do tipo silvestre, o referido polipeptídeo CKI do tipo silvestre compreendendo (a) uma região de ligação de ciclina que confere afinidade de ligação a uma ciclina e (b) uma região de ligação de CDK que confere afinidade de ligação a uma CDK, o método compreendendo:

expressar dentro da célula um polipeptídeo de CKI mutante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, também compreendendo introduzir na célula de planta um ácido nucléico recombinante codificando o polipeptídeo de CKI mutante.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o ácido nucléico recombinante é um vetor de expressão.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 57, em que a célula de planta é de uma planta selecionada do grupo que consiste em *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, e milho.

59. Método para aumentar o vigor da planta, compreendendo:

expressar dentro da planta um polipeptídeo de CKI mutante compreendendo um CKI como definido em qualquer uma das reivindicações

1 a 22; e

permitir que o referido polipeptídeo de CKI mutante iniba a atividade biológica de CKI do tipo silvestre dentro da planta a fim de aumentar o vigor da planta.

5 60. Método para aumentar a massa de raiz em uma planta, compreendendo:

expressar dentro da planta um polipeptídeo de CKI mutante compreendendo um CKI como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22; e

10 permitir que o referido polipeptídeo de CKI mutante iniba a atividade biológica de CKI do tipo silvestre dentro da planta a fim de aumentar a massa de raiz na planta.

61. Método para aumentar o tamanho de semente da planta, compreendendo:

15 expressar dentro da planta um polipeptídeo de CKI mutante compreendendo um CKI como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22; e

20 permitir que o referido polipeptídeo de CKI mutante iniba a atividade biológica de CKI do tipo silvestre dentro da planta a fim de aumentar o tamanho de semente da planta.

62. Método para aumentar a germinação precoce em uma planta, compreendendo:

25 expressar dentro da planta um polipeptídeo de CKI mutante compreendendo um CKI como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22; e

