



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 113**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05735946 .5**

96 Fecha de presentación : **04.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1737974**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54

Título: **Procedimientos para identificar proteínas con actividad enzimática fosforilante de almidón.**

30

Prioridad: **05.03.2004 EP 04090087**
05.03.2004 US 549980 P
29.03.2004 EP 04090121
09.12.2004 EP 04090483

73

Titular/es: **Bayer CropScience AG.**
Alfred-Nobel-Strasse 50
40789 Monheim, DE

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.08.2010

72

Inventor/es: **Frohberg, Claus;**
Koetting, Oliver;
Ritte, Gerhard y
Steup, Martin

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.08.2010

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 344 113 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para identificar proteínas con actividad enzimática fosforilante de almidón.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar proteínas que participan en la fosforilación de almidón y a ácidos nucleicos que codifican tales proteínas. La invención se refiere además a células vegetales y plantas que presentan una elevada actividad de una proteína identificable usando el procedimiento según la invención. Las células vegetales y las plantas de este tipo sintetizan un almidón modificado. Por tanto, la presente invención también se refiere al almidón sintetizado por las células vegetales y plantas según la invención, además de a procedimientos para la preparación de este almidón y a la preparación de derivados de almidón de este almidón modificado.

10 Con respecto a la creciente importancia actualmente atribuida a constituyentes vegetales como fuentes de material de partida renovables, una de las tareas de la investigación biotecnológica es intentar adaptar estos materiales de partida vegetales para adaptar los requisitos de la industria de procesamiento. Además, con el fin de permitir regenerar materiales de partida que van a usarse en tantas áreas de aplicación como sean posibles, es necesario lograr una gran variedad de materiales.

15 El polisacárido almidón está constituido por componentes base químicamente uniformes, moléculas de glucosa, pero constituye una mezcla compleja de diferentes formas de moléculas que presentan diferencias con respecto al grado de polimerización y ramificación y, por tanto, se diferencia fuertemente entre sí en sus características físico-químicas.

20 Se discrimina entre almidón de amilosa, un polímero esencialmente no ramificado preparado a partir de unidades de glucosa glicosídicamente unidas por alfa-1,4, y almidón de amilopectina, un polímero ramificado en el que las ramas se producen por la aparición de enlaces alfa-1,6-glicosídicos adicionales. Otra diferencia adicional entre amilosa y amilopectina radica en el peso molecular. Mientras que la amilosa, dependiendo del origen del almidón, tiene un peso molecular de 5×10^5 - 10^6 Da, el de la amilopectina se encuentra entre 10^7 y 10^8 Da. Las dos macromoléculas pueden diferenciarse por su peso molecular y sus diferentes características físico-químicas que pueden mostrarse fácilmente la mayoría de las veces por sus diferentes características de unión a yodo.

25 La amilosa se ha considerado desde hace tiempo como un polímero lineal que está constituido por monómeros de alfa-D-glucosa ligados glicosídicamente por alfa-1,4. Sin embargo, en estudios más recientes se ha mostrado la presencia de puntos de ramificación glicosídicos en alfa-1,6 (aproximadamente el 0,1%) (Hizukuri y Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda y col., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

30 Las propiedades funcionales tales como, por ejemplo, la solubilidad, comportamiento de retrogradación, capacidad de unión al agua, propiedades formadoras de películas, viscosidad, propiedades de gelatinización, estabilidad a la congelación-descongelación, estabilidad a ácidos, concentración de gel y el tamaño de gránulos de almidón de los almidones están influidos, entre otras cosas, por la relación de amilosa/amilopectina, peso molecular, patrón de distribución de cadenas laterales, contenido de iones, contenido de lípidos y proteínas, tamaño promedio de gránulos de almidón, morfología de gránulos de almidón, etc. Las propiedades funcionales del almidón también están influidas por el contenido de fosfato, un componente no carbonado del almidón. Aquí se hace diferencia entre fosfato, que está unido covalentemente en forma de monoésteres a las moléculas de glucosa del almidón (descritas a continuación como fosfato de almidón), y fosfato en forma de fosfolípidos asociados al almidón. Además del contenido de fosfato, la influencia sobre las propiedades funcionales del almidón también depende en este caso de la forma (fosfato o fosfolípido de almidón) en el que el fosfato se produce en el almidón (Jane y col., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832).

35 El contenido de fosfato de almidón varía según la especie de planta. Por tanto, ciertos mutantes de maíz, por ejemplo, sintetizan un almidón con elevado contenido de fosfato de almidón (0,002% de maíz ceroso y 0,013% de maíz de alta amilosa), mientras que tipos convencionales de maíz sólo tienen trazas de fosfato de almidón. Asimismo, pequeñas cantidades de fosfato de almidón se encuentran en trigo (0,001%), mientras que no pudo detectarse fosfato de almidón en avena y sorgo. Asimismo, en los mutantes de arroz se encontró menos fosfato de almidón (0,003% de arroz ceroso) que en especies convencionales de arroz (0,013%). Se detectaron cantidades significativas de fosfato de almidón en plantas sintetizadoras de almidón almacenadoras en tubérculos o raíces tales como, por ejemplo, tapioca (0,008%), boniato (0,011%), arrurruz (0,021%) o patata (0,89%). Los valores en porcentaje del contenido de fosfato de almidón citados anteriormente se refieren al peso seco de almidón en cada caso y han sido determinados por Jane y col. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832).

40 El fosfato de almidón puede estar presente en forma de monoésteres en la posición C-2, C-3 o C-6 de los monómeros de glucosa polimerizada (Takeda y Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). La distribución de fosfato del fosfato de almidón en almidón sintetizado por plantas se distingue generalmente por el hecho que aproximadamente del 30% al 40% de los residuos de fosfato están covalentemente unidos en la posición C-3 y aproximadamente del 60% al 70% del residuo de fosfato está covalentemente unido en la posición C-6 de la molécula de glucosa (Blennow y col., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow y col. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) han determinado un contenido de fosfato de almidón que está unido en la posición C-6 de la molécula de glucosa para diversos almidones tales como, por ejemplo, almidón de patata (entre 7,8 y 33,5 nmoles por mg de almidón, dependiendo del tipo), almidón de diversas especies de *Curcuma* (entre 1,8 y 63 nmoles por mg), almidón de tapioca (2,5 nmoles por mg de almidón), almidón de arroz (1,0 nmoles por mg de almidón), almidón de judía mungo (3,5

ES 2 344 113 T3

nmoles por mg de almidón) y almidón de sorgo (0,9 nmoles por mg de almidón). Estos autores no han podido mostrar ningún fosfato de almidón unido en la posición C-6 en almidón de cebada y almidones de diferentes mutantes cerosos de maíz. Hasta la fecha no ha sido posible establecer una conexión entre el genotipo de una planta y el contenido de fosfato de almidón (Jane y col., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Por tanto, actualmente no es posible influir el contenido de fosfato de almidón en plantas por medio de cultivo.

En plantas transgénicas puede variar la cantidad de fosfato de almidón en almidones de almacenamiento. Por tanto, el almidón de almacenamiento de plantas de patata que presentan una actividad reducida de sintasa III de almidón soluble (Abel y col., 1996, The Plant Journal 10(6), 9891-991), enzima I de ramificación (BEI) (Safford y col., 1998, Carbohydrate Polymers 35, 155-168), enzima II de ramificación (BEII) (Jobling y col., 1999, The Plant Journal 18, 163-171), BEI y BEII (Schwall y col., 2000, Nature Biotechnology 18, 551- 554), una enzima de desproporción (documento WO 96 27673) o una enzima de desproporción y una BEI (documento WO 95 07355) muestran un contenido elevado de fosfato de almidón en comparación con almidón de plantas naturales correspondientes. Sin embargo, la alteración en el contenido de fosfato de almidón en estas plantas no es debida a las proteínas cuya actividad está reducida en estas plantas, participando directamente en la introducción de residuos de fosfato en el almidón. Por tanto, el aumento en el contenido de fosfato de almidón en las plantas transgénicas en cuestión no es un efecto primario, sino secundario, que se provoca mediante la reducción de las proteínas correspondientes. La razón para el aumento en el contenido de fosfato de almidón como resultado de la modificación de dichas actividades de proteínas está aún sin explicar. Por tanto, no es posible modificar específicamente el contenido de fosfato de almidón modificando las actividades de proteínas que sólo influyen el contenido de fosfato de almidón por un efecto secundario. Además, el modificar las actividades de proteínas que como efecto secundario tienen una influencia sobre el contenido de fosfato de almidón en plantas también provoca adicionalmente modificaciones en el almidón tales como, por ejemplo: cambios en la relación de amilosa/amilopectina y/o la longitud de las cadenas laterales de la amilopectina que constituye el efecto primario de los cambios en tales actividades de proteínas.

Previamente sólo se ha descrito una proteína que media en la introducción de enlaces covalentes de residuos de fosfato en las moléculas de glucosa de almidón. Esta proteína, frecuentemente designada R1 en la bibliografía científica, se une a los gránulos de almidón del almidón de almacenamiento en tubérculos de patata (Lorberth y col., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) y tiene la actividad enzimática de una alfa-glucano agua dicinasa (E.C. 02.07.09.4). En la reacción catalizada por R1, los eductos alfa-1,4-glucano (almidón), adenosina-trifosfato (ATP) y agua se convierten en los productos glucano-fosfato (almidón fosforilado), monofosfato y adenosina-monofosfato. En este caso, el residuo de gamma-fosfato en el ATP se transfiere al agua y el residuo de beta-fosfato del ATP se transfiere al glucano (almidón). R1 se transfiere *in vitro* el residuo de beta-fosfato del ATP a la posición C-6 y C-3 de las moléculas de glucosa de alfa-1,4-glucanos. La relación de fosfato en C-6 respecto a fosfato en C-3 que se obtiene en la reacción *in vitro* se corresponde con la relación que está presente en almidón aislado de plantas (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Como aproximadamente el 70% del fosfato de almidón presente en almidón de patata está unido a los monómeros de glucosa del almidón en la posición C-6 y aproximadamente el 30% en la posición C-3, esto significa que R1 fosforila preferentemente la posición C-6 de las moléculas de glucosa. Además, se ha mostrado usando amilopectina de maíz que, entre otras cosas, R1 puede fosforilar alfa-1,4-glucanos que todavía no contienen fosfato covalentemente unido (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171), es decir, R1 puede introducir fosfato *de novo* en alfa-1,4-glucanos.

La secuencia de aminoácidos de R1 contiene un dominio que presenta un alto grado de homología con piruvato fosfato dicinasa conocidas (dominios PPDK) y piruvato agua dicinasa conocidas (dominios PPS) y contiene un residuo de histidina conservado en dominios PPDK y PPS. Durante la transferencia de residuos de fosfato del ATP a alfa-1,4-glucanos (almidón) se forma una proteína R1 fosforilada como producto intermedio estando presente un residuo de fosfato unido covalentemente al residuo de histidina conservado en el dominio PPDK o PPS (Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532).

Las secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos correspondientes a éstos que codifican una proteína R1 se describen a partir de diversas especies tales como, por ejemplo, patata (documento WO 97 11188, registro de GenBank: AY027522, Y09533), trigo (documentos WO 00 77229, US 6.462.256, registro de GenBank: AAN93923, registro de GenBank: AR236165), arroz (registro de GenBank: AAR61445, registro de GenBank: AR400814), maíz (registro de GenBank: AAR61444, registro de GenBank: AR400813), soja (registro de GenBank: AAR61446, registro de GenBank: AR400815), cítrico (registro de GenBank: AY094062) y *Arabidopsis* (registro de GenBank: AF312027).

Las plantas de trigo que presentan una elevada actividad de una proteína R1 como resultado de la sobreexpresión de un gen R1 de patata se describen en el documento WO 02 34923. En comparación con las plantas naturales correspondientes en las que no pudo detectarse fosfato de almidón, estas plantas sintetizan un almidón que tiene cantidades significativas de fosfato de almidón en la posición C-6 de las moléculas de glucosa.

Hasta la fecha no se han descrito otras proteínas que catalicen una reacción que introduzca grupos fosfato unidos covalentemente en el almidón. Tampoco se conocen enzimas que introduzcan preferentemente grupos fosfato en la posición C-3 y/o la posición C-2 de las moléculas de glucosa de almidón. Por tanto, aparte de aumentar el contenido de fosfato de almidón en las plantas, no hay rutas disponibles para influir específicamente la fosforilación de almidón en plantas, modificando la distribución de fosfato dentro del almidón sintetizado por plantas y/o aumentando adicionalmente el contenido de fosfato de almidón.

ES 2 344 113 T3

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos y medios para producir plantas que sinteticen un almidón modificado que tenga un contenido elevado de fosfato y/o distribución de fosfato modificada, además de proporcionar células vegetales y/o plantas que sinteticen un almidón modificado tal.

5 Este problema se resuelve por las realizaciones descritas en las reivindicaciones.

La presente invención describe un procedimiento para identificar una proteína que tiene una elevada actividad de unión hacia alfa-1,4-glucanos fosforilados, en comparación con alfa-1,4-glucanos no fosforilados.

10 Un procedimiento tal se describe más adelante en Procedimientos generales, Punto 8.

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, en el que

- 15 a) se incuban extractos de proteína con alfa-1,4-glucanos fosforilados,
- b) se disuelven proteínas específicamente unidas a los alfa-1,4-glucanos fosforilados de la Etapa a),
- 20 c) las proteínas obtenidas según la Etapa b) se incuban respectivamente con
- i) ATP y alfa-1,4-glucanos fosforilados y
- ii) ATP y alfa-1,4-glucanos no fosforilados en preparaciones separadas entre sí,
- 25 d) se examina el alfa-1,4-glucano respectivo obtenido después de la incubación en la Etapa c) i o la Etapa c) ii para la introducción de otros grupos fosfato y
- e) se identifican proteínas que en la preparación de la incubación según c) i han introducido cantidades significativas de grupos fosfato en alfa-1,4-glucanos y en la preparación de la incubación según c) ii han introducido cantidades no significativas de grupos fosfato en alfa-1,4-glucanos.
- 30

El término “actividad de unión elevada” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como un aumento de la afinidad de una proteína por un primer sustrato en comparación con un segundo sustrato, es decir, que la cantidad de proteína que bajo las mismas condiciones de incubación se une cada vez más a un primer sustrato en comparación con un segundo sustrato presenta una elevada actividad de unión por el primer sustrato.

35

El término “alfa-1,4-glucano” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como un glucano que está constituido principalmente por bloques de construcción de glucosa ligados por alfa-1,4, pero también puede contener enlaces alfa-1,6 como ramas. Un alfa-1,4-glucano contiene preferentemente hasta el 15%, particularmente preferentemente hasta el 10% y especialmente preferentemente hasta el 5% de enlaces alfa-1,6.

40

El término “fosfato de almidón” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como grupos fosfato unidos covalentemente a las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano.

45

El término “alfa-1,4-glucano no fosforilado” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como un alfa-1,4-glucano que contiene cantidades no detectables de fosfato de almidón.

El término “alfa-1,4-glucano fosforilado” o “P-alfa-1,4-glucano” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como un alfa-1,4-glucano que contiene fosfato de almidón.

50

Básicamente, una proteína identificable usando un procedimiento según la invención puede proceder de cualquier organismo. La proteína procede preferentemente de organismos vegetales, preferentemente de plantas almacenadoras de almidón (maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, boniato, sagú, judía mungo, banana, guisante, *Arabidopsis*, *Curcuma* o sorgo), particularmente preferentemente de plantas de patata, cebada, remolacha azucarera, *Arabidopsis* o arroz y especialmente preferentemente plantas de *Arabidopsis* o arroz.

55

En otra realización del procedimiento según la invención, los extractos de proteína proceden de células eucariotas, preferentemente de células vegetales, particularmente preferentemente de células de plantas almacenadoras de almidón (maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, boniato, sagú, judía mungo, banana, guisante, *Arabidopsis*, cúrcuma o sorgo).

60

Básicamente, todos los alfa-1,4-glucanos no fosforilados son adecuados para incubar extractos de proteína con alfa-1,4-glucanos no fosforilados para implementar el procedimiento según la invención. Preferentemente se usa un almidón vegetal no fosforilado, particularmente preferentemente almidón de trigo y especialmente preferentemente almidón de hojas granular del mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* (Tien-Shin Yu y col., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918).

65

ES 2 344 113 T3

Los procedimientos para aislar almidón, por ejemplo, de plantas son conocidos para el experto en la materia. Todos los procedimientos conocidos para el experto en la materia son básicamente adecuados para aislar almidón no fosforilado de especies vegetales apropiadas. Preferentemente se usa el procedimiento para aislar alfa-1,4-glucanos no fosforilados descrito más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 2).

Básicamente, todos los alfa-1,4-glucanos que contienen fosfato de almidón son adecuados para incubar extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos para implementar el procedimiento según la invención. Los almidones químicamente fosforilados también pueden usarse en este caso. Para la incubación con extractos de proteína se usan preferentemente P-alfa-1,4-glucanos vegetales, particularmente preferentemente un almidón vegetal enzimáticamente fosforilado posteriormente, especialmente preferentemente un almidón granular vegetal enzimáticamente fosforilado posteriormente que se aisló a partir de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*.

Una fosforilación enzimática posterior de alfa-1,4-glucanos no fosforilados pueden llevarse a cabo con cualquier enzima que transfiera residuos de fosfato a alfa-1,4-glucanos no fosforilados mediante introducción de enlaces covalentes. Para este fin se usa preferentemente una enzima que tiene la actividad de una glucano dicinasa (proteína R1, E.C.: 02.07.09.4) (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532). Para la fosforilación enzimática posterior de alfa-1,4-glucanos no fosforilados se usa preferentemente una proteína R1 purificada, especialmente una proteína R1 de patata producida por expresión heteróloga en *E. coli*.

Los procedimientos para purificar una proteína R1 producida recombinantemente por expresión en *E. coli* se describen en Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171) y Mikkelsen y col. (2003, Biochemical Journal 377, 525-532).