permitir que o referido polipeptídeo de CKI mutante iniba a atividade biológica de CKI do tipo silvestre dentro da planta a fim de aumentar a germinação precoce na planta.

```

BnKrp1      1 --MVRKCRKTKGTVGA-----SSTYMQLRSRRIVYRS
AtKRP1      1 --MVRKYRKAKGIVEAG-----V-----SSTYMQLRSRRIVYVR
AtKRP2      1 --MAAVRRRRERDVVE-----ENGVTTHTVKRRKMEEEVDLVE
BnKrp3      1 --MGKYIRKSKITG-----DIDSMEATEATSLGVRTR-AAAKTLALKR
AtKRP3      1 --MGKYMKSKITG-----DISVMEVSKATAPSPGVTRAAKTLALKR
BnKrp4      1 --MGKYIRKKKLDG-----EALSLIDVSP--SPLGVLTRAKSEALQR
AtKRP4      1 --MGKYIRKSKIDGAGAGAGGGGGGGGESSIALMDVVSPPSSSSSLGVLTRAKSLALQQ
BnKrp5      1 --MGRIYIKSKIAGG-----ALSAKDISHQTASGFRTRAAKNLALQRLR
AtKRP5      1 --MGKYIRKSKVAG-----AVSVKDKSHPPALGFRTRAAAANKLALHR
BnKrp6      1 --MSERDPNCKRDAR-----SLEASSONDSQLKKKKLDDDFVFLA
AtKRP6      1 --MSERKRELAEEAS-----STSFSPLKRTKLND
AtKRP7      1 MSETKPKRDSEYEG-----SNIKRMRLDDDDVLR
p27         1 -----

BnKrp1      31 EKASS-----SSSSCCASN---NNGV
AtKRP1      33 SEKSSSVS-----VVGDNVSSSCSGSNEYKKELTH
AtKRP2      36 SRIILSP-----CVQATNRGGIVARNASAGASETSVM
BnKrp3      41 LNSSAP-----DSSCYLQHSRRLEKPPSLAE
AtKRP3      42 LNSSAADS-----ALPNDSCYLQHSRRLEKPPSLIE
BnKrp4      39 RLQ-----KPPSSPSNPPPS---KQETDCSGGSYLQHSRRRLQKKPPP
AtKRP4      59 QQQRCLLQKPSSPSSLPTSASPNNPSKQKMKKKQQQMNDCGSYLQHSRRRLQKKPP-IV
BnKrp5      43 SHSTPPF-----VDADSFYQLQHSRRRLVKPLPLAD
AtKRP5      42 LRSHSD-----EADSFNYLQHSRRRLVKPLPLTN
BnKrp6      39 VPSPSMAS-----SDDSSRGCSVTSAGEDDDKSSIT
AtKRP6      29 SDSSPDSDHVIVF-----AVSSSSVASSAALASDECSVTI
AtKRP7      31 SPITRLS-----SSSSSLAYSVSDSGGFCVAL
p27         1 -----

BnKrp1      50 DLEE---ERDGETETSSCRRSSKRKLFENLREK-----ESMENSQ--
AtKRP1      65 LEEE---DKDGDTEETSTYRRGTRKLFENLREE-----EKEELSKSM
AtKRP2      68 VRRR---DSPPVEEQCIEEDSSVSCCSTSEEK-----SKRRIEFVDLE
BnKrp3      69 PRQ---VKPGIKESGSK--IDSVNSSVAGSGD-----ECFCRE
AtKRP3      75 PKQPPRVHRSGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSN-----EDECFDNFVSQVSCGE
BnKrp4      83 VIRSSKRRKORREBGRNPNPNPQ-NHDSIRGSGDGSRSRSDVAESVVFGEKDFNGGI
AtKRP4      118 VIRSTKRRKQORRNCTCGRNPNPRSNLDSIRGDG---SRSDSVSESVVFGEKDFLISEI
BnKrp5      74 TRKQ---QORQLANSVGK---RQTTNPRAN-----PVLSEPT
AtKRP5      71 TRKQ---QKQQLIPSVNQ---CQTKNPRASSGP-----AKKLEPDT
BnKrp6      71 CFSS---ESNEIVRK-SPTVSVDLETHQIS-----QDLVS
AtKRP6      64 GGEE---SDQSSSISSGCFTSESKEIAKNSSSFG-----VDLEDHQIETET
AtKRP7      60 SEEE---DDHLSSSISSGCSSSETNEIATRLP-----FSDLEAHEISET
p27         1 -----

BnKrp1      87 -QIVAGFDSAVK-----ESSDCCSRR---TSLSTTEEGK-----
AtKRP1      104 ENYSSEFESAVK-----ESLDCCSGRKTMEETVTABEEEK-----
AtKRP2      110 ENNGDDRETETS-----WIYDDLNKSEESMNMDSVAVEDVESR-----
BnKrp3      102 NSPEFQTRQST-----RESTPCNFVEDLETIVPGSSTRSMR-----
AtKRP3      126 NSLGFEHRHST-----RESTPCNFVEDMEIMVTPGSSTRSMCRATK-----
BnKrp4      142 NRELDGSESFN-----WTTRESITPCSLIRKHETITSPGSSTKLSNGISDNSNQR
AtKRP4      174 NKDPTFGQNFDFLEEEHTQSFNRTTRESITPCSLIRPEIMTIPGSSTKLNICVSE-SNQR
BnKrp5      106 NLEEDRGSNLV-----KFESGCSLCEKGLEFESGDRETTPCSL-----
AtKRP5      106 TTEEACGDNER-----ISRSDCNFGDKGFDLESEN-----
BnKrp6      103 GRIHRNEANP-----ESEALGETTEMESSADDRKS-----
AtKRP6      107 ETSTFITSNFR-----KETSPVSEGLGETTEMESSSATKRK-----
AtKRP7      101 EISTLLTNFRK-----QGISSSENLGETAEMDSATTEMRDQRK-----
p27         1 -----

```

FIG 1A

BnKrp1	118	----	KSATEQPP	TAVE	IED	EDFF	VEAEK	----	OLHD	NFKK	KYNED	FEKE	KEPLEG	-RYE	WVKL	-
AtKRP1	140	----	AKLM	TEMP	TES	IED	EDFF	VEAEK	----	OLKE	KFKK	KYNFD	FEKE	KEPLEG	-RYE	WVKLE
AtKRP2	150	-RRL	RKSL	HETV	KEAE	IED	EDFF	QVAEK	DLRN	KLLE	CSMK	KYNFD	FEKDE	PLCG	CRYE	WVKLN
BnKrp3	139	---	TPARD	STVPT	IGEL	EEFF	FAYAEQ	----	QQOR	LFME	KYNFD	IVND	VPLPG	-GYE	WVQS	
AtKRP3	167	-EY	TREQ	DNVI	PTT	SEM	EEFF	FAYAEQ	----	QQOR	LFME	KYNFD	IVND	IPLSG	-RYE	WQVK
BnKrp4	192	ED	SFSG	SHRHL	PTTP	EMDE	FFSA	AEE	----	EQOK	OFIE	KYNFD	PVNE	QPLPG	-RYE	WKVD
AtKRP4	233	ED	SLSR	SHRRR	PTTP	EMDE	FFSG	AEE	----	EQOK	OFIE	KYNFD	PVNE	QPLPG	-RYE	WKVD
BnKrp5	144	-RR	DSEE	ATQ	SVPS	HEIE	EFFA	FAEQ	----	QQOR	FFIE	KYNFD	IVSD	NPLEG	-RYE	WKVV
AtKRP5	137	----	SMIS	DSKS	IQSE	IED	FFSA	FAEQ	----	QQOR	FFIE	KYNFD	IVSD	NPLEG	-RYE	WKVM
BnKrp6	136	----	SPEV	SKS	PTPG	ETDE	FLSE	LES	----	KDQK	RFMD	KYNFD	IVND	KPLCG	-RYK	WDRVK
AtKRP6	144	----	QPGV	RKTPT	AAE	IED	FLSE	LESPD	-DKK	KQFI	EKYNFD	IVND	EPLCG	-RYK	WDR	L-
AtKRP7	140	-TE	KKK	MEKS	PTQA	ELDD	FFSA	AER	----	YEOK	RFTE	KYNFD	IVND	IPLCG	-RYQ	WVSLK
p27	31	-----	NLFG	PVDH	EEL	TRD	LEKH	CRDM	EAS	ORK	WNFD	FNHK	PLEG	-KYE	WQVE	

Ligação de ciclina

Ligação de CDK

BnKrp1		-----
AtKRP1	192	-----
AtKRP2	209	P-----
BnKrp3	192	P-----
AtKRP3	222	P-----
BnKrp4	248	D-----
AtKRP4	289	D-----
BnKrp5	199	P-----
AtKRP5	189	P-----
BnKrp6	188	PLK-----
AtKRP6		-----
AtKRP7	195	P-----
p27	81	KGSLPEFYRPPRPPKGACK