Cuando se implementa el procedimiento según la invención, los complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína pueden formarse por incubación de extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos y/o alfa-1,4-glucanos no fosforilados como resultado de la unión de proteínas a P-alfa-1,4-glucanos y pueden formarse complejos de alfa-1,4-glucano no fosforilado-proteína como resultado de la unión de proteínas a alfa-1,4-glucanos no fosforilados.

Las proteínas presentes en los complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína o complejos de alfa-1,4-glucano no fosforilado-proteína cuando se implementa el procedimiento según la invención se disuelven, es decir, se rompe la unión de las proteínas en cuestión con respecto a los alfa-1,4-glucanos respectivos. Así se obtienen las proteínas de unión a P-alfa-1,4-glucano disueltas y/o las proteínas de unión a alfa-1,4-glucano no fosforilado disueltas. Básicamente pueden usarse todas las sustancias que previenen la interacción de proteína-alfa-1,4-glucano existente para romper la unión entre los alfa-1,4-glucanos en cuestión y las proteínas unidas a ellos. Para este fin se prefieren disoluciones de tampón que contiene detergentes, particularmente preferentemente disoluciones de tampón que contienen laurilsulfato de sodio (SDS), especialmente preferentemente la disolución de tampón descrita adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 8).

Puede usarse cualquier procedimiento que permita separar los alfa-1,4-glucanos de las sustancias disueltas tales como proteínas y, por ejemplo, ATP de la preparación de la incubación, para separar alfa-1,4-glucanos de ATP y/o proteínas. Si se usan alfa-1,4-glucanos solubles para la incubación de extractos de proteína con alfa-1,4-glucanos cuando se implementa el procedimiento según la invención, la separación puede implicar, por ejemplo, una precipitación de los alfa-1,4-glucanos, preferentemente una precipitación con disolventes adecuados, particularmente preferentemente una precipitación con alcoholes. La separación de alfa-1,4-glucanos mediante unión a sustancias que unen selectivamente alfa-1,4-glucanos (por ejemplo, concavalina A) también es adecuada para separar alfa-1,4-glucanos de sustancias en disolución.

Para la separación de alfa-1,4-glucanos aquí se usa preferentemente la filtración, particularmente preferentemente centrifugación, especialmente preferentemente el procedimiento descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 8).

Cuando se implementa el procedimiento según la invención, todos los procedimientos conocidos para el experto en la materia tales como procedimientos cromatográficos, por ejemplo, precipitación y posterior centrifugación del alfa-1,4-glucano, digestión enzimática de los alfa-1,4-glucanos, filtración en gel, etc. que conducen a la separación de proteínas solubles de alfa-1,4-glucanos pueden usarse básicamente para separar proteínas solubles de los alfa-1,4-glucanos. Las proteínas de unión a P-alfa-1,4-glucano disueltas y/o proteínas de unión a alfa-1,4-glucano no fosforilado disueltas se separan preferentemente de los alfa-1,4-glucanos usados en el procedimiento según la invención con la ayuda de centrifugación.

En otra realización de la presente invención, cuando se implementa el procedimiento según la invención, la centrifugación usando una almohadilla Percoll se usa para separar complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína de proteínas no contenidas en los complejos en cuestión.

El procedimiento descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 8) se usa preferentemente aquí para separar las proteínas no unidas a los alfa-1,4-glucanos. Después de llevarse a cabo la centrifugación usando una almohadilla Percoll, las proteínas no unidas a P-alfa-1,4-glucanos o no unidas a alfa-1,4-glucanos no fosforilados se localizan en el sobrenadante del medio de centrifugación, mientras que los complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína o complejos de alfa-1,4-glucano no fosforilado-proteína están presentes en el sedimento sedimentado. El sobrenadante del medio de centrifugación se desecha y el sedimento se lava preferentemente con el tampón usado para

la incubación para más purificación de los complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína o complejos de alfa-1,4-glucano no fosforilado-proteína. El sedimento se lava preferentemente una vez, particularmente preferentemente dos veces.

5 Básicamente puede usarse cualquier tipo de extracto de proteína para llevar a cabo el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato. Aquí pueden participar tanto los llamados extractos brutos de proteína como los extractos de proteína parcialmente o completamente purificada. Por tanto, por ejemplo, es ventajoso usar proteínas que se identificaron usando un procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una elevada actividad de unión hacia alfa-1,4-glucanos fosforilados en comparación con alfa-1,4-glucanos no fosforilados. Las proteínas que se identificaron usando un procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una elevada actividad de unión hacia alfa-1,4-glucanos fosforilados en comparación con alfa-1,4-glucanos no fosforilados pueden usarse, por ejemplo, omitiendo las etapas de procedimiento a) y b) directamente en la Etapa c) del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato.

15 Básicamente son adecuados todos los procedimientos generales conocidos para el experto en la materia tal como se describen, por ejemplo, en Scopes (1993, Protein Purification: Principles & Practice, ISSN: 038794072) para producir extractos de proteína de células procariotas o eucariotas para implementar el procedimiento según la invención. Sin embargo, para implementar el procedimiento se usan preferentemente procedimientos para el aislamiento de proteínas vegetales (por ejemplo, descritos en Bollag y col., 1996, en: "Protein Methods", 2ª edición, Wiley, ISBN: 0-4,71-11837-0; Dennison, 2003, en: "A Guide to Protein Isolation" 2ª edición, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1224-1), particularmente preferentemente el procedimiento descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 1).

25 La incubación de extractos de proteína para implementar el procedimiento según la invención con P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados tiene lugar en preparaciones separadas. Las preparaciones relevantes para P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados se tratan por separado entre sí durante la implementación de todo el procedimiento. En este caso van a incubarse respectivamente las mismas cantidades de extracto de proteína con respectivamente las mismas cantidades de P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados. Preferentemente se incuban respectivamente 1 a 10 mg, particularmente preferentemente 3 a 7 mg y especialmente preferentemente 4 a 6 mg de extracto de proteína con P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados. La cantidad de P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados usada es preferentemente respectivamente 10 a 100 mg, particularmente preferentemente 30 a 70 mg y especialmente preferentemente 45 a 55 mg.

35 Pueden usarse diversos tampones para la incubación de extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos para implementar el procedimiento según la invención. Básicamente son adecuados todos los tampones que permiten la unión de las proteínas que van a identificarse al sustrato en cuestión. Preferentemente se usa el tampón descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 1).

40 El término "proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato" debe entenderse conjuntamente con la presente invención como una proteína que introduce residuos de fosfato covalentemente en P-alfa-1,4-glucanos, es decir, usa P-alfa-1,4-glucanos como sustrato para la transferencia de residuos de fosfato, mientras que los P-alfa-1,4-glucanos no fosforilados no se fosforilan por una proteína en cuestión, es decir, los P-alfa-1,4-glucanos no fosforilados no sirven como sustrato para una reacción de fosforilación.

45 En otra realización, el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se refiere a un procedimiento para identificar una proteína que usa ATP como sustrato adicional.

50 En esta realización de la presente invención, el ATP se usa como un sustrato adicional (co-sustrato) por la proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, es decir, la proteína en cuestión transfiere un residuo de fosfato de ATP a un P-alfa-1,4-glucano ya fosforilado.

55 La actividad de una proteína que usa ATP como co-sustrato para la transferencia de residuos de fosfato a P-alfa-1,4-glucanos puede demostrarse, es decir, usando ATP que contiene un residuo de fosfato marcado (ATP marcado). Se prefiere ATP en el que el residuo de fosfato está específicamente marcado en la posición beta, es decir, en el que sólo el residuo de fosfato en la posición beta tiene una marca. Preferentemente se usa ATP radiactivamente marcado, particularmente preferentemente ATP en el que el residuo de fosfato está específicamente radiactivamente marcado en la posición beta, y especialmente preferentemente ATP en el que el residuo de fosfato está específicamente marcado con ³³P en la posición beta. Si se incubaba una proteína fosforilante de P-alfa-glucano con P-alfa-1,4-glucanos en presencia de ATP marcado, entonces puede detectarse el fosfato marcado unido covalentemente al P-alfa-1,4-glucano. En este caso, los P-alfa glucanos usados para la reacción de fosforilación pueden estar presentes tanto en forma de almidón vegetal que contiene fosfato de almidón (almidón de patata, almidón de *Curcuma armada*, *C. zedoaria*, *C. longa*, arroz, judías mungo, tapioca, etc.) como también en forma de P-alfa-1,4-glucanos enzimáticamente fosforilados o P-alfa-1,4-glucanos químicamente fosforilados. Preferentemente se usa almidón de hojas de *Arabidopsis thaliana*, particularmente preferentemente almidón de mutantes *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* enzimáticamente fosforilados por medio de una proteína R1.

ES 2 344 113 T3

Pueden demostrarse residuos de fosfato marcados que pueden incorporarse en un P-alfa-1,4-glucano por una proteína, por ejemplo, después de la separación del P-alfa-1,4-glucano marcado (por ejemplo, mediante precipitación de los alfa-1,4-glucanos por medio de etanol, filtración, procedimientos cromatográficos, centrifugación, etc.) del resto de la mezcla de reacción y posterior detección de los residuos de fosfato marcados en la fracción de P-alfa-1,4-glucanos relevantes. Al mismo tiempo, los residuos de fosfato marcados unidos en la fracción de P-alfa-1,4-glucanos pueden demostrarse, por ejemplo, determinando la cantidad de radiactividad presente en la fracción de P-alfa-1,4-glucanos (por ejemplo, por medio de contadores de centelleo).

En otra realización, el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se refiere a un procedimiento en el que la proteína que tiene actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos usa P-almidón como sustrato. Se prefiere particularmente el almidón aislado de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*, que posteriormente se fosforiló enzimáticamente. Para implementar esta realización preferida del procedimiento según la invención, un almidón fosforilado se usa por consiguiente en las etapas de procedimiento c) i) y un almidón no fosforilado se usa en la etapa de procedimiento c) ii).

Así es posible identificar proteínas que fosforilan P-almidón. Tales proteínas son especialmente adecuadas para modificar almidón en organismos vegetales por medio de manipulación genética de plantas apropiadas.

En otra realización, el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se refiere a un procedimiento para identificar una proteína en el que la proteína se produce como un producto intermedio fosforilado durante la transferencia de un residuo de fosfato a un P-alfa-1,4-glucano. Dicho producto intermedio se forma preferentemente por autofosforilación de la proteína en cuestión.

Una proteína fosforilada que se produce como un producto intermedio como resultado de la fosforilación mediada por proteínas de P-alfa-1,4-glucanos puede demostrarse como se describe en Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171) para una proteína R1.

Con el fin de detectar la presencia de un producto intermedio autofosforilado, una proteína se incuba primero en ausencia de glucanos con ATP marcado, preferentemente con ATP marcado específicamente en la posición de beta-fosfato, particularmente preferentemente con ATP marcado específicamente con ³³P en la posición de beta-fosfato durante 15 a 45 minutos, particularmente preferentemente durante 20 a 40 minutos y especialmente preferentemente durante 25 a 30 minutos en una preparación de reacción 1. Paralelamente a ésta, una preparación de reacción 2 que contiene cantidades correspondientes de ATP no marcado en lugar de ATP marcado se incuba bajo por lo demás las mismas condiciones. Entonces, el ATP no marcado se añade a la mezcla de reacción 1 en exceso y una mezcla de ATP no marcado y ATP marcado (la misma cantidad de ATP marcado que se usa previamente en la mezcla de reacción 1 y la misma cantidad de ATP no marcado que se añade en exceso a la mezcla de reacción 1) se añade a la mezcla de reacción 2 y se incuba durante otros 1 minuto a 5 minutos, preferentemente durante 2 a 5 minutos y especialmente preferentemente durante 3 minutos antes de añadirse P-alfa-1,4-glucanos a una Parte A de la mezcla de reacción 1 (Parte 1A) o a una Parte A de la mezcla de reacción 2 (Parte 2A). La reacción en la Parte 1B y Parte 2B restante de la mezcla de reacción se detiene desnaturizando la proteína. La Parte B de la mezcla de reacción puede detenerse mediante los procedimientos conocidos para el experto en la materia que conducen a la desnaturización de proteínas, preferentemente añadiendo laurilsulfato de sodio (SDS). La Parte 1A y la Parte 2A de las mezclas de reacción se incuban durante al menos otros 10 minutos antes de que estas reacciones también se detengan. Los alfa-1,4-glucanos presentes en la Parte A o la Parte B de las mezclas de reacción respectivas se separan del resto respectivo de las mezclas de reacción. Si los alfa-1,4-glucanos respectivos se separan, por ejemplo, por centrifugación, entonces al completarse la centrifugación los alfa-1,4-glucanos de la Parte A o la Parte B respectiva de la mezcla de reacción van a encontrarse en el sedimento sedimentado, y las proteínas en las mezclas de reacción respectivas van a encontrarse en el sobrenadante de la centrifugación respectiva. El sobrenadante de la Parte 1A o 2A y de la Parte 1B o 2B de la mezcla de reacción puede entonces analizarse, por ejemplo, respectivamente en una electroforesis en gel de acrilamida desnaturizante, seguida de autorradiografía del gel de acrilamida obtenido. Para cuantificar la cantidad de proteínas radiactivamente marcadas que se han separado por medio de electroforesis en gel de acrilamida puede usarse el llamado procedimiento de, por ejemplo, “detección y cuantificación de la radiactividad” conocido para el experto en la materia. Si la autorradiografía o el análisis por medio del “sistema de detección y cuantificación de la radiactividad” de proteínas en el sobrenadante de centrifugación de la Parte B de la mezcla de reacción 1 muestra una señal significativamente aumentada en comparación con el sobrenadante de centrifugación de la Parte A de la mezcla de reacción 1, entonces esto muestra que una proteína que media en una fosforilación de alfa-glucanos se produce como producto intermedio autofosforilado. Las Partes A y B de la mezcla de reacción 2 sirven de control y, por tanto, no deben presentar una señal significativamente aumentada en el sobrenadante de centrifugación en la autorradiografía o en el análisis por medio del “sistema de detección y cuantificación de la radiactividad”.

Además, los alfa-1,4-glucanos de la Parte A respectiva de las mezclas de reacción 1 y 2 restantes en el sedimento sedimentado respectivo pueden investigarse, si es necesario después del lavado posterior de los alfa-1,4-glucanos respectivos, para la presencia de fosfato de almidón que tiene una marca correspondiente al ATP marcado usado. Si los alfa-1,4-glucanos de la Parte A de la mezcla de reacción 1 contienen residuos de fosfato marcados, y si la autorradiografía del sobrenadante de centrifugación de la Parte B de la mezcla de reacción 1 muestra una señal significativamente aumentada en la autorradiografía en comparación con el sobrenadante de centrifugación de la Parte A de la mezcla

de reacción 1, entonces esto muestra que una proteína que media en una fosforilación de alfa-glucanos está presente como producto intermedio autofosforilado. Las Partes A y B de la mezcla de reacción 2 sirven de control y, por tanto, no deben presentar una señal significativamente aumentada para alfa-1,4-glucanos marcados con ³³P en el sedimento sedimentado que contiene alfa-1,4-glucanos.

En otra realización, el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se refiere a un procedimiento para identificar una proteína que introduce preferentemente enlaces monoéster de fosfato en la posición C-2 o en la posición C-3, particularmente preferentemente en la posición C-3 de una molécula de glucosa de un P-alfa-1,4-glucano.

Qué posiciones de los átomos de carbono (C-2, C-3 o C-6) de los monómeros de glucosa en el P-alfa-1,4-glucano están preferentemente fosforiladas por una proteína o extracto de proteína puede determinarse, por ejemplo, analizando los P-alfa-1,4-glucanos fosforilados por una proteína o extracto de proteína como se describe en Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171). Para este fin, los P-alfa-1,4-glucanos adicionalmente fosforilados por una proteína o extracto de proteína se hidrolizan usando ácido y luego se analizan por medio de cromatografía de intercambio aniónico.

Los P-alfa-1,4-glucanos fosforilados por una proteína se analizan preferentemente por medio de RMN con el fin de determinar qué posiciones de los átomos de carbono (C-2, C-3 o C-6) de los monómeros de glucosa están fosforilados en P-alfa-1,4-glucano.

Las proteínas del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato que se obtuvieron según la etapa de procedimiento b) se incuban en la Etapa c) del procedimiento según la invención en preparaciones separadas que contienen ATP y P-alfa-1,4-glucano o ATP y alfa-1,4-glucano no fosforilado. Para implementar el procedimiento según la invención es preferible usar ATP que contiene un residuo de fosfato marcado, particularmente preferentemente un residuo de fosfato específicamente marcado en la posición beta, especialmente un residuo de fosfato específicamente radiactivamente marcado en la posición beta.

La incubación de proteínas disueltas según la invención con ATP y P-alfa-1,4-glucanos según la etapa de procedimiento c) i o alfa-1,4-glucanos no fosforilados según la Etapa c) ii del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato tiene lugar preferentemente a una temperatura de 20°C a 30°C, particularmente preferentemente 23°C a 27°C y especialmente preferentemente 24°C a 26°C y se lleva a cabo durante una duración de al menos 15 minutos, preferentemente durante al menos 20 minutos, particularmente preferentemente durante al menos 30 minutos. La cantidad de ATP usada en este caso es preferentemente al menos 0,05 μM, particularmente preferentemente al menos 3 μM y especialmente preferentemente al menos 5 μM. La concentración del P-alfa-1,4-glucano usado o el alfa-1,4-glucano no fosforilado usado en este caso es preferentemente al menos 1 mg/ml, particularmente preferentemente al menos 10 mg/ml y especialmente preferentemente al menos 25 mg/ml. Después de completarse la incubación pueden detenerse las reacciones de extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados. La mezcla de reacción respectiva puede detenerse mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia que llevan a desnaturalizar proteínas, preferentemente añadiendo laurilsulfato de sodio y calentando durante 5 minutos a 95°C. Cuando se implementa la Etapa c) i o c) ii del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, respectivamente las mismas condiciones de incubación para las preparaciones de incubación respectivas deben llevarse a cabo durante la incubación de proteínas con P-alfa-1,4-glucanos o alfa-1,4-glucanos no fosforilados.

El P-alfa-1,4-glucano obtenido según la etapa de procedimiento c) i o el alfa-1,4-glucano no fosforilado obtenido según la etapa de procedimiento c) ii después de implementar el procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta una actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se investiga para la introducción de residuos de fosfato adicionales. Con el fin de determinar si los residuos de fosfato se introdujeron adicionalmente en los alfa-1,4-glucanos en cuestión mediante las etapas de procedimiento c) i y/o c) ii puede usarse cualquier procedimiento que sea posible para la detección específica del marcado usado para el ATP marcado usado en las etapas de procedimiento c) i y c) ii. Si, por ejemplo, el ATP radiactivamente marcado se usa en las etapas de procedimiento c) i o c) ii, esto puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos para el experto en la materia para la detección de elementos radiactivos tales como, por ejemplo, autorradiografía, medición de la radiactividad por medio de equipos adecuados (por ejemplo, contadores de centelleo, "sistemas de detección y cuantificación de la radiactividad", etc.).

Las proteínas usadas en la etapa de procedimiento b) del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato que han introducido cantidades significativas de residuos de fosfato en P-alfa-1,4-glucanos en la Etapa c) i, pero en comparación con esto, han introducido cantidades no significativas de residuos de fosfato en alfa-1,4-glucanos no fosforilados en la Etapa c) ii, pueden identificarse mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia.

El término “cantidades significativas” debe entenderse conjuntamente con la presente invención como una cantidad que es al menos dos veces, preferentemente al menos cuatro veces, particularmente preferentemente al menos seis veces y especialmente preferentemente al menos ocho veces superior a la cantidad determinada en experimentos de control correspondientes.

En este caso, las preparaciones de incubación que contienen extractos de proteína completamente inactivados o extractos de no proteína en lugar de extractos de proteína nativa pueden usarse como experimentos de control. Los extractos de proteína en los que no puede detectarse más actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos van a entenderse como “completamente inactivados”.

La identificación de proteínas cuando se implementa un procedimiento para identificar una proteína que presenta una elevada actividad de unión hacia alfa-1,4-glucanos fosforilados en comparación con alfa-1,4-glucanos no fosforilados puede hacerse usando procedimientos conocidos para el experto en la materia tales como, por ejemplo, determinando la secuencia de aminoácidos de las proteínas en cuestión usando procedimientos que comprenden degradación de Edmann, análisis de masas usando EM-MALDI-TOF (espectroscopía de masas-desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo), seguido de comparaciones con bases de datos que contienen perfiles de masas de proteínas, secuenciación de aminoácidos por medio de análisis de Q-TOF o análisis de TOF/TOF, etc. Las proteínas en cuestión se identifican preferentemente por medio de análisis de EM-Q-TOF-EM, especialmente preferentemente las proteínas se identifican usando el procedimiento descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 10).

Si se determinan proteínas por medio de EM-MALDI-TOF, seguido de comparaciones con bases de datos que contienen perfiles de masas de proteínas, las proteínas en cuestión se digieren primero enzimáticamente de antemano antes de analizar las masas individuales de los fragmentos de proteínas (péptidos) obtenidos de la digestión por medio de EM-MALDI-TOF. Se obtiene un perfil de masas de la proteína en cuestión. Estos perfiles de masas son muy específicos para una proteína ya que las proteasas específicas de secuencia se usan para la digestión de proteínas que sólo escinden un enlace de péptido cuando está contenido en una sucesión de secuencias de aminoácidos específica. Si la secuencia de aminoácidos especial que sirve de secuencia de reconocimiento para una cierta proteasa es conocida, puede crearse un perfil de masas teórico a partir de una secuencia de aminoácidos arbitraria calculando la masa de los péptidos que se producirían después de la digestión de la secuencia de aminoácidos con una proteasa específica. Por tanto, comparando perfiles de masas de proteínas desconocidas obtenidas en realidad usando EM-MALDI-TOF con los perfiles de masas teóricamente determinados en bases de datos correspondientes también pueden determinarse secuencias de aminoácidos.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, los complejos de P-alfa-1,4-glucano-proteína obtenidos incubando extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos según la Etapa a) se separan de las proteínas no unidas a los alfa-1,4-glucanos en cuestión.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, las proteínas disueltas según la Etapa b) del procedimiento según la invención se separan de los P-alfa-1,4-glucanos usados en la Etapa a).

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, las proteínas de unión a P-alfa-1,4-glucano disueltas, obtenidas cuando se implementa el procedimiento según la invención según la etapa de procedimiento b), se separan entre sí.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato, los glucanos obtenidos por incubación de extractos de proteína con P-alfa-1,4-glucanos según la Etapa c) i) o con alfa-1,4-glucanos no fosforilados según la Etapa c) ii) se separan de las proteínas presentes en la mezcla de reacción y/o el ATP marcado presente en la mezcla de reacción.

Para la separación de alfa-1,4-glucanos aquí se usa preferentemente filtración, particularmente preferentemente centrifugación, especialmente preferentemente el procedimiento descrito adicionalmente más adelante (véase Procedimientos generales, Punto 8). Después de llevarse a cabo la centrifugación usando una almohadilla Percoll, las sustancias solubles de las mezclas de reacción se localizan en el sobrenadante del medio de centrifugación, mientras que los alfa-1,4-glucanos están presentes en el sedimento sedimentado.

Otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato se refiere a un procedimiento para identificar una proteína que tiene un peso molecular derivado de la secuencia de aminoácidos de 120 kDa a 145 kDa, preferentemente 120 kDa a kDa, particularmente preferentemente 125 kDa a 140 kDa, especialmente preferentemente 130 kDa a 135 kDa.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína, después de la identificación de las proteínas en cuestión se determinan secuencias de aminoácidos que codifican estas proteínas.

Las secuencias de aminoácidos pueden determinarse según la invención usando cualquier procedimiento conocido para el experto en la materia. Tales procedimientos se describen suficientemente en la bibliografía especializada (por ejemplo, en *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, 2000, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0-471-32249-0; *Protein Sequencing Protocols*, 2002, Smith (Ed.), edición: 2ª, Humana Press, ISBN: 0-89603-975-7) y son básicamente adecuados para implementar el procedimiento según la invención. Por tanto, la purificación y/o la secuenciación de proteínas se llevan a cabo como un servicio por contrato por muchas empresas (por ejemplo, Eurogentec, Searing, Bélgica).

Si es necesario, las proteínas usando un procedimiento según la invención para identificar una proteína pueden someterse a purificación y/o concentración adicional antes de determinar su secuencia de aminoácidos. Los procedimientos para la purificación y/o concentración de proteínas se describen suficientemente en la bibliografía especializada (por ejemplo, en *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, vol.182 1990, Deutscher, Murray P. (Ed.), Academic Press, ISBN: 0-12-182083-1; *Isolation and Purification of Proteins*: Hatti-Kaul, 2003, Rajni (Ed.); Mattiasson, Bo (Edt), Marcel Dekker Inc, ISBN:0-8247-0726-5, *Protein Purification Techniques: A Practical Approach*. Roe, 2001, Simon (Ed.). The Practical Approach Series, 244ª edición: 2ª Oxford Univ Press, ISBN: 0-19-963673-7) y son básicamente adecuados para implementar el procedimiento según la invención.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína se usan procedimientos según la invención para identificar una proteína cuya secuencia de aminoácidos codificante tiene un dominio de fosfohistidina (Tien-Shin Yu y col., 2001, *Plant Cell* 13, 1907-1918). El dominio de fosfohistidina tiene preferentemente una identidad de al menos el 50% con la secuencia de aminoácidos del dominio de fosfohistidina de la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* especificada en la SEQ ID NO 5, en particular de al menos el 60%, preferentemente de al menos el 70% y particularmente preferentemente de al menos el 80% y especialmente preferentemente de al menos el 90%.

En otra realización del procedimiento según la invención para identificar una proteína se usan procedimientos según la invención para identificar una proteína cuya secuencia de aminoácidos codificante tiene un dominio de fosfohistidina (Tien-Shin Yu y col., 2001, *Plant Cell* 13, 1907-1918) en el que el dominio de fosfohistidina contiene dos histidinas.

Usando el procedimiento según la invención pueden identificarse proteínas que presentan actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requieren alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato.

Por tanto, las proteínas obtenidas mediante procedimientos según la invención para identificar una proteína también son el objeto de la presente invención.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas identificadas usando un procedimiento según la invención puede determinarse usando procedimientos conocidos para el experto en la materia, como ya se ha establecido anteriormente.

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucano pueden identificarse, por ejemplo, examinando bases de datos tales como aquellas puestas a disposición, por ejemplo por EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) o NCBI (Centro nacional para información biotecnológica, "National Center for Biotechnology Information", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En este caso, una o una pluralidad de secuencias de aminoácidos determinadas cuando se implementa el procedimiento según la invención se predefine como una llamada consulta. Esta secuencia de consulta se compara entonces por medio de programas informáticos estadísticos con secuencias que están contenidas en las bases de datos seleccionadas. Tales consultas de bases de datos (por ejemplo, búsquedas en Blast o Fasta) son conocidas para el experto en la materia y pueden llevarse a cabo por diversos proveedores.

Si se lleva a cabo una consulta de bases de datos tal, por ejemplo en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), entonces deberán usarse los parámetros estándar que se especifican para la averiguación de comparaciones particulares. Para las comparaciones de secuencias de proteínas (blastp), éstos son los siguientes parámetros: Entrada límite = no activado; filtro = baja complejidad activada; valor esperado = 10; tamaño de palabra = 3; matriz = BLOSUM62; costes de huecos: existencia = 11, extensión = 1.

Durante una búsqueda de bases de datos tal, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos determinadas en la presente invención cuando se implementa el procedimiento según la invención pueden usarse como una secuencia de consulta con el fin de identificar moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos.

Usando el procedimiento descrito también es posible identificar moléculas de ácidos nucleicos y/o secuencias de aminoácidos que tienen un alto grado de identidad con moléculas de ácidos nucleicos y/o proteínas que pueden obtenerse usando el procedimiento según la invención y que codifican una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos.

Los procedimientos son conocidos para el experto en la materia con los que, a partir de las secuencias de aminoácidos, puede identificarse ácidos nucleicos que codifican éstas (véanse, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª edición (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons; 5ª edición (2002), ISBN:

0471250929). A partir de las secuencias de aminoácidos que codifican una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos, los ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos en cuestión pueden derivarse según el código genético. El experto en la materia sabe que los oligonucleótidos degenerados obtenidos a partir del código genético también pueden usarse básicamente para identificar ácidos nucleicos. Entonces pueden sintetizarse los oligonucleótidos que constituyen secuencias derivadas de las secuencias de aminoácidos obtenidas cuando se implementa el procedimiento según la invención. Estos oligonucleótidos sintéticos pueden usarse para identificar ácidos nucleicos que codifican las proteínas a partir de cuya secuencia de aminoácidos se derivaron las secuencias de oligonucleótidos correspondientes. Esto puede lograrse, por ejemplo, buscando en bibliotecas génicas, usándose dichos oligonucleótidos sintéticos como sondas marcadas en forma de sondas de hibridación. Una posibilidad adicional para identificar ácidos nucleicos que codifican una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos implica usar los oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de aminoácidos obtenidas cuando se implementa el procedimiento según la invención buscando en bibliotecas génicas usando procedimientos basados en PCR en los que dichos oligonucleótidos sintéticos se usan como llamados “cebadores”. Las bibliotecas génicas pueden estar presentes, por ejemplo, en forma de cósmidos, fagémidos, plásmidos, YAC o BAC. Las bibliotecas de ADN pueden contener tanto ADN genómico como también ADNc. Para los procedimientos de búsqueda basados en PCR cuando se usa la llamada RT (transcripción inversa) PCR también es posible usar ARNm. Los ácidos nucleicos para la implementación del procedimiento según la invención para identificar un ácido nucleico en bibliotecas génicas o presente como ARNm pueden proceder en este caso de cualquier organismo, preferentemente proceden de eucariotas, particularmente preferentemente de plantas, especialmente preferentemente de cereales.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un ácido nucleico que codifica una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucano, en el que

- a) se identifica una proteína usando un procedimiento según la invención para identificar una proteína,
- b) se producen anticuerpos que reaccionan específicamente con la proteína identificada según la Etapa a) y
- c) se identifican ácidos nucleicos usando los anticuerpos determinados según la Etapa b).

Los procedimientos para preparar anticuerpos que reaccionan específicamente con una cierta proteína, es decir, que se unen específicamente a dicha proteína, son conocidos para el experto en la materia (véase, por ejemplo, Lottspeich y Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlín, ISBN 3-8274-0041-4). La preparación de tales anticuerpos es ofrecida por algunas compañías (por ejemplo, Eurogentec, Bélgica) como un servicio por contrato.

Los procedimientos para identificar ácidos nucleicos usando anticuerpos, frecuentemente designados “inmunocribado” en la bibliografía especializada (véase, por ejemplo Lottspeich y Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum Akad. Verlag., Heidelberg, Berlín, ISBN 3-8274-0041-4) son asimismo conocidos para el experto en la materia y se describen en detalle en la bibliografía. Las llamadas bibliotecas génicas de expresión pueden usarse, por ejemplo, para implementar tales procedimientos en los que los clones obtenidos se buscan para la expresión de una cierta proteína con la ayuda de un anticuerpo específico dirigido contra esta proteína. Pueden comprarse los materiales para preparar tales bibliotecas génicas de expresión, que también contienen instrucciones referentes al procedimiento para la preparación, y también procedimientos para buscar tales bancos de genes de expresión (por ejemplo, Stratagene).

Usando procedimientos según la invención es posible identificar ácidos nucleicos que codifican proteínas que presentan elevada actividad de unión hacia P-alfa-1,4-glucanos en comparación con alfa-1,4-glucanos no fosforilados y/o que presentan actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requieren alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato.

Por tanto, los ácidos nucleicos obtenidos mediante procedimientos según la invención para identificar un ácido nucleico también son el objeto de la presente invención.

Un plásmido (A.t.-OK1-pGEM) que contiene un ADNc que codifica una proteína según la invención (A.t.-OK1) de *Arabidopsis thaliana* se depositó el 08/03/2004 bajo el número DSM16264 y un plásmido (pM150) que contiene un ADNc que codifica adicionalmente proteína según la invención (O.s.-OK1) de *Oryza sativa* se depositó el 24/03/2004 bajo el número DSM16302 bajo el Tratado de Budapest en la Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania.

Se encontró sorprendentemente que las células vegetales o plantas genéticamente modificadas que presentan una elevada actividad de una proteína según la invención sintetizan un almidón modificado que está modificado en sus propiedades físico-químicas, especialmente el contenido de fosfato de almidón o la distribución de fosfato en comparación con almidón sintetizado en células vegetales naturales o plantas naturales de manera que éste es más apto para aplicaciones especiales.

Por tanto, adicionalmente se describen células vegetales genéticamente modificadas o plantas genéticamente modificadas caracterizadas porque presentan una elevada actividad enzimática de una proteína según la invención en comparación con células vegetales naturales o plantas naturales no genéticamente modificadas correspondientes.

Otro objeto de la presente invención es una célula vegetal genéticamente modificada caracterizada porque la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta, en la que la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos codificante tiene un dominio de fosfohistidina que tiene al menos el 60% de identidad con el dominio de fosfohistidina como se identifica por SEQ ID No. 5 y en la que la proteína requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato e introduce enlaces monoéster de fosfato en la posición C-3 de una molécula de glucosa del alfa-1,4-glucano y en la que la célula vegetal genéticamente modificada sintetiza un almidón modificado que tiene un elevado contenido de fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato modificada en comparación con almidón de plantas naturales correspondientes.

Conjuntamente con la presente invención, el término “célula vegetal natural” significa que las células vegetales en cuestión se usaron como material de partida para la preparación de las células vegetales según la invención, es decir, su información genética, aparte de la modificación genética introducida, se corresponde con la de una célula vegetal según la invención.

Conjuntamente con la presente invención, el término “planta natural” significa que las plantas en cuestión se usaron como material de partida para la preparación de las plantas según la invención, es decir, su información genética, aparte de la modificación genética introducida, se corresponde con la de una planta según la invención.

Conjuntamente con la presente invención, el término “correspondiente” significa que, en la comparación de varios objetos, los objetos en cuestión que se comparan entre sí se han mantenido bajo las mismas condiciones. Conjuntamente con la presente invención, el término “correspondiente” conjuntamente con la célula vegetal natural o planta natural significa que las células vegetales o plantas, que se comparan entre sí se han producido bajo las mismas condiciones de cultivo y que tienen la misma edad (de cultivo).

El término “actividad elevada” en el marco de la presente invención significa en este caso un aumento en la expresión de genes endógenos que codifican proteínas según la invención y/o un aumento en la cantidad de proteínas según la invención en las células y/o un aumento en la actividad enzimática de proteínas según la invención en las células.

El aumento en la expresión puede determinarse, por ejemplo, midiendo la cantidad de transcritos que codifican proteínas según la invención, por ejemplo, usando análisis de transferencia de Northern o RT-PCR. Las moléculas de ácidos nucleicos que se identificaron usando procedimientos según la invención para identificar un ácido nucleico se usan preferentemente en este caso para determinar una expresión elevada de proteínas según la invención. Aquí, un aumento significa preferentemente un aumento en la cantidad de transcritos en comparación con células correspondientes que no han sido genéticamente modificadas de al menos el 50%, en particular de al menos el 70%, preferentemente de al menos el 85% y particularmente preferentemente de al menos el 100%. Un aumento en la cantidad de transcritos que codifican una proteína según la invención también significa que plantas que no tienen transcritos detectables que codifican una proteína según la invención, después de la modificación genética según la invención, tienen una cantidad detectable de transcritos que codifican una proteína según la invención.