FIG 1B

Bn Krp1	124	PPTAVEIEDFFVEAEKQLHDNFKKYNFDFFEKEKPLEG-RYEWVKL---
Bn Krp3	146	VPTIGELIEEFFAYAEQQQORLFMEKYNFDIVNDVPLPG-GYEWVQVSP-
Bn Krp4	202	LPTTPEMDEFFSAAEEQKQFIEKYNFDPVNEQPLPG-RFEWKKVDD-
Bn Krp5	154	VPS-HEIEEFFAFABQQQORFFTEKYNFDIVSENPLPG-RYEWIKVVP-
Bn Krp6	142	SPTPGELDEFLSELESKDQKRFDKYNFDIVNDKPLQG-RYKWDVVKPL
Gm AAS13377	122	VPTSELEIEDFFAAAEKDIQKRFTDKYNFDIVKDMPLG-RYEWVQL---
Gm AAS13374	159	MPTLELEIEFFFAAEKDIQKRFDKYNFDIVKDVPLG-RYEWVQLKP-
Gm AAS13375	152	MPTLEXEBEFFVAAEKDIQKRFDKYNFDIVKDVPLG-RYEWVQLKP-
Gm AAS13376	136	MPTLELEIEFFFAAEKDIRKRFSDKYNFDIVKGVSLG-RYEWVKL---
Gm CO980060*		-PPKAELIEEFFFAAEKYEQKKFTEKYNFDIVRDLPLG-RYQWVRL--
Gm CO981606*		IPTSRMDEFFFAEIEEAQKKFIEKYNFDPVNEKPLSG-RYEWVKLKP
Zm AI737717*	68	VPPAQETQEFFAAAEAAHAKRFASKYNFDFVRGVPLDAGRFEWTPGVSI
Zm AW267370*	41	IPSSSTEMNEMFAAEQRROQAFIDKYNFDPVNDCLPLG-RFEWVKLD--
Zm CD963560*	17	VPSSREMNEFMFAAEQRROQODFIDKYNFDPANDCLPLG-RFEWVKLD--
Zm CB329626*	144	IPSSLEMEEFFSAAEQQEOHNFREKYNFCPVNDCLPLG-RYEWARLDC-
Os CV727532*		IPASAELEAFFAAEEQRQRAFIDKYNFDPVNDCLPLG-RFEWVKL---
Os CR293278*		VPSSLEMEEFFAAAEQQQHQAFRERYNFCPVNDCLPLG-RYEWARL---
Os BI306406*		-PPEEEMEAFLAAAESSVARRFKYNFDIVKQAPMDG-RYEWVVRP
Ta BG908519	145	IPCSAEMNEFFSAAEQPQQAFIDKYNFDPVNDCLPLG-RYEWVKLDZ
Ta AI820225*		VPSSLEMEDEFFAAAEQQQHOTFREKYNFCPASERPLPG-RYEWTVLDC
Pt CK096447*		IPTTCMDEFFAGVEQQQQLFIEKYNFDIVNDLPLSG-RYEWVVRV-
Pt BU862176*		IPTTREMEDEFFGPABEEQLROFTEKYNFDPVSDKPLG-RYEWVKL
Pt BU892281*		TDEELEKFFGEIÖNNIPOCFKDKYNFDFDKDEPLEG-RYEWARL
Nt KIS1	117	MPSEKELIEEFFAAROKAILKRFRKYNFDFFEKEEPLG-RYEWVVRIGS-
St BQ505644*		--SEAELEDEFFAAAEKDLHKHFAEKYNFDFAKEEPLG-RYEWVR---
Gh A1728644*		IPSXAELDEFFSVAEKYEQXRFAEKYXMDIVXDVPLDG-RY-----

Bn= Brassica napus (canola)
 Gm= Glycine max(soja)
 Os= Oryza sativa(arroz)
 St= Solanum tuberosum (batata)
 Gh= Gossypium hirsutum (algodão)
 Ta= Triticum aestivum (trigo)
 Pt= Populus tremula (álamo)
 Nt= Nicotiana tabacum (tabaco)

FIG 2



- Krp1 F151A; F153A Códon otimizado para expressão de lilho

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc
gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgatcgaccttgaggagg
agcgggatggagagacagagacctcttcgtgcaggcgctccagcaaactcttcgagaatcttagggagaagga
gagtatggaaaattctcagcaaactcgtagccggattgattcggcgggtgaaagagtctagcgactgctgctgttccagaagg
acgagtctgtctactaccgaggagaaggggaaaagcgccaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggatttctt
tgtcgaggcgagaaacagctccacgacaattttaagaagaatataacgctgacgctgaaaaggagaagccactggag
ggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

- Krp1 Y149A;F151A;F153A Códon otimizado para expressão de lilho

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc
gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgatcgaccttgaggagg
agcgggatggagagacagagacctcttcgtgcaggcgctccagcaaactcttcgagaatcttagggagaagga
gagtatggaaaattctcagcaaactcgtagccggattgattcggcgggtgaaagagtctagcgactgctgctgttccagaagg
acgagtctgtctactaccgaggagaaggggaaaagcgccaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggatttctt
tgtcgaggcgagaaacagctccacgacaattttaagaagaagcgaaacgctgacgctgaaaaggagaagccactgga
gggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

FIG 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÇÃO DE PROTEÍNA KRP MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE DE INIBIÇÃO DE COMPLEXO CICLINA-CDK ATIVO POR KRP DO TIPO SILVESTRE"**.

- 5 A presente invenção refere-se aos polipeptídeos inibidores de de CDK mutante (CKI) tendo atividade antagonista negativa dominante contra as proteínas de CKI do tipo silvestre, bem como composições relacionadas, incluindo ácidos nucleicos e vetores codificando os polipeptídeos de CKI mu-
10 tantes e células hospedeiras transformadas e plantas transgênicas compre-
 endendo tais ácidos nucleicos e vetores. São também descritos métodos relacionados para usar as proteínas mutantes para modular a divisão celular nas células, particularmente células de planta.