El aumento en la cantidad de proteína de una proteína según la invención, que da como resultado un aumento de la actividad de esta proteína en las células vegetales en cuestión, puede determinarse, por ejemplo, por procedimientos inmunológicos tales como análisis de transferencia de Western, EDTA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) o RIA (RadioInmunoEnsayo). La preparación de un anticuerpo que puede usarse para medir el aumento en la cantidad de proteína usando procedimientos inmunológicos se describe adicionalmente más adelante como un ejemplo (véase el Ejemplo 11). Aquí, un aumento significa preferentemente un aumento en la cantidad de una proteína según la invención en comparación con células correspondientes que no han sido genéticamente modificadas de al menos el 50%, en particular de al menos el 70%, preferentemente de al menos el 85% y particularmente preferentemente de al menos el 100%. Un aumento en la cantidad de una proteína según la invención también significa que plantas que no tienen cantidad detectable de una proteína según la invención, después de la modificación genética según la invención, tienen una cantidad detectable de proteína según la invención:

En otra realización de la presente invención, las células vegetales según la invención o las plantas según la invención comprenden células vegetales de plantas almacenadoras de almidón o plantas almacenadoras de almidón. Plantas almacenadoras de almidón son, por ejemplo, plantas de maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, boniato, sagú, judía mungo, banana, guisante, *Arabidopsis*, cúrcuma o sorgo. Particularmente se prefieren plantas de arroz, especialmente se prefieren de trigo.

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

En este contexto, el término “modificación genética” significa la introducción de moléculas de ácidos nucleicos extrañas homólogas y/o heterólogas en el genoma de una célula vegetal o en el genoma de una planta, en la que dicha introducción de estas moléculas conduce a un aumento o reducción en la actividad de una proteína según la invención.

ES 2 344 113 T3

Las células vegetales según la invención o las plantas según la invención se modifican con respecto a su información genética por la introducción de una molécula de ácido nucleico extraña. La presencia o la expresión de la molécula de ácido nucleico extraña conduce a un cambio fenotípico. Cambio “fenotípico” significa preferentemente en este caso un cambio medible en una o una pluralidad de funciones de las células. Por ejemplo, las células vegetales genéticamente modificadas según la invención y las plantas genéticamente modificadas según la invención presentan un aumento o reducción en la actividad de una proteína según la invención debido a la presencia o a la expresión de la molécula de ácido nucleico introducida.

Conjuntamente con la presente invención, el término “molécula de ácido nucleico extraña” se entiende que significa una molécula que o bien no se produce naturalmente en las células vegetales naturales correspondientes o que no se produce naturalmente en la disposición espacial específica en células vegetales naturales, o que está localizada en un lugar en el genoma de la célula vegetal natural en el que no se produce naturalmente. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico extraña es una molécula recombinante que está constituida por diferentes elementos, no produciéndose la combinación o disposición espacial específica naturalmente en células vegetales.

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

Conjuntamente con la presente invención, el término “genoma” debe entenderse que significa la totalidad del material genético presente en una célula vegetal. El experto en la materia sabe que, además del núcleo de la célula, otros compartimentos (por ejemplo, plastos, mitocondrias) también contienen material genético.

Se describe una célula vegetal genéticamente modificada según la invención o una planta genéticamente modificada según la invención en la que la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta y la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína según la invención.

Se describe una célula vegetal genéticamente modificada según la invención o una planta genéticamente modificada según la invención en la que la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta y en la que la molécula de ácido nucleico extraña comprende una molécula de ácido nucleico según la invención, preferentemente una molécula de ácido nucleico según la invención, aislada de *Arabidopsis thaliana*, particularmente preferentemente aislada de arroz.

Están disponibles un gran número de técnicas para la introducción de ADN en una célula vegetal huésped. Estas técnicas incluyen la transformación de células vegetales con ADN-T usando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como medio de transformación, la fusión de protoplastos, inyección, la electroporación de ADN, la introducción de ADN por medio de la solución biolística, además de otras posibilidades.

El uso de la transformación mediada por agrobacterias de células vegetales se ha investigado intensamente y se ha descrito adecuadamente en el documento EP 120516; Hoekema, en: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam (1985), capítulo V; Fraley y col., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 y por An y col. EMBO J. 4, (1985), 277-287. Para la transformación de patata véase, por ejemplo, Rocha-Sosa y col., EMBO J. 8, (1989), 29-33.

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

La transformación satisfactoria de otros tipos de cereal ya ha sido descrita, por ejemplo, para cebada (Wan y Lemaux, véase anteriormente; Ritala y col., véase anteriormente; Krens y col., Nature 296, (1982), 72-74) y para trigo (Nehra y col., Plant J. 5, (1994), 285-297). Todos los procedimientos anteriores son adecuados dentro del marco de la presente invención.

Entre otras cosas, las células vegetales según la invención y las plantas según la invención pueden diferenciarse de células vegetales naturales y plantas naturales, respectivamente, en que contienen una molécula de ácido nucleico extraña que no se produce naturalmente en células vegetales naturales o plantas naturales, o en que una molécula tal está presente integrada en un lugar en el genoma de la célula vegetal según la invención o en el genoma de la planta según la invención en el que no se produce en células vegetales naturales o plantas naturales, es decir, en un entorno genómico diferente. Además, las células vegetales según la invención y las plantas según la invención de este

tipo se diferencian de células vegetales naturales y plantas naturales, respectivamente, en que contienen al menos una copia de la molécula de ácido nucleico extraña establemente integrada dentro de su genoma, posiblemente además de copias que se producen naturalmente de una molécula tal en las células vegetales naturales o plantas naturales. Si la(s) molécula(s) de ácidos nucleicos extraña(s) introducida(s) en las células vegetales según la invención o en las plantas según la invención es (son) copias adicionales de moléculas que ya se producen naturalmente en las células vegetales naturales o plantas naturales respectivamente, entonces las células vegetales según la invención y las plantas según la invención pueden diferenciarse de células vegetales naturales o plantas naturales, respectivamente, en particular en que esta copia adicional o estas copias adicionales está (están) localizada(s) en sitios en el genoma en los que no se produce (o no se producen) en células vegetales naturales o plantas naturales. Esto puede verificarse, por ejemplo, usando un análisis de transferencia de Southern.

Además, las células vegetales según la invención y las plantas según la invención pueden diferenciarse de las células vegetales naturales o plantas naturales, respectivamente, preferentemente por al menos una de las siguientes características: si la molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido es heteróloga con respecto a la célula vegetal o planta, entonces las células vegetales según la invención o plantas según la invención tienen transcritos de las moléculas de ácidos nucleicos introducidas. Esto puede verificarse, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern o por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa). Preferentemente, las células vegetales según la invención y las plantas según la invención que presentan una actividad elevada de una proteína según la invención contienen una proteína que se codifica por una molécula de ácido nucleico introducida. Esto puede demostrarse por procedimientos inmunológicos, por ejemplo, en particular por un análisis de transferencia de Western. Las células vegetales según la invención y las plantas según la invención que presentan una actividad reducida de una proteína según la invención muestran una cantidad reducida de la proteína relevante en comparación con células vegetales naturales o plantas naturales correspondientes que no han sido genéticamente modificadas cuando se investigaron usando dichos procedimientos inmunológicos.

Si la molécula de ácido nucleico extraña que se ha introducido es homóloga con respecto a la célula vegetal o planta, las células vegetales según la invención o las plantas según la invención pueden diferenciarse de células vegetales naturales o plantas naturales, respectivamente, por ejemplo, debido a la expresión adicional de la molécula de ácido nucleico extraña introducida. Las células vegetales según la invención y las plantas según la invención contienen preferentemente transcritos de las moléculas de ácidos nucleicos extrañas. Esto puede demostrarse, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern o usando la llamada PCR cuantitativa.

En una realización especial, las células vegetales según la invención y las plantas según la invención son células vegetales transgénicas o plantas transgénicas, respectivamente.

Las células vegetales según la invención y las plantas según la invención sintetizan un almidón modificado en comparación con almidón aislado de células vegetales naturales o plantas naturales que no han sido genéticamente modificadas.

Conjuntamente con la presente invención, el término “almidón modificado” significa que el almidón ha cambiado características físico-químicas en comparación con almidón no modificado que puede obtenerse a partir de células vegetales naturales o plantas naturales correspondientes.

Las células vegetales según la invención o las plantas según la invención sintetizan un almidón modificado que tiene un contenido elevado de fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato modificada en comparación con el almidón aislado de células vegetales naturales o plantas naturales correspondientes.

En otra realización del procedimiento según la presente invención, las células vegetales según la invención o las plantas según la invención sintetizan un almidón modificado que tiene una relación de C-3/C-6 modificada del fosfato de almidón en comparación con células vegetales naturales correspondientes que no han sido genéticamente modificadas o plantas que no han sido genéticamente modificadas. En este caso son especialmente preferidos almidones que presentan una fracción elevada de fosfato de almidón unido en la posición C-3 en comparación con fosfato de almidón unido en la posición C-6, en comparación con almidones correspondientes aislados de células vegetales naturales que no han sido genéticamente modificadas o plantas que no han sido genéticamente modificadas.

Conjuntamente con la presente invención, el término “distribución de fosfato” debe entenderse como la fracción del fosfato de almidón unida en la posición C-2, posición C-3 o posición C-6 de una molécula de glucosa con respecto al contenido de fosfato de almidón total de alfa-1,4-glucanos.

Conjuntamente con la presente invención, el término “relación C-2/C-3/C-6” debe entenderse como la fracción del fosfato de almidón en la que el fosfato de almidón de un alfa-1,4-glucano unido respectivamente en la posición C-2, posición C-3 o posición C-6 contribuye al contenido de fosfato de almidón total del alfa-1,4-glucano en cuestión (posición C-2 + posición C-3 + posición C-6).

Conjuntamente con la presente invención, el término “relación C-3/C-6” debe entenderse como la fracción del fosfato de almidón en la que el fosfato de almidón de un alfa-1,4-glucano unido respectivamente en la posición C-3 y en la posición C-6 contribuye a la suma del fosfato de almidón unido en la posición C-3 y en la posición C-6 (posición C-3 + posición C-6) del alfa-1,4-glucano en cuestión.

ES 2 344 113 T3

Otro objeto de la presente invención son células vegetales según la invención o plantas según la invención que sintetizan un almidón modificado en las que el almidón modificado se caracteriza porque tiene un contenido elevado de fosfato unido covalentemente al almidón en la posición C-3 de la molécula de glucosa en comparación con el almidón de células vegetales naturales o plantas naturales correspondientes.

5

Otro objeto de la presente invención son plantas que contienen células vegetales según la invención.

Descripción de secuencias

10 SEQ ID NO 1: Secuencia de ácidos nucleicos que contiene la región codificante de la proteína A.t.-OK1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia se inserta en los vectores OK1-pGEM-T y OK1-pDESTTM17.

SEQ ID NO 2: Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína A.t.-OK1 de *Arabidopsis thaliana*. Esta secuencia puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 1.

15

SEQ ID NO 3: Secuencia de ácidos nucleicos que contiene la región codificante de la proteína O.s.-OK1 de *Oryza sativa*. Esta secuencia se inserta en el vector M150.

20 SEQ ID NO 4: Secuencia de aminoácidos que codifica la proteína O.s.-OK1 de *Oryza sativa*. Esta secuencia puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 3.

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

25 SEQ ID NO 6: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína H.v.-OK1 de cebada.

SEQ ID NO 7: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína H.v.-OK1 de cebada.

30

SEQ ID NO 8: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína H.v.-OK1 de cebada.

35 SEQ ID NO 9: Secuencia parcial de ácidos nucleicos que codifica una proteína H.v.-OK1 de cebada. Esta secuencia de ácidos nucleicos se ha identificado por medio de las secuencias de péptidos mostrada en SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8 usando la herramienta "Búsqueda con Blast" en la base de datos TIGR.

SEQ ID NO 10: Secuencia parcial de aminoácidos que codifica una proteína H.v.-OK1 de cebada. La secuencia de aminoácidos mostrada puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 9.

40

SEQ ID NO 11: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata.

45 SEQ ID NO 12: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata.

SEQ ID NO 13: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata.

50 SEQ ID NO 14: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata.

55 SEQ ID NO 15: Secuencia parcial de ácidos nucleicos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata. Esta secuencia de ácidos nucleicos se ha identificado por medio de las secuencias de péptidos mostrada en SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 y SEQ ID NO 14 usando la herramienta "Búsqueda con Blast" en la base de datos TIGR.

SEQ ID NO 16: Secuencia parcial de aminoácidos que codifica una proteína S.t.-OK1 de patata. La secuencia de aminoácidos mostrada puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 15.

60 SEQ ID NO 17: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo.

SEQ ID NO 18: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo.

65

SEQ ID NO 19: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo.

ES 2 344 113 T3

SEQ ID NO 20: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo.

5 SEQ ID NO 21: Secuencia parcial de ácidos nucleicos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo. Esta secuencia de ácidos nucleicos se ha identificado por medio de las secuencias de péptidos mostrada en SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 y SEQ ID NO 20 usando la herramienta “Búsqueda con Blast” en la base de datos TIGR.

10 SEQ ID NO 22: Secuencia parcial de aminoácidos que codifica una proteína S.b.-OK1 de mijo. La secuencia de aminoácidos mostrada puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 21.

15 SEQ ID NO 23: Secuencia de péptidos contenida en la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína T.a.-OK1 de trigo.

20 SEQ ID NO 24: Secuencia de péptidos que contiene la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína T.a.-OK1 de trigo.

25 SEQ ID NO 25: Secuencia parcial de ácidos nucleicos que codifica una proteína T.a.-OK1 de trigo. Esta secuencia de ácidos nucleicos se ha identificado por medio de las secuencias de péptidos mostrada en SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO 24 usando la herramienta “Búsqueda con Blast” en la base de datos TIGR.

30 SEQ ID NO 26: Secuencia parcial de aminoácidos que codifica una proteína T.a.-OK1 de trigo. La secuencia de aminoácidos mostrada puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 25.

Descripción de las figuras

35 Fig. 1: Gel de acrilamida desnaturalizante para identificar proteínas de *Arabidopsis thaliana* que se une preferentemente a almidón no fosforilado en comparación con almidón fosforilado. Un marcador de peso molecular de proteínas patrón se muestra en la pista “M”. Las proteínas obtenidas después de incubar la preparación de control C del Ejemplo - 1 d) se muestran en la pista “-”. Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos después de la incubación con almidón no fosforilado, aislados de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* (Preparación B, Ejemplo 1 d)), se muestran en la pista “K”. Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*, obtenidos después de la incubación con almidón, aislados de hojas de un *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* que se fosforiló retrospectivamente *in vitro* con una proteína R1 (Preparación A, Ejemplo 1 d) se muestran en la pista “P”. Al completarse la electroforesis, el gel de acrilamida se tiñó con azul de Coomassie.

40 Fig. 2: Demostración de la actividad autofosforilante de la proteína OK1. La Fig. 2A) muestra un gel de acrilamida desnaturalizante (SDS) teñido con azul de Coomassie al completarse la electroforesis. La Figura 2 B) muestra la autorradiografía de un gel de acilamida desnaturalizante (SDS). Las mismas cantidades de las mismas muestras se aplicaron a cada uno de los dos geles. M: Marcador de peso molecular de proteínas patrón; R1: Muestra del recipiente de reacción 1 según el Ejemplo 7 (después de incubar una proteína OK1 con ATP); R2: Muestra del recipiente de reacción 2 según el Ejemplo 7 (después de incubar una proteína OK1 con ATP la proteína se calentó hasta 95°C); R3: Muestra del recipiente de reacción 3 según el Ejemplo 7 (después de incubar una proteína OK1 con ATP la proteína se incubó en HCl 0,5 M); R4: Muestra del recipiente de reacción 4 según el Ejemplo 7 (después de incubar una proteína OK1 con ATP la proteína se incubó en NaOH 0,5 M).

45 Fig. 3: Demostración de la actividad fosforilante de almidón de una proteína OK1 (véase el Ejemplo 6). La proteína OK1 se incubó con almidón no fosforilado aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* (Preparación A) y almidón aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* que se fosforiló retrospectivamente *in vitro* con una proteína R1 (Preparación B). La Preparación C es la misma que la Preparación B, excepto que esta Preparación C se incubó sin proteína OK1. Se llevaron a cabo dos pruebas independientes para cada Preparación (A, B, C) (Prueba 1 y Prueba 2). Las cantidades respectivas se muestran, medidas en cpm (cuentas por minuto), en fosfato marcado con ³³P, que se introdujo en almidón no fosforilado (Preparación A) y almidón fosforilado (Preparación B).

50 Fig. 4: Comparación de las posiciones de átomos de C de moléculas de glucosa del almidón que se fosforiló a partir de una proteína R1 y una proteína OK1, respectivamente (véase el Ejemplo 9). La proteína OK1 (Preparación A) se incubó en presencia de ATP marcado con ³³P con almidón aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* que se fosforiló retrospectivamente *in vitro* con una proteína R1. La proteína R1 (Preparación B) se incubó en presencia de ATP marcado con ³³P con almidón aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*. Después de completarse la incubación se llevó a cabo una hidrólisis total del almidón y los productos de hidrólisis obtenidos se separaron usando cromatografía HPAE. Como patrón se añadieron glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato a los productos de hidrólisis antes de la separación. Los productos de hidrólisis separados por medio de cromatografía HPAE se recogieron en fracciones individuales. La glucosa-6-fosfato añadida se eluyó con la fracción 15 y la glucosa-3-fosfato añadida con la fracción 17. Las fracciones obtenidas se investigaron posteriormente para la presencia de fosfato radiactivamente marcado. Se muestra gráficamente la cantidad de fosfato marcado con ³³P medida en las fracciones individuales, medida en cpm (cuentas por minuto), que se introdujo en los productos de hidrólisis del almidón fosforilado por la proteína OK1 o la proteína R1.

ES 2 344 113 T3

Fig. 5: Demostración de la autofosforilación de la proteína OK1. La Figura 5 A) muestra una transferencia de Western. La Figura 5 B) muestra la autorradiografía de un gel de acrilamida desnaturalizante (SDS). Las mismas cantidades de las mismas muestras se aplicaron a cada uno de los dos gels. La proteína OK1 se incubó tanto con ATP radiactivamente marcado aleatorizado como con ATP específicamente radiactivamente marcado en la posición gamma. Al completarse la incubación, las proteínas o se calentaron hasta 30°C o 95°C o se incubaron en NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M, respectivamente.

Fig. 6: Demostración de la transferencia del residuo de beta-fosfato de ATP a almidón en una reacción catalizada por una proteína OK1. Tanto el ATP específicamente marcado con ³³P en la posición gamma como el ³³P ATP aleatorizado se usaron para fosforilar almidón, que había sido fosforilado *in vitro* por medio de una proteína R1 y aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* por medio de una proteína OK1. No se añadió proteína OK1 en ninguno de los experimentos designados como "control". Cada preparación se probó dos veces, independientemente entre sí. Se muestran los resultados de ambas pruebas.

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

Procedimientos generales

A continuación se describen procedimientos que pueden usarse para llevar a cabo el procedimiento según la invención. Estos procedimientos constituyen realizaciones específicas de la presente invención, pero no restringen la presente invención a estos procedimientos. El experto en la materia sabe que él puede implementar la invención en la misma forma modificando los procedimientos descritos y/o reemplazando partes individuales de los procedimientos por partes alternativas de los procedimientos.

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

a) Preparación de extractos de proteína a partir de tejidos vegetales

Se congela material de hojas en nitrógeno líquido inmediatamente después de recolectarlo y posteriormente se homogeneiza en el mortero bajo nitrógeno líquido. El material de hojas reducido se mezcla con aproximadamente 3,5 veces el volumen (respecto al peso del material de hojas usado) de tampón de unión frío (4°C) y se macera durante 2x10 s usando una Ultraturax (velocidad máxima). Después del primer tratamiento con una Ultraturax, el material de hojas reducido se enfría sobre hielo antes de llevar a cabo el segundo tratamiento. Entonces, el material de hojas tratado se pasa a través de una malla de nailon de 100 µm y se centrifuga durante 20 min (recipiente de centrifuga de 50 ml, 20.000xg, 4°C).

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

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación según la Etapa a) se elimina y se determina su volumen. Para precipitar proteínas se añade continuamente sulfato de amonio al sobrenadante durante un periodo de 30 minutos a la vez que se agita sobre hielo hasta una concentración final del 75% (peso/volumen). El sobrenadante se incubaba posteriormente durante otra hora sobre hielo mientras se agita. Las proteínas precipitadas del sobrenadante se sedimentan a 20.000xg y 4°C durante 10 min y el sedimento se absorbe posteriormente en 5 ml de tampón de unión, es decir, las proteínas presentes en el sedimento se disuelven.

c) Desalinización de las proteínas precipitadas

Las proteínas disueltas se desalan usando una columna PD10 rellena de Sephadex G25 (Amersham Bioscience, Friburgo, n° de prod. de las columnas: 17-0851-01, n° de prod. de Sephadex G25-M: 17-0033-01) a una temperatura de 4°C, es decir, el sulfato de amonio usado para la precipitación en la Etapa b) se separa de las proteínas disueltas. La columna PD10 se equilibra con tampón de unión antes de aplicarse las proteínas disueltas según la Etapa b). Para este fin, 5 ml de tampón de unión se extienden sobre la columna en cada caso. Posteriormente, a cada columna se añaden 2,5 ml de la disolución de proteínas obtenida según la Etapa b) antes de eluir las proteínas de la columna con 3,5 ml de tampón de unión.

d) Determinación de la concentración de proteína

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

ES 2 344 113 T3

e) Composición del tampón de unión

5	Tampón de unión:	50 mM	HEPES/NaOH (o KOH), pH 7,2
		1 mM	EDTA
		2 mM	Ditioeritrol (DTE)
10		2 mM	Benzamidina
		2 mM	Ácido ϵ -aminocaproico
		0,5 mM	PMSF
15		0,02%	Tritón X-100

2. Aislamiento de almidón de hojas

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

20 El material de hojas se congela inmediatamente después de recolectarlo en nitrógeno líquido. El material de hojas se homogeneiza en porciones en el mortero bajo nitrógeno líquido y se absorbe en un total de aproximadamente 2,5 veces el volumen (peso/volumen) de tampón de almidón. Además, esta suspensión se homogeneiza de nuevo en una mezcladora Waring durante 20 s a velocidad máxima: el homogeneizado se pasa a través de una malla de nailon (ancho de malla de 100 μm) y se centrifuga durante 5 minutos a 1.000xg. Se desecha el sobrenadante con las proteínas solubles.

b) Purificación del almidón aislado a partir de los tejidos vegetales

30 Después de eliminar el material verde depositado sobre la parte superior del almidón aclarando el material verde con tampón de almidón, el sedimento que contiene el almidón obtenido de la Etapa a) se absorbe en tampón de almidón y se pasa sucesivamente a través de mallas de nailon con diferentes anchos de malla (del orden de 60 μm , 30 μm , 20 μm). El filtrado se centrifuga usando 10 ml de almohadilla Percoll (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia), 5% (v/v) de HEPES 0,5 M-KOH, pH 7,2) (Correx tube, 15 min, 2.000xg). El sedimento obtenido después de esta centrifugación se resuspende una vez en tampón de almidón y se centrifuga de nuevo (5 min, 1.000xg).

c) Eliminación de las proteínas unidas al almidón

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

d) Purificación del almidón que ha sido liberado de proteínas

50 El almidón obtenido de la Etapa c) que ha sido liberado de las proteínas unidas a su superficie se elimina posteriormente incubando cuatro veces con tampón de lavado durante 10-15 minutos en cada caso a temperatura ambiente con agitación. Cada etapa de lavado va seguida de una centrifugación (5 min, 1.000xg) con el fin de separar los gránulos de almidón del tampón de lavado respectivo. Estas etapas de purificación sirven principalmente para eliminar el SDS usado en las incubaciones en la Etapa c).

e) Determinación de la concentración de almidón aislado

60 La cantidad de almidón aislado en la Etapa d) se determina fotométricamente. Después de la dilución adecuada, la densidad óptica de la suspensión de almidón se mide frente a una curva de calibrado a una longitud de onda de 600 nm. El intervalo lineal de la curva de calibrado se localiza entre 0 y 0,3 unidades de extinción.

65 Para producir las curvas de calibrado, el almidón, por ejemplo aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana*, se seca a vacío, se pesa y se absorbe en un volumen definido de agua. La suspensión así obtenida se diluye con agua en varias etapas en una relación de 1 a 1 en cada caso hasta que se obtiene una suspensión de aproximadamente 5 μg de almidón por ml de agua. Las suspensiones obtenidas por las etapas de dilución individuales se miden en el fotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Los valores de absorción obtenidos para cada suspensión se representan frente a la concentración de almidón en la suspensión respectiva. La curva de calibrado obtenida debe seguir una función matemática lineal en el intervalo de 0 μg de almidón por ml de agua a 0,3 μg de almidón por ml de agua.

ES 2 344 113 T3

Entonces se produce un cultivo principal para la expresión de una proteína fosforilante de almidón. Para hacer esto, en cada caso, matraces Erlenmeyer de 1 litro conteniendo cada uno 300 ml de medio TB se precalientan a 30°C y un antibiótico para la selección en la presencia del plásmido de expresión se siembra en cada uno con 10 ml de un pre-cultivo apropiado y se incuban a 30°C con agitación (250 rpm) hasta que se logra una densidad óptica (medida a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0,8.

Si para la expresión de una proteína fosforilante de almidón se usa un plásmido de expresión en el que la expresión de la proteína fosforilante de almidón se inicia por medio de un sistema inducible (por ejemplo, el vector de expresión pDESTTM17 en cepas BL21 de *E. coli*, inducible por medio de IPTG), entonces al alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0,8, el inductor en cuestión (por ejemplo IPTG) se añade al cultivo principal. Después de añadir el inductor, el cultivo principal se incuban a 30°C con agitación (250 rpm) hasta que se logra una DO_{600} de aproximadamente 1,8. Entonces, el cultivo principal se enfría durante 30 minutos sobre hielo antes de separarse las células del cultivo principal del medio de cultivo por centrifugación (10 minutos a 4.000xg y 4°C).

15

4. Purificación de una proteína fosforilante de almidón

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

Las células obtenidas en la Etapa c), Punto 3, Procedimientos generales se resuspenden en tampón de lisis. Como resultado, aproximadamente 4 ml de tampón de lisis se añaden a aproximadamente 1 g de células. Entonces, las células resuspendidas se incuban durante 30 minutos sobre hielo antes de descomponerse usando una sonda ultrasónica (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlín, parámetros: ciclo 6, 70%, 1 minuto) con enfriamiento continuo por medio de hielo. Aquí debe tenerse cuidado para garantizar que la suspensión de células no se calienta demasiado durante el tratamiento ultrasónico. La suspensión obtenida después del tratamiento ultrasónico se centrifuga (12 minutos a 20.000xg, 4°C) y el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se filtra usando un filtro con un tamaño de poro de 45 μ m.

b) Purificación de la proteína fosforilante de almidón

Si la proteína fosforilante de almidón expresada en células de *E. coli* es una proteína de fusión con una marca His, entonces la purificación puede tener lugar usando iones níquel a los que se une la marca His con mayor afinidad. Para hacer esto, 25 ml del filtrado obtenido en la Etapa d) se mezclan con 1 ml de suspensión de Ni-agarosa (Qiagen, n° de prod.: 30210) y se incuban durante 1 hora sobre hielo. La mezcla de suspensión de Ni-agarosa y el filtrado se extienden posteriormente sobre una columna de poliestireno (Pierce, n° de prod.: 29920). El producto que corre por la columna se desecha. La columna se lava a continuación añadiendo 8 ml de tampón de lisis, el producto que corre por la columna se desecha de nuevo. La elución de la proteína fosforilante de almidón tiene lugar entonces mediante adición fraccionada a la columna de 1 ml de tampón E1 dos veces, seguido de 1 ml de tampón E2 una vez y posteriormente 1 ml de tampón E3 cinco veces. El producto que corre por la columna que se produce añadiendo la fracción individual del tampón de elución apropiado (tampón E1, E2, E3) a la columna se recoge en fracciones separadas. Las alícuotas de estas fracciones se analizan posteriormente por medio de electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante SDS seguida de tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contienen la proteína fosforilante de almidón en suficiente cantidad y pureza satisfactoria se purifican y se concentran usando filtración presurizada a 4°C. La filtración presurizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando una celda Amicon (celda de ultrafiltración Amicon, modelo 8010, n° de prod.: 5121) usando una membrana Diaflo PM30 (Millipore, n° de prod.: 13212) a 4°C. Sin embargo, para la concentración también pueden usarse otros procedimientos conocidos para el experto en la materia.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 344 113 T3

c) Composición de tampones usados

5	Tampón de lisis:	50 mM	HEPES	
			300 mM	NaCl
			10 mM	Imidazol
			pH 8,0 (ajuste con NaOH)	
10		1 mg/ml	Lisozima (añadir inmediatamente antes de usar el tampón)	
<hr/>				
15	Tampón de elución E1:	50 mM	HEPES	
			300 mM	NaCl
			50 mM	Imidazol
			pH 8,0 (ajuste con NaOH)	
20				
25	Tampón de elución E2:	50 mM	HEPES	
			300 mM	NaCl
			75 mM	Imidazol
			pH 8,0 (ajuste con NaOH)	
<hr/>				
30	Tampón de elución E3:	50 mM	HEPES	
			300 mM	NaCl
			250 mM	Imidazol
			pH 8,0 (ajuste con NaOH)	
35	<hr/>			
	¼ de comprimido por 10 ml de inhibidores de proteasas Complete EDTA free, (nº de producto de Roche: 1873580) (añadir inmediatamente antes de usar el tampón)			
<hr/>				

40

5. Expresión recombinante de una proteína R1

45 La expresión recombinante de una proteína R1 se describe en la bibliografía (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), pero también puede llevarse a cabo según los procedimientos referentes a la expresión recombinante de una proteína fosforilante de almidón descritos anteriormente en el Punto 3, Procedimientos generales.

50 6. Purificación de una proteína R1

55 La purificación de una proteína R1 se describe en la bibliografía (Ritte y col., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen y col., Mikkelsen y col., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), pero también puede llevarse a cabo según los procedimientos referentes a la purificación de una proteína fosforilante de almidón descritos anteriormente en el Punto 4, Procedimientos generales si una proteína de fusión R1, que contiene una marca His se produce por expresión de R1 en células de *E. coli*.

7. Preparación *in vitro* de almidón fosforilado a partir de almidón no fosforilado

60 a) Fosforilación *in vitro* de almidón no fosforilado

65 El almidón que no contiene fosfato de almidón (por ejemplo, aislado de hojas del mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* usando los procedimientos descritos anteriormente en el Punto 2, Procedimientos generales) se mezcla con el tampón de R1 y con proteína R1 purificada (aproximadamente 0,25 µg de proteína R1 por mg de almidón) con el fin de producir un contenido de almidón de 25 mg por ml. Esta preparación de reacción se incuba durante la noche (aproximadamente 15 h) a temperatura ambiente con agitación. La R1 unida al almidón presente en la preparación de reacción se elimina al completarse la reacción lavando cuatro veces con aproximadamente 800 µl de SDS al 0,5% en

ES 2 344 113 T3

cada caso. Posteriormente, el SDS todavía presente en el almidón fosforilado *in vitro* se elimina lavando cinco veces con 1 ml de tampón de lavado en cada caso. Todas las etapas de lavado se llevan a cabo a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos con agitación. Cada etapa de lavado va seguida de una centrifugación (2 min, 10.000xg), con el fin de separar los gránulos de almidón del tampón de SDS o tampón de lavado respectivo.

5

b) Composición de tampones usados

10	Tampón de R1:	50 mM	HEPES/KOH,	pH	7,5
	1 mM		EDTA		
	6 mM		MgCl ₂		
15	0,5 mM	ATP			
	Tampón de lavado:		HEPES 50 mM/KOH,	pH	7,2

20 8. Unión de proteínas a almidón fosforilado o almidón no fosforilado

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

25 Se resuspenden aproximadamente 50 mg de P-almidón o aproximadamente 50 mg de almidón no fosforilado en preparaciones separadas en aproximadamente 800 µl de extracto de proteína en cada caso. La concentración de proteína de los extractos de proteína debe ser aproximadamente 4 mg a 5 mg por ml en cada caso. La incubación del P-almidón o almidón no fosforilado con extractos de proteína se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos a 4°C con agitación. Al completarse la incubación, las preparaciones de reacción se centrifugan usando una almohadilla Percoll (4 ml) (15 minutos, 3500 rpm, 4°C). Después de la centrifugación, las proteínas que no están unidas al almidón fosforilado o P-almidón se encontrarán en el sobrenadante y podrán eliminarse con una pipeta Pasteur. El sobrenadante se desecha. El sedimento sedimentado que contiene P-almidón y almidón no fosforilado, que incluye las proteínas unidas a los almidones respectivos (complejos de P-almidón-proteína o complejos de almidón no fosforilado-proteína, respectivamente), obtenido después de la centrifugación se lava dos veces con 1 ml de tampón de lavado en cada caso (véase anteriormente, Procedimientos generales en el Punto 7.b) incubando durante 3 minutos a 35 4°C en cada caso con agitación. La etapa de lavado va seguida de una centrifugación (5 minutos, 8000 rpm, 4°C en una centrifuga de mesa, Hettich EBA 12R) con el fin de separar el P-almidón o el almidón no fosforilado respectivamente del tampón de lavado.

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

45 Los complejos de P-almidón-proteína o los complejos de almidón no fosforilado-proteína, respectivamente, obtenidos en la Etapa a) se resuspenden en aproximadamente 150 µl de tampón de prueba de SDS y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación. El P-almidón o el almidón no fosforilado, respectivamente, se eliminan posteriormente de las proteínas disueltas por centrifugación (1 minuto, 13.000 rpm, temperatura ambiente, centrifuga de mesa Eppendorf). El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se centrifuga de nuevo con el fin de eliminar cualquier residuo de P-almidón o almidón no fosforilado, respectivamente (1 minuto, 13.000 rpm, temperatura ambiente, centrifuga de mesa Eppendorf) y se elimina. Como resultado se obtienen las proteínas disueltas, que se unen al P-almidón o almidón no fosforilado, respectivamente.

50

c) Composición de tampones usados

55	Tampón de prueba de SDS:	187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8		
			6%	SDS	
60			30%	Glicerina	
			~ 0,015%	Azul de bromofenol	
			60 mM	DTE (añadir recientemente preparado)	

65 Percoll: Percoll se dializa durante la noche contra una disolución constituida por y HEPES 25 mM/KOH, pH 7,0.

ES 2 344 113 T3

9. Separación de proteínas que se unen a P-almidón y/o almidón no fosforilado

Las proteínas disueltas obtenidas en la Etapa c) en el Punto 8, Procedimientos generales, referente a la unión de proteínas a P-almidón o almidón no fosforilado, respectivamente, se incuban durante 5 minutos a 95°C en cada caso y posteriormente se separan usando electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. Como resultado, un volumen igual se aplica al gel de acrilamida en cada caso para las proteínas disueltas obtenidas mediante unión a P-almidón y para las obtenidas mediante unión al almidón no fosforilado. El gel obtenido al completarse la electroforesis se tiñe al menos durante la noche con Coomassie coloidal (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. No.: A152.1) y posteriormente se decolora en metanol al 30%, ácido acético al 5% o en metanol al 25%.

10. Identificación y aislamiento de proteínas que se unen a P-almidón y/o almidón no fosforilado

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

Las proteínas que después de la separación por medio de electroforesis en gel de acrilamida y posterior visualización por tinción (véase anteriormente, Punto 9, Procedimientos generales) presentan un señal aumentada después de la unión a P-almidón en comparación con una señal correspondiente después de la unión a almidón no fosforilado tienen actividad de unión aumentada hacia P-almidón en comparación con almidón no fosforilado. Mediante estos medios es posible identificar proteínas que tienen actividad de unión aumentada hacia P-almidón en comparación con almidón no fosforilado. Las proteínas que tienen actividad de unión aumentada hacia P-almidón en comparación con almidón no fosforilado se escinden del gel de acrilamida.

b) Identificación de proteínas que tienen actividad de unión aumentada hacia P-almidón en comparación con almidón no fosforilado

Las proteínas identificadas según la Etapa a) se digieren con tripsina y los péptidos obtenidos se analizan por medio de MALDI-TOF para determinar las masas de los péptidos obtenidos. La tripsina es una proteasa específica de secuencia, es decir, la tripsina sólo divide proteínas en una posición especificada cuando las proteínas en cuestión contienen ciertas secuencias de aminoácidos. Las tripsina siempre divide enlaces peptídicos cuando los aminoácidos arginina y lisina siguen el uno al otro empezando en el extremo N. De esta forma es posible determinar teóricamente todos los péptidos que se producirían tras la digestión con tripsina de una secuencia de aminoácidos. A partir del conocimiento de los aminoácidos que codifican los péptidos teóricamente determinados también pueden determinarse las masas de los péptidos que se obtienen después de la digestión con tripsina teórica. Las bases de datos (por ejemplo, NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) que contienen información referente a las masas de péptidos después de la digestión con tripsina teórica pueden compararse por tanto con las masas reales de péptidos de proteínas desconocidas obtenidas con EM-MALDI-TOF. Las secuencias de aminoácidos que tienen las mismas masas de péptidos después de la digestión con tripsina teórica y/o real van a considerarse como que son idénticas. Las bases de datos en cuestión contienen tanto masas de péptidos de proteínas cuya función ya se ha mostrado como también masas de proteínas que hasta la fecha sólo existían hipotéticamente mediante derivación de secuencias de aminoácidos a partir de secuencias de ácidos nucleicos obtenidas en proyectos de secuenciación. Por tanto, la existencia real y la función de tales proteínas hipotéticas se han mostrado raramente y, si hay una función en absoluto, entonces esto se basa normalmente en predicciones y no en la demostración real de la función.

Las bandas que contienen proteínas obtenidas según la Etapa a) se escinden del gel de acrilamida; el trozo de acrilamida escindido se reduce y se decolora incubando durante aproximadamente media hora a 37°C en aproximadamente 1 ml de NH₄HCO₃ al 60% 50 mM, acetonitrilo al 40%. La disolución decolorante se elimina posteriormente y el gel restante se seca a vacío (por ejemplo, Speedvac). Después del secado se añade la disolución de tripsina para digerir las proteínas contenidas en el trozo de gel en cuestión. La digestión tiene lugar durante la noche a 37°C. Después de la digestión se añade un poco de acetonitrilo (hasta que el gel de acrilamida se tiñe de blanco) y la preparación se seca a vacío (por ejemplo, Speedvac). Cuando se completa el secado se añade exactamente ácido fórmico al 5% suficiente para cubrir los constituyentes secos y se incuba durante unos pocos minutos a 37°C. El tratamiento con acetonitrilo seguido del secado se repite una vez más. Los constituyentes secos se absorben posteriormente en 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético, 5 µl a 10 µl) y se añaden gota a gota sobre un soporte en porciones de aproximadamente 0,5 µl. También se aplican cantidades iguales de matriz (ácido ε-ciano-4-hidroxicinámico) al soporte. Después de cristalizar fuera de la matriz, las masas de péptidos se determinan por medio de EM-MALDI-TOF-EM (por ejemplo, Bruker ReflexTM II, Bruker Daltonic, Bremen). Con las masas obtenidas, las bases de datos se buscan para secuencias de aminoácidos que den las mismas masas después de la digestión con tripsina teórica. De esta forma pueden identificarse las secuencias de aminoácidos que codifican proteínas que preferentemente se unen a alfa-1,4-glucanos fosforilados y/o que necesitan P-alfa-1,4-glucanos como sustrato.

ES 2 344 113 T3

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

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

5 Con el fin de demostrar si una proteína tiene actividad fosforilante de almidón, las proteínas que van a investigarse pueden incubarse con almidón y ATP radiactivamente marcado. Para hacer esto, aproximadamente 5 mg de P-almidón o aproximadamente 5 mg de almidón no fosforilado se incuban con la proteína que va a investigarse (0,01 μ g a 5,0 μ g por mg de almidón usado) en 500 μ l de tampón de fosforilación durante 10 minutos a 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detiene posteriormente mediante la adición de SDS hasta una concentración del 10 2% (peso/volumen). Los gránulos de almidón en la mezcla de reacción respectiva se centrifugan (1 minuto, 13.000xg) y se lavan una vez con 900 μ l de una disolución de SDS al 2% y cuatro veces cada una con 900 μ l de una disolución de ATP 2 mM. Cada etapa de lavado se lleva a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después de cada etapa de lavado, los gránulos de almidón se separan del tampón de lavado respectivo por centrifugación (1 min, 13.000x).

15 Además, cuando se lleva a cabo un experimento para demostrar la actividad fosforilante de almidón de una proteína, adicionalmente deben procesarse preparaciones de reacción que no contienen proteína o contienen proteína inactivada, pero que por lo demás se han tratado de la misma forma que las preparaciones de reacción descritas, como los llamados controles.

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

25 Los gránulos de almidón obtenidos según la Etapa a) pueden investigarse para la presencia de residuos de fosfato radiactivamente marcados. Para hacer esto, el almidón respectivo se resuspende en 100 μ l de agua y se mezcla con 3 ml de mezcla de centelleo en cada caso (por ejemplo, Ready Safe™, BECKMANN Coulter) y posteriormente se analiza usando un contador de centelleo (por ejemplo, contador de centelleo LS 6500 Multi-Purpose, BECKMANN COULTER™).

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

Si una proteína se incuba en preparaciones separadas, una vez con P-almidón y una vez con almidón no fosforilado, según el procedimiento descrito en a), entonces, comparando los valores para la presencia de fosfato de almidón obtenido según la Etapa b) puede determinarse si la proteína en cuestión ha incorporado más fosfato en P-almidón en comparación con almidón no fosforilado. Por tanto, también pueden identificarse las proteínas que pueden introducir fosfato en P-almidón, pero no en almidón no fosforilado, es decir, pueden identificarse proteínas que ya requieren almidón fosforilado como sustrato para una reacción de fosforilación adicional.

40 d) Composición de tampones usados

45	Tampón de fosforilación:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5	
			1 mM	EDTA
			6 mM	MgCl ₂
50			0,01 a 0,5 mM	ATP

0,2 a 2 μ Ci por ml de ³³P-ATP aleatorizado (alternativamente también puede usarse ATP que contiene un residuo de fosfato que está específicamente marcado en la posición gamma).

55 Conjuntamente con la presente invención, el término "ATP aleatorizado" debe entenderse que significa ATP que contiene residuos de fosfato marcados tanto en la posición gamma como en la posición beta (Ritte y col. 2002, PNAS 99, 7166-7171). El ATP aleatorizado también se describe en la bibliografía científica como ATP beta/gamma. Un procedimiento para preparar ATP aleatorizado se describe a continuación.

60

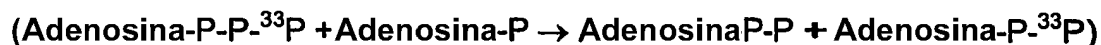
65

ES 2 344 113 T3

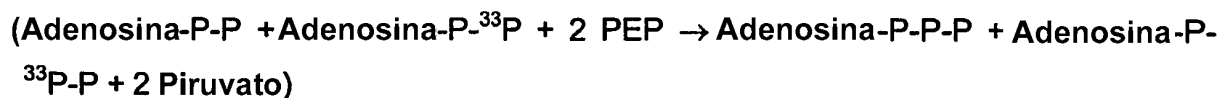
i) Preparación de ATP aleatorizado

El procedimiento descrito aquí para preparar ATP aleatorizado usando reacciones catalizadas por enzimas se basa en los siguientes mecanismos de reacción:

1. Etapa de reacción 1



2. Etapa de reacción 2



Los equilibrios de reacción se encuentran en el lado del producto, a pesar de esto, esta reacción produce una mezcla constituida principalmente por $\beta^{33}\text{P-ATP}$ y algo de $\gamma^{33}\text{P-ATP}$.

ii) Realización de la 1ª etapa de reacción

Se incuba ATP (100 μCi , 3000 Ci por mmol) que contiene un residuo de fosfato marcado con ^{33}P en la posición gamma (Hartmann Analytic, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) con 2 μl de miocinasa (AMP-fosfotransferasa, de músculo de conejo; SIGMA, n° de prod.: M3003 3,8 mg/ml, 1.626 unidades/mg) en 90 μl de tampón aleatorizante durante 1 hora a 37°C. La reacción se detiene posteriormente incubando durante 12 minutos a 95°C antes de purificarse la preparación de reacción por medio de filtración centrífuga usando un filtro Microcon YM 10 (Amicon, n° de prod. de Millipore 42407) a 14.000xg durante al menos 10 minutos.

iii) Realización de la 2ª etapa de reacción

Se añaden 2 μl de piruvato cinasa (véase más adelante para cómo preparar una disolución apropiada) y 3 μl de PEP 50 mM (fosfoenolpiruvato) al filtrado obtenido en la Etapa ii). Esta mezcla de reacción se incuba durante 45 minutos a 30°C antes de detenerse la reacción incubando a 95°C durante 12 minutos. La mezcla de reacción se centrifuga posteriormente (2 minutos, 12.000 rpm en una centrífuga de mesa Eppendorf). El sobrenadante que contiene ATP aleatorizado obtenido después de la centrifugación se elimina, se separa en alícuotas y puede almacenarse a -20°C.

Preparación de la disolución de piruvato cinasa

Se centrifugan 15 μl de piruvato cinasa (de músculo de conejo, Roche, n° de prod. 12815, 10 mg/ml, 200 unidades/mg a 25°C), el sobrenadante se desecha y el sedimento se absorbe en 27 μl de tampón piruvato cinasa.

ES 2 344 113 T3

iv) *Tampones usados*

5	Tampón de piruvato cinasa:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
			1 mM EDTA
10	Tampón aleatorizante:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
			1 mM EDTA
			10% Glicerina
15			5 mM MgCl ₂
			5 mM KCl
			0,1 mM ATP
20			0,3 mM AMP

12. *Demostración de la autofosforilación de una proteína*

25 Con el fin de demostrar si una proteína tiene actividad autofosforilante, las proteínas que van a investigarse pueden incubarse con ATP radiactivamente marcado. Para hacer esto, las proteínas que van a investigarse (50 μ g a 100 μ g) se incuban en 220 μ l de tampón de fosforilación (véase anteriormente, Punto 12 d), Procedimientos generales) durante 30 minutos a 90 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción se detiene entonces añadiendo EDTA hasta una concentración final de 0,11 M. Entonces se separan aproximadamente 2 μ g a 4 μ g de proteína usando electroforesis en poliacrilamida desnaturizante (gel de acrilamida al 7,5%). El gel obtenido después de la electroforesis en gel de poliacrilamida se somete a autorradiografía. Las proteínas que presentan una señal en la autorradiografía llevan un residuo de fosfato radiactivo.

35 13. *Identificación de las posiciones de átomos de C de las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano en las que residuos de fosfato se introducen por una proteína fosforilante de almidón*

40 Qué posiciones de átomos de C de las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano están fosforiladas por una proteína puede demostrarse de una forma controlada mediante hidrólisis de los glucanos fosforilados obtenidos por medio de una proteína apropiada *in vitro*, posterior separación de los monómeros de glucosa obtenidos después de la hidrólisis, seguido de medición del fosfato incorporado por una proteína apropiada en ciertas fracciones de las moléculas de glucosa.

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

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

55 El sobrenadante neutralizado se centrifuga posteriormente sobre un filtro de 10 kDa. La cantidad de fosfato marcado en el filtrado se determina usando, por ejemplo, un contador de centelleo midiendo una alícuota del filtrado obtenido.

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

60 Los filtrados neutralizados de los productos de hidrólisis obtenidos por medio de la Etapa a) puede separarse (cuando se usa ATP radiactivamente marcado aproximadamente 3000 cpm) usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico a alta presión (HPAE). El filtrado neutralizado puede diluirse con H₂O para obtener el volumen requerido para la HPAE. Además, se añaden glucosa-6-fosfato (aproximadamente 0,15 mM) y glucosa-3-fosfato (aproximadamente 0,3 mM) a los filtrados apropiados en cada caso como control interno. La separación por medio de HPAE puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sistema Dionex DX 600 Bio Lc usando una columna CarboPac PA 100 (con precolumna apropiada) y un detector amperométrico pulsado (ED 50). Como resultado, antes de inyectar la muestra, la columna se aclara primero durante 10 minutos con 99% de eluyente C y 1% de eluyente D. Entonces se inyecta un volumen de muestra de 60 μ l. La elución de la muestra tiene lugar bajo las siguientes condiciones:

ES 2 344 113 T3

Caudal: 1 ml por minuto

Gradiente: aumentando linealmente de 0 minutos a 30 minutos

	Eluyente C	Eluyente D
5		
0 minutos	99%	1%
10		
30 minutos	0%	100%
35 minutos	0%	100%
Ejecución terminada		

15 Los productos de hidrólisis eluidos de la columna se recogen en fracciones individuales de 1 ml cada una. Como, en cada caso, la glucosa-3-fosfato no marcada (Ritte y col. 2002, PNAS 99, 7166-7171) y la glucosa-6-fosfato no marcada (Sigma, nº de prod.: G7879) se han añadido a las muestras inyectadas de productos de hidrólisis como patrones internos, las fracciones que contienen o glucosa-3-fosfato o glucosa-6-fosfato pueden determinarse por medio de
20 detección amperométrica pulsada. Midiendo la cantidad de fosfatos marcados en las fracciones individuales y posteriormente comparando con las fracciones que contienen glucosa-3-fosfato o glucosa-6-fosfato, esto puede usarse para determinar aquellas fracciones que contienen glucosa-6-fosfato marcada o glucosa-3-fosfato marcada. Se determina la cantidad de fosfato marcado en la fracción en cuestión. De las relaciones de las cantidades de glucosa-3-fosfato respecto a glucosa-6-fosfato medidas para el fosfato marcado en los productos de hidrólisis individuales puede determinarse ahora qué posición de átomo de C está preferentemente fosforilada por una enzima fosforilante de alfa-1,4-
25 glucanos.

c) Tampones usados

30 Eluyente C: NaOH 100 mM
Eluyente D: NaOH 100 mM
35 acetato sódico 500 mM

14. Preparación de las muestras para la secuenciación usando EM-Q-TOF-EM

40 a) Observaciones generales

Las proteínas aisladas que también pueden estar presentes en forma de bandas escindidas de geles de poliacrilamida se disocian primero en fragmentos más pequeños por medio de una digestión con tripsina. Los péptidos formados se
45 introducen en un espectrómetro de masas híbrido en el que un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) se acopla a un espectrómetro de masas de cuadrupolo. En la primera fase de la medición, el primer espectrómetro de masas (el cuadrupolo) se “desconecta” y las masas de los péptidos formadas en la digestión pueden determinarse en el espectrómetro de masas de TOF. En la segunda fase se “filtra” un péptido seleccionado en el cuadrupolo, es decir, sólo este péptido puede pasar al cuadrupolo, todos los otros son desviados. Entonces, el péptido se rompe chocando
50 con moléculas de gas cargadas en la “celda de colisión”. En este caso, las “roturas” se producen principalmente en los enlaces peptídicos. Como resultado se forman fragmentos de péptidos distribuidos más o menos estadísticamente que se diferencian en la masa. La secuencia de aminoácidos de los péptidos puede determinarse entonces “clasificando” estos fragmentos. Por tanto, si se obtienen péptidos superpuestos puede obtenerse la secuencia de aminoácidos de una proteína. El uso de espectroscopía de masas para la identificación y secuenciación es conocido para el experto en la materia y se describe suficientemente en la bibliografía especializada [por ejemplo P. Michael Conn (Ed.), 2003, Humana Press, New Jersey, ISBN: 1-58829-340-8]; J.R. Chapman (Ed.), 2000, Humana Press, SBN: 089603609X].
55

b) Reducción y alquilación de residuos de cisteína de proteínas

60 Los residuos de cisteína que contienen las secuencias de aminoácidos de las proteínas que van a analizarse pueden reducirse/alquilarse por medio de electroforesis en gel antes de la separación de las proteínas. Para este fin, las proteínas que van a separarse por medio de electroforesis en gel se mezclan con tampón de muestra de SDS (no debe contener ningún DTT o beta-mercaptoetanol). El DTT recientemente preparado se añade entonces a esas muestras hasta una concentración final de 10 mM y la muestra se incuba durante 3 minutos a 95°C. Después de enfriarse la muestra hasta temperatura ambiente se añade yodoacetamida recientemente preparada hasta una concentración final
65 de 20 mM. La muestra se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Entonces, las proteínas presentes en las muestras se separan por medio de electroforesis en gel de acrilamida.

ES 2 344 113 T3

c) *Aislamiento de las proteínas del gel de acrilamida*

Las bandas de proteínas cuyas secuencias van a determinarse se escinden usando un escalpelo limpio tan “sin filo” como sea posible y se reducen (aproximadamente 1 mm³-cubo). Los trozos de gel reducidos se colocan en un recipiente de reacción de 0,5 ml o 1,5 ml y se sedimentan durante una centrifugación corta.

d) *Decoloración de los trozos de gel escindidos*

Si se usaron geles teñidos usando iones plata, los trozos de gel obtenidos según la Etapa c) se cubren completamente con una disolución que contiene ferricianuro de K 30 mM y tiosulfato de Na 100 mM en la relación 1:1 y se agitan (con vórtex) hasta que los trozos de gel se decoloren completamente. Entonces se elimina la disolución decolorante y los trozos de gel se lavan tres veces con 200 µl de agua de alta pureza en cada caso (conductividad de aproximadamente 18 MOhm).

Si se usaron geles teñidos con azul de Coomassie, los trozos de gel obtenidos según la Etapa c) se incuban con una disolución que contiene agua de alta pureza y acetonitrilo (grado de pureza: al menos puro para HPLC) en la relación 1:1 dos veces durante 15 minutos en cada caso con agitación. El volumen de la disolución decolorante deberá corresponderse con aproximadamente dos veces el volumen del gel. La disolución de lavado se elimina después de cada etapa de lavado.

Después de completarse la decoloración, los trozos de gel se mezclan con un volumen (respecto a los trozos de gel) de acetonitrilo y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. El acetonitrilo se elimina y los trozos de gel se mezclan con un volumen de bicarbonato de amonio 100 mM, se mezclan y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añade acetonitrilo para dar una relación de 1:1 respecto a la cantidad de bicarbonato de amonio y acetonitrilo. La incubación se lleva a cabo durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente antes de eliminar la disolución y los trozos de gel restantes se secan a vacío (por ejemplo, Speedvac).

e) *Digestión con tripsina de las proteínas en los trozos de gel*

La disolución de tripsina (10 ng de tripsina por µl de bicarbonato de amonio 50 mM) se añade en porciones de 10 µl a los trozos de gel secos obtenidos según la Etapa d). Después de cada adición de disolución de tripsina se lleva a cabo la incubación sobre hielo durante 10 minutos en cada caso. La disolución de tripsina se añade en porciones hasta que los trozos de gel no se hinchen más y se cubran completamente por la disolución de tripsina. Entonces, la disolución de tripsina se elimina y los trozos de gel se incuban durante la noche a 37°C.

f) *Aislamiento de los péptidos del gel de acrilamida*

Las muestras obtenidas según la Etapa e) se centrifugan brevemente con el fin de recoger el líquido contenido en el recipiente de reacción, el líquido se elimina y se transfiere a un nuevo recipiente de reacción. Los trozos de gel se tratan durante 2 minutos con ultrasonidos (baño de agua ultrasónico). Entonces, los trozos de gel restantes se mezclan una vez con su volumen de disolución de bicarbonato de amonio 25 mM y se incuban durante 20 minutos con agitación. Entonces se añade acetonitrilo de manera que se ajusta una relación de bicarbonato de amonio respecto a acetonitrilo de 1:1 y la incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos adicionales con agitación. Después de completarse la incubación, las muestras se tratan de nuevo con ultrasonidos durante 2 minutos antes de eliminarse el líquido y se combinan con el líquido que había sido eliminado previamente. Los trozos de gel restantes se mezclan una vez con su volumen de una disolución que contiene ácido fórmico al 5% y acetonitrilo en la relación 1:1 y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. El líquido se elimina y se combina con el líquido que había sido eliminado previamente. Se repite la incubación de los trozos de gel en ácido fórmico al 5% / acetonitrilo (relación 1:1) y el líquido obtenido se añade asimismo a los líquidos previamente recogidos. Los sobrenadantes combinados contienen los péptidos que van a secuenciarse y se concentran a aproximadamente 15 µl en la centrífuga de vacío (Speedvac) a 60°C Los péptidos así obtenidos pueden almacenarse a 20°C hasta que se analicen usando Q-TOF. Antes de que las proteínas puedan secuenciarse en el análisis de masas, pueden desalarse usando procedimientos conocidos para el experto en la materia.

15. *Transformación de plantas de arroz*

Las plantas de arroz se transformaron según los procedimientos descritos por Hiei y col. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282).

16. *Transformación de plantas de patata*

Las plantas de patata se transformaron usando *Agrobacterium* como se describe por Rocha-Sosa y col. (EMBO J. 8, (1989), 23-29).

ES 2 344 113 T3

17. Determinación del contenido de fosfato de almidón

Determinación del contenido de fosfato en C-6

5 En el almidón, las posiciones C2, C3 y C6 de las unidades de glucosa pueden fosforilarse. Se hidrolizaron 50 mg de almidón en 500 μ l de HCl 0,7 M durante 4 h a 95°C para determinar el contenido de P en C6 del almidón. Entonces, las preparaciones se centrifugaron durante 10 min a 15.500 g y los sobrenadantes se eliminaron. De los sobrenadantes, 7 μ l se mezclan con 193 μ l de tampón de imidazol (imidazol 100 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y NAD 0,4 mM). La medición se hizo usando un fotómetro a 340 nm. Después de haberse establecido una
10 absorción base, la reacción de la enzima se empezó añadiendo 2 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (de *Leuconostoc mesenteroides*, Boehringer Mannheim). El cambio en la absorción es directamente proporcional a la concentración del contenido de P en C6 del almidón.

15 b) Determinación del contenido de fosfato total

El contenido de fosfato total se determinó usando el procedimiento de Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

20 Se mezclan aproximadamente 50 mg de almidón con 30 μ l de disolución de nitrato de magnesio en etanol y se reduce a cenizas durante tres horas a 500°C en un horno de mufla. El residuo se mezcla con 300 μ l de ácido clorhídrico 0,5 M y se incuba durante 30 min a 60°C. Entonces, una alícuota se completa hasta 300 μ l de ácido clorhídrico 0,5 M, se añade a una mezcla de 100 μ l de ácido ascórbico al 10% y 600 μ l de molibdato de amonio al 0,42% en ácido sulfúrico 2 M y se incuba durante 20 min a 45°C.

25

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

30 Para determinar el contenido de fosfato unido en la posición C-6 y en la posición C-3 de las moléculas de glucosa de un alfa-1,4-glucano, los glucanos en cuestión pueden separarse usando HPAE después de la hidrólisis total usando el procedimiento especificado en los Procedimientos generales, Punto 13. Las cantidades de glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato pueden determinarse integrando las áreas pico individuales obtenidas después de la separación por HPEA. La cantidad de glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato en las muestras que van a estudiarse puede determinarse comparando el área pico para la glucosa-6-fosfato y la glucosa-3-fosfato obtenidas en las muestras desconocidas con las áreas pico
35 obtenidas después de la separación usando HPAE con cantidades conocidas de glucosa-6-fosfato y glucosa-3-fosfato.

Ejemplos

40 1. Aislamiento de una proteína de *Arabidopsis thaliana* que tiene actividad de unión aumentada con respecto a P-almidón en comparación con almidón no fosforilado

a) Preparación de extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana*

45 Los extractos de proteína se prepararon a partir de aproximadamente 7 g de hojas (peso fresco) de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia, Col-O) según el procedimiento descrito en el Punto 1, Procedimientos generales.

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

50

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

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

Se fosforilaron aproximadamente 30 mg de almidón no fosforilado aislado de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* según el procedimiento descrito en el Punto 7, Procedimientos generales, por medio de una proteína R1 recombinantemente expresada en *E. coli* y se purificaron. Los procedimientos descritos en Ritte y col. (2002, PNAS 99, 7166-7171) se usaron para la expresión de la proteína R1 en *E. coli* y para la posterior purificación.
60

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

65

Los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana* obtenidos según la Etapa a) se incubaron y se lavaron en una Preparación A con 50 mg del almidón fosforilado *in vitro* preparado según la Etapa c) usando el procedimiento descrito en el Punto 8 a), Procedimientos generales.

ES 2 344 113 T3

En una segunda Preparación B, los extractos de proteína de *Arabidopsis thaliana* obtenidos según la Etapa a) se incubaron y se lavaron con 50 mg del almidón no fosforilado preparado según la Etapa b) usando el procedimiento descrito en el Punto 8 a), Procedimientos generales.

- 5 Posteriormente, las proteínas unidas al P-almidón de la Preparación A y al almidón no fosforilado de la Preparación B se disolvieron según el procedimiento descrito en el Punto 8 b), Procedimientos generales.

10 En una tercera Preparación C, 50 mg del almidón fosforilado *in vitro* preparado según la Etapa c) se incubaron y se lavaron usando el procedimiento descrito en el Punto 8 a), Procedimientos generales. Sin embargo, la Preparación C no contuvo extractos de proteína.

e) Separación de las proteínas obtenidas según la Etapa d) por medio de electroforesis en gel de acrilamida

15 Las proteínas de las Preparaciones A, B y C obtenidas en la Etapa d) se separaron por medio de un gel de acrilamida al 9% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS) usando el procedimiento descrito en el Punto 9, Procedimientos generales, y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie. El gel teñido se muestra en la Fig. 1. Puede verse claramente que una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa en gel de acrilamida desnaturalizante referido a un marcador patrón de proteínas (Pista M) se une preferentemente a almidón fosforilado (Pista P) en comparación con almidón no fosforilado (K).

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

25 La banda de la proteína con un peso molecular de aproximadamente 130 kDa identificada en la Etapa e) se escindió del gel. La proteína se liberó posteriormente de la acrilamida como se describe en Procedimientos generales 10 b), se digirió con tripsina y las masas de péptidos obtenidas se determinaron por medio de EM-MALDI-TOF. La llamada “huella dactilar” obtenida por EM-MALDI-TOF se comparó con huellas dactilares de moléculas de aminoácidos teóricamente digeridas en bases de datos (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html; ProFound:http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea:<http://195.41.108.38/PepSealntro.html>).

30 Como una huella dactilar tal es muy específica para una proteína, fue posible identificar una molécula de aminoácidos. Usando la secuencia de esta molécula de aminoácidos fue posible aislar una secuencia de ácidos nucleicos de *Arabidopsis thaliana* que codificaba una proteína OK1. La proteína identificada usando este procedimiento se designó A.t.-OK1. Después de analizar la secuencia de aminoácidos de *Arabidopsis thaliana* se encontró que ésta se desvía de la secuencia presente en la base de datos (NP 198009, NCBI). La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No 2 codifica la proteína A.t.-OK1. La SEQ ID No 2 contiene desviaciones cuando se compara con la secuencia en la base de datos (registro: NP 198009.1, NCBI). Los aminoácidos 519 a 523 (WRLCE) y 762 a 766 (VRARQ) contenidos en SEQ ID No 2 no están en la secuencia que está presente en la base de datos (registro: NP 198009.1). NP 198009.1). En comparación con la versión 2 de la secuencia de la base de datos (registro: NP 198009.2), la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 2 contiene los aminoácidos adicionales 519 a 523 (WRLCE).

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

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

55 La secuencia mostrada en SEQ ID NO 1 no es la misma que la secuencia que está contenida en la base de datos. Esto ya se ha tratado para la secuencia de aminoácidos que codifica una proteína A.t.-OK1.

Condiciones usadas para la amplificación del ADNc que codifica la síntesis de la primera hebra de la proteína A.t.-OK1:

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

3 µg ARN total

65 5 µM cebador de 3' (OK1 rev1:5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM mezcla dNTP

ES 2 344 113 T3

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

Entonces se añadieron el tampón de la 1ª hebra, inhibidor de RNasa y DTT y se incubaron durante 2 minutos a 42°C antes de añadir 1 µl de ADN polimerasa Superscript RT y la preparación de reacción se incubó durante 50 minutos a 42°C.

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

10 1 µl de la preparación de reacción de la síntesis de la primera hebra
0,25 µM cebador de 3' (OK1 rev2:5' - TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)
0,25 µM cebador de 5' (OK1 fwd2:5' - ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Condiciones de reacción:

20	Etapas 1	95°C	2 min
	Etapas 2	94°C	20 s
	Etapas 3	62°C	30 s
25	Etapas 4	68°C	4 minutos
	Etapas 5	94°C	20 s
	Etapas 6	56°C	30 s
30	Etapas 7	68°C	4 minutos
	Etapas 8	68°C	10 minutos

35 La reacción se llevó a cabo primero según las Etapas 1 a 4. Se llevaron a cabo diez repeticiones (ciclos) entre la Etapa 4 y la Etapa 2, reduciéndose la temperatura de la Etapa 3 0,67°C después de cada ciclo. Esto fue seguido posteriormente por la reacción según las condiciones especificadas en la Etapa 5 a 8. Se llevaron a cabo veinticinco repeticiones (ciclos) entre la Etapa 7 y Etapa 5, disminuyéndose el tiempo de la Etapa 7 5 s en cada ciclo. Al completarse la reacción, la reacción se enfrió hasta 4°C.

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

45 Tras la amplificación por medio de PCR usando el plásmido A.t.-OK1-pGEM® como molde usando Gateway Technology (Invitrogen), la secuencia que codifica la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* se clonó primero en el vector pDONOR™ 201 (nº de prod. de Invitrogen: 11798-014). Posteriormente, la región codificante de la proteína OK1 del vector obtenido se clonó por recombinación específica de secuencia en el vector de expresión pDEST™17 (nº de prod. de Invitrogen: 11803-014). El vector de expresión obtenido se designa A.t.-OK1-pDEST™1. La clonación dio como resultado una fusión traduccional del ADNc que codifica la proteína A.t.-OK1 con los nucleótidos presentes en el vector de expresión pDEST™7. Los nucleótidos que se originan a partir del vector pDEST™17, que se fusionan traduccionalmente con el ADNc que codifica la proteína A.t.-OK1, codifican 21 aminoácidos. Estos 21 aminoácidos incluyen, entre otros, el codón de iniciación (ATG) y una llamada marca His (6 residuos de histidina directamente sucesivos). Después de la traducción de estas secuencias traduccionalmente fusionadas, esto da como resultado una proteína A.t.-OK1 que tiene los 21 aminoácidos adicionales codificados por nucleótidos que se originan a partir del vector en su extremo N. Por tanto, la proteína A.t.-OK1 recombinante resultante de este vector contiene 21 aminoácidos adicionales que se originan a partir del vector pDEST™17 en su extremo N.

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

El vector de expresión A.t.-OK1-pDEST™17 obtenido según el Ejemplo 3 se transformó en la cepa BL21 Star™ (DE3) de *E. coli* (Invitrogen, nº de prod. C6010-03). Una descripción de este sistema de expresión ya se ha facilitado anteriormente (véase el Punto 3, Procedimientos generales). Los clones de bacterias que contienen el vector A.t.-OK1-pDEST™17 resultante de la transformación se usaron primero para preparar un cultivo preliminar que posteriormente se usó para inocular un cultivo principal (véase el Punto 3.c, Procedimientos generales). El cultivo preliminar y el cultivo principal se incubaron cada uno a 30°C con agitación (250 rpm). Cuando el cultivo principal hacía alcanzado una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8, la expresión de la proteína A.t.-OK1 recombinante se indujo mediante la adición

ES 2 344 113 T3

de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) hasta que se logró una concentración final de 1 mM. Después de la adición de IPTG, el cultivo principal se incubó a 30°C con agitación (250 rpm) hasta que se logró una DO₆₀₀ de aproximadamente 1,8. Entonces, el cultivo principal se enfrió durante 30 minutos sobre hielo antes de separarse las células del cultivo principal del medio de cultivo por centrifugación (10 minutos a 4.000xg y 4°C).

5

5. Purificación de la proteína OK1 recombinantemente expresada

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

10

6. Demostración de la actividad fosforilante de almidón de la proteína OK1

La actividad fosforilante de almidón de la proteína A.t.-OK1 se demostró según el procedimiento descrito en el Punto 11, Procedimientos generales. Como resultado, 5 µg de proteína A.t.-OK1 purificada preparada según el Ejemplo 5 se incubaron en cada caso en una Preparación A con 5 mg de almidón aislado de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* según el Ejemplo 1 b) y en una Preparación B con 5 mg de almidón obtenido por fosforilación enzimática según el Ejemplo 1 c), en cada caso en 500 µl de tampón de fosforilación que contenía ATP aleatorizado radiactivamente marcado (³³P) 0,05 mM (en total 1.130,00 cpm, aproximadamente 0,55 µCi) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Como control se usó una Preparación C que se corresponde con la Preparación B, pero que no contenía proteína OK1, pero que por lo demás se trató del mismo modo que las Preparaciones A y B. Para todas las Preparaciones (A, B, C) se llevaron a cabo dos pruebas independientemente entre sí en cada caso.

20

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

25

30

TABLA 1

Demostración de la actividad fosforilante de almidón de la proteína OK1

35

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

40

45

A partir de los resultados obtenidos puede verse que la proteína OK1 no transfiere grupos fosfato del ATP al almidón cuando el almidón no fosforilado se proporciona como sustrato ya que el cupo de grupos fosfato transferidos al almidón no fosforilado por medio de una proteína OK1, medidos en cpm, no supera el cupo de grupos fosfato radiactivamente marcados en la Preparación C (control). Si, por otra parte, el P-almidón se proporciona como sustrato, el cupo de grupos fosfato radiactivos, medidos en cpm, que se transfieren del ATP al P-almidón es significativamente superior. De esto puede verse que la proteína OK1 requiere P-almidón como sustrato y que el almidón no fosforilado no es aceptado como sustrato por la proteína OK1.

50

Si la prueba descrita anteriormente se lleva a cabo con ATP específicamente marcado en la posición gamma con ³³P, entonces no es posible establecer ninguna incorporación de fosfato radiactivamente marcado en el almidón. A partir de esto puede verse que el residuo de fosfato beta ATP se transfiere de una proteína OK1 al almidón. Los resultados de un prueba tal se muestran en la Fig. 6.

55

60 7. Demostración de la autofosforilación

La autofosforilación de la proteína A.t.-OK1 se demostró por medio de los procedimientos descritos anteriormente (véase el Punto 12, Procedimientos generales). Aquí, 50 µg de proteína A.t.-OK1 purificada se incubaron con ATP aleatorizado radiactivamente marcado en 220 µl de tampón de fosforilación (véase antes, Punto 12 d), Procedimientos generales) a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación. Posteriormente, en cada caso se eliminaron 100 µl de las preparaciones de incubación y se transfirieron a cuatro recipientes de reacción frescos. En el recipiente de reacción 1, la reacción se detuvo mediante la adición de 40 µl de EDTA 0,11M. El recipiente de reacción 2 se incubó a 95°C durante 5 minutos. Se añadió HCl al recipiente de reacción 3 hasta una concentración final de 0,5 M y se

65

añadió NaOH al recipiente de reacción 4 hasta una concentración final de 0,5 M. Los recipientes de reacción 3 y 4 se incubaron cada uno durante 25 minutos a 30°C. Posteriormente, en cada caso se eliminaron 50 μ l de los recipientes de reacción 1, 2, 3 y 4, se mezclaron con tampón de prueba de SDS y se separaron por medio de electroforesis en gel de acrilamida SDS (gel de acrilamida al 7,5%). Para este fin, las muestras de los recipientes de reacción se aplicaron a cada uno de los dos geles de acrilamida idénticos. Uno de los geles obtenidos al completarse la electroforesis se sometió a autorradiografía, mientras que el segundo gel se tiñó con azul de Coomassie.

En el gel teñido con azul de Coomassie (véase Fig. 2A)) puede verse claramente que el tratamiento con NaOH 0,5 M conduce a la degradación de la proteína OK1. Por tanto, la proteína OK1 debe describirse como inestable hacia NaOH. Las incubaciones a 30°C, 95°C y con HCl 0,5 M muestran que la proteína OK1 es relativamente estable bajo las condiciones de incubación expuestas. Esto puede concluirse del hecho que, bajo estas condiciones de incubación, en cada caso pueden demostrarse aproximadamente las mismas cantidades de proteína OK1 en el gel en cuestión después de teñir con azul de Coomassie.

En la autorradiografía (véase Fig. 2B)) puede verse en comparación con la proteína OK1 fosforilada incubada a 30°C que una incubación de la proteína OK1 fosforilada a 95°C conduce a una reducción significativa en el fosfato que se ha unido a la proteína OK1. Por tanto, la unión entre el residuo de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 puede describirse como inestable al calor. Además, una ligera reducción del fosfato unido a la proteína OK1 también puede verse para la incubación con HCl 0,5 M y NaOH 0,5 M en comparación con proteína OK1 fosforilada incubada a 30°C. Si el hecho tiene en cuenta que la cantidad de proteína OK1 en la autorradiografía después del tratamiento con NaOH 0,5 M es significativamente menos que en las muestras tratadas con calor y ácido debido a la inestabilidad de la proteína OK1 hacia NaOH, entonces puede concluirse que la unión entre el residuo de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 será relativamente estable con respecto a las bases. Como la muestra tratada con ácido contiene aproximadamente las mismas cantidades de proteína que las muestras incubadas a 30°C y a 95°C, y tiene todavía una señal significativamente inferior en la autorradiografía que la muestra tratada a 30°C, debe asumirse que las condiciones de incubación en ácido también dividen el enlace entre un residuo de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 hasta un cierto grado. Por tanto, también podría establecerse una inestabilidad de la unión entre un residuo de fosfato y un aminoácido de la proteína OK1 en las pruebas llevadas a cabo. Al mismo tiempo, la inestabilidad con respecto a ácidos es significativamente menos marcada que la inestabilidad con respecto al calor.

La unión entre el aminoácido histidina y fosfato es inestable al calor, inestable a ácidos, pero estable a bases (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Por tanto, los resultados descritos anteriormente son una indicación de que se produce una fosfohistidina por la autofosforilación de una proteína OK1.

Si la proteína OK1 recombinantemente expresada se incubaba como se describe anteriormente con ATP específicamente marcado con ^{33}P en la posición gamma, no puede establecerse autofosforilación. La Fig. 5 A) muestra la cantidad de proteína que puede detectarse en la preparación de reacción respectiva por medio de análisis de transferencia de Western después de las etapas de incubación relevantes. La Fig. 5 B) muestra una autorradiografía de proteína de las preparaciones de reacción individuales. Puede verse que, cuando se usa ATP específicamente marcado en la posición gamma, no puede demostrarse autofosforilación de la proteína OK1, mientras que cuando se usa ATP aleatorizado puede demostrarse autofosforilación. Esto significa que cuando se autofosforila una proteína OK1, el residuo de fosfato de la posición beta del ATP está unido covalentemente a un aminoácido de la proteína OK1.

8. Demostración de las posiciones de átomos de C que están fosforiladas por una proteína OK1 de las moléculas de glucosa de almidón

a) Preparación de almidón fosforilado

El almidón fosforilado se preparó según el Punto 7, Procedimientos generales. Para hacer esto, 5 mg de almidón no fosforilado aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* se usaron en una Preparación A con 25 μ g de proteína A.t.-OK1 purificada y, en una segunda Preparación B, 5 mg de almidón fosforilado *in vitro* originalmente aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* se usaron con 5 μ g de proteína R1 purificada. La reacción se llevó a cabo en 500 μ l de tampón de fosforilación en cada caso que en cada caso contuvo ATP marcado con ^{33}P (aproximadamente $2,5 \times 10^6$ cpm), incubando a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Además, se usó una preparación de control que contenía 5 mg de almidón aislado de hojas de un mutante *sex1-3* de *Arabidopsis thaliana* y dicho tampón de fosforilación, pero no proteína. La preparación de control se trató de exactamente la misma forma que las Preparaciones A y B. Las reacciones individuales se detuvieron añadiendo 125 μ l de SDS al 10% en cada caso y el lavado se llevó a cabo una vez con SDS al 2%, cinco veces con ATP 2 mM y dos veces con H₂O, usando 900 μ l en cada caso. La centrifugación se llevó a cabo después de cada etapa de lavado (2 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf a 13.000 rpm en cada caso). Los sedimentos de almidón obtenidos se resuspendieron en 1 ml de H₂O en cada caso y se mezclaron 100 μ l de cada preparación después de la adición de 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) y posteriormente se midieron usando un contador de centelleo (contador de centelleo LS 6500 Multi-Purpose, BECKMANN COULTER™).

ES 2 344 113 T3

La medición dio los siguientes resultados:

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

b) Hidrólisis total del P-almidón

Las suspensiones de las Preparaciones A, B y C obtenidas según la Etapa a) se centrifugaron de nuevo (5 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf a 13.000 rpm), los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 90 μ l de HCl 0,7 M (Baker, para análisis) y posteriormente se incubaron durante 2 horas a 95°C. Entonces, las Preparaciones A, B y C se centrifugaron de nuevo (5 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf a 13.000 rpm) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo recipiente de reacción. Los residuos sedimentados de las preparaciones se resuspendieron en 100 ml de H₂O en cada caso y después de la adición de 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) se midieron usando un contador de centelleo (contador de centelleo LS 6500 Multi-Purpose, BECKMANN COULTER™). No pudieron demostrarse cantidades significativas de radiactividad en ninguno de los residuos, que significa que todos los productos de hidrólisis marcados con fosfato radiactivo se localizan en el sobrenadante.

Esto se siguió de neutralización de los sobrenadantes individuales que contenían los productos de hidrólisis mediante la adición en cada caso de 30 μ l de NaOH 2 M (la cantidad de NaOH requerida para la neutralización se probó por adelantado en muestras blancas). Los productos de hidrólisis neutralizados se colocaron en un filtro Microcon de 10 kDa que había sido previamente aclarado dos veces con 200 μ l de H₂O en cada caso, y se centrifugaron durante aproximadamente 25 minutos a 12.000 rpm en una centrífuga de mesa Eppendorf. Se tomaron 10 μ l del filtrado obtenido (aproximadamente 120 μ l en cada caso) y, después de la adición de 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN), se midieron usando un contador de centelleo (contador de centelleo LS 6500 Multi-Purpose, BECKMANN COULTER™). La determinación de la actividad presente en las preparaciones individuales dio los siguientes resultados:

Preparación A (OK1):	934 cpm/10 μ l	11,208 cpm/120 μ l	93 cpm/ μ l
Preparación B (R1):	2518 cpm/10 μ l	30,216 cpm/120 μ l	252 cpm/ μ l

c) Separación de los productos de hidrólisis

Los productos de hidrólisis obtenidos según la Etapa b) se separaron por medio de HPAE usando un sistema Dionex en las condiciones explicadas anteriormente (véase Procedimientos generales, Punto 13 c)). Las muestras para separar los sobrenadantes filtrados de las Preparaciones A y B obtenidas según la Etapa b) se compusieron del siguiente modo:

Preparación A (OK1): 43 μ l del sobrenadante de la Preparación A obtenido según la Etapa b) (equivalente a aproximadamente 4.000 cpm), 32 μ l de H₂O, 2,5 μ l de glucosa-6-fosfato 2,5 mM y 2,5 μ l de glucosa-3-fosfato 5 mM (Σ volumen = 80 μ l).

Preparación B (R1): 16 μ l del sobrenadante de la Preparación B obtenido según la Etapa b) (equivalente a aproximadamente 4.000 cpm), 59 μ l de H₂O, 2,5 μ l de glucosa-6-fosfato 2,5 mM y 2,5 μ l de glucosa-3-fosfato 5 mM (Σ volumen = 80 μ l).

En cada caso se inyectaron 60 μ l que contenían aproximadamente 3.000 cpm de las muestras correspondientes para la separación usando HPAE. La HPAE se llevó a cabo según las condiciones especificadas en el Punto 23 c)). Después de pasar a través de la columna de HPAE, el tampón de elución se recogió en fracciones, cada una de 1 ml. La recogida de las fracciones empezó 10 minutos después de inyectar la muestra. Basándose en la señal recibida del detector PAD usado, la elución de glucosa-6-fosfato se asignó a la fracción 15 y la elución de glucosa-3-fosfato a la fracción 17. En cada caso, 500 μ l de las fracciones individuales se mezclaron con 3 ml de mezcla de centelleo (Ready Safe™, BECKMANN) y posteriormente se midieron usando un contador de centelleo (contador de centelleo LS 6500 Multi-Purpose, BECKMANN COULTER™). Se obtuvieron las siguientes mediciones para las fracciones individuales:

ES 2 344 113 T3

TABLA 4

Cantidades medidas de radiactividad [cpm] en fracciones individuales de productos de hidrólisis obtenidos mediante hidrólisis de almidón fosforilado por medio de una proteína OK1 o proteína R1

		Preparación A (OK1)	Preparación B (R1)
5			
10	Fr 13	8,7	3,3
	Fr 14	13,1	32,2
	Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
15	Fr 16	3998	112,3
	Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
	Fr 18	196,7	17,3
20	Fr 19	6,7	18,9
	Total	2581,5	2938,3
	Depósito	3000,0	3000,0
25	Recuperación	86,0%	97,9%

Los resultados también se muestran gráficamente en la Fig. 5.

Después de la fosforilación de almidón catalizada por la proteína R1, aproximadamente el 66% del fosfato radiactivamente marcado, referido al fosfato radiactivo medido total en las fracciones analizadas, se eluyó después de hidrolizar el almidón con la fracción que contenía glucosa-6-fosfato como patrón, y aproximadamente el 27% con la fracción que contenía glucosa-3-fosfato como patrón. Después de la fosforilación de almidón catalizada por la proteína OK1, aproximadamente el 67% del fosfato radiactivamente marcado, referido al fosfato radiactivo medido total en las fracciones analizadas, se eluyó después de hidrolizar el almidón con la fracción que contenía glucosa-3-fosfato como patrón, y aproximadamente el 8% con la fracción que contenía glucosa-6-fosfato como patrón. A partir de esto puede concluirse que las moléculas de glucosa del almidón de las proteínas R1 están preferentemente fosforiladas en la posición C-6, mientras que las moléculas de glucosa de las proteínas OK1 del almidón están preferentemente fosforiladas en la posición C-3.

9. Identificación de una proteína OK1 en arroz

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

Preparación del plásmido pMI50 que contiene la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína OK1 de *Oryza sativa*

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

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

La parte del marco de lectura abierto de la posición -11 a la posición 288 de la secuencia especificada en SEQ ID NO 3 se amplificó usando transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos sintéticos Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) y Os_ok1-F6 (AAAACCTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) como cebador en ARN de semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pML123.

ES 2 344 113 T3

La parte del marco de lectura abierto de la posición 250 a la posición 949 de la secuencia especificada en SEQ ID NO 3 se amplificó usando transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos sintéticos Os_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) y Os_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) como cebador en ARN de semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pML120.

La parte del marco de lectura abierto de la posición 839 a la posición 1761 de la secuencia especificada en SEQ ID NO 3 se amplificó usando transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos sintéticos Os_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) y Os_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) como cebador en ARN de semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pML121.

La parte del marco de lectura abierto de la posición 1571 a la posición 3241 de la secuencia especificada en SEQ ID NO 3 se amplificó usando transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos sintéticos Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) y Os_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) como cebador en ARN de semillas de arroz inmaduras. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pML119.

La parte del marco de lectura abierto de la posición 2777 a la posición 3621 se amplificó usando reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos sintéticos Os_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) y Os_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) como cebador en ADN genómico de arroz. El fragmento de ADN amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pML122.

El clonar juntas las subpartes del marco de lectura abierto de OK1 se llevó a cabo del siguiente modo.

Un fragmento ApaI de 700 pares de bases de longitud de pML120 que contenía parte del marco de lectura abierto de OK1 se clonó en el sitio ApaI de pML121. El plásmido obtenido se designó pMI47.

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

Un fragmento de 845 pares de bases de longitud de pML122 se reamplificó para introducir un sitio *XhoI* después del codón de terminación con los cebadores Os_ok1-F3 (véase anteriormente) y Os_ok1-R2Xho (AAAACCTCGAGC TATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) y se clonó en el vector pCR2.1 (número de catálogo de Invitrogen K2020-20). El plásmido obtenido se designó pMI45.

Un fragmento de 1671 pares de bases de longitud que contenía parte del marco de lectura abierto de OK1 se obtuvo a partir de pML119 digiriendo con las enzimas de restricción *SpeI* y *PstI*. El fragmento se clonó en pBluescript II SK+ (registro de Genbank: X52328). El plásmido obtenido se designó pMI46.

Un fragmento de 1706 pares de bases de longitud que contenía parte del marco de lectura abierto de OK1 se escindió con las enzimas de restricción *SpeI* y *XhoI* a partir de pMI46 y se clonó en el vector pMI45 que había sido escindido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se designó pMI47.

Un fragmento de 146 pares de bases de longitud que contenía parte del marco de lectura abierto de OK1 se escindió con las enzimas de restricción *AflIII/NotI* a partir de pMI43 y se clonó en el vector pMI44 que había sido escindido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se designó pMI49.

Un fragmento de 1657 pares de bases de longitud que contenía parte del marco de lectura abierto de OK1 se escindió con las enzimas de restricción *NotI* y *NarI* a partir del vector pMI49 y se clonó en el vector pMI47 que había sido escindido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido obtenido se designó pMI50 y contiene la región codificante completa de la proteína OK1 identificada en arroz.

10. Identificación de otras proteínas OK1 de diversas especies vegetales

Usando los procedimientos descritos en los Puntos 1 a 13, Procedimientos generales, las proteínas que transfieren un residuo de fosfato de ATP a P-almidón también se identificaron en cebada (*Hordeum vulgare*), patata (*Solanum tuberosum*), trigo (*Triticum aestivum*) y mijo (*Sorghum bicolor*). El almidón no fosforilado no es usado como sustrato por estas proteínas, es decir, estas proteínas requieren P-almidón como sustrato.

Las proteínas se aislaron usando el procedimiento descrito en el Punto 14, Procedimientos generales, se digirieron con tripsina, se disolvieron del gel y se secuenciaron usando EM-Q-TOF-EM. Usando las secuencias de péptidos

ES 2 344 113 T3

obtenidos fue posible determinar secuencias de ácidos nucleicos EST que codificaban las proteínas OK1 relevantes de cebada, patata, trigo o mijo por medio de comparaciones de bases de datos (búsquedas con Blast).

5 La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 9 codifica una parte de una proteína OK1 de cebada y se rastreó bajo el n° de “registro”: TC117610 en la base de datos TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) por medio de una comparación de bases de datos (búsqueda con Blast). Aquellos péptidos que se obtuvieron secuenciando la proteína OK1 aislada de cebada usando EM-Q-TOF-EM y se usaron para identificar la secuencia de ácidos nucleicos EST mostrada en SEQ ID NO 9 se especifican en SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 10 codifica una parte de una proteína OK1 de cebada y puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 10.

15 La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 15 codifica una parte de una proteína OK1 de patata y se encontró bajo el n° de “registro”: BFO54632 en la base de datos TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) por medio de una comparación de bases de datos (búsqueda con Blast). Aquellos péptidos que se obtuvieron secuenciando la proteína OK1 aislada de patata usando EM-Q-TOF-EM y se usaron para identificar la secuencia de ácidos nucleicos EST mostrada en SEQ ID NO 15 se especifican en SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 y SEQ ID NO 14. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 16 codifica una parte de una proteína OK1 de patata y puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 15.

20 La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 21 codifica una parte de una proteína OK1 de mijo y se encontró bajo el n° de “registro”: TC77219 en la base de datos TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) por medio de una comparación de bases de datos (búsqueda con Blast). Aquellos péptidos que se obtuvieron secuenciando la proteína OK1 aislada de mijo usando EM-Q-TOF-EM y se usaron para identificar la secuencia de ácidos nucleicos EST mostrada en SEQ ID NO 21 se especifican en SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 19 y SEQ ID NO 20. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 22 codifica una parte de una proteína OK1 de mijo y puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 21.

30 La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 25 codifica una parte de una proteína OK1 de trigo y se encontró bajo el n° de “registro”: CA74319 en la base de datos TIGR (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) por medio de una comparación de bases de datos (búsqueda con Blast). Aquellos péptidos que se obtuvieron secuenciando la proteína OK1 aislada de trigo usando EM-Q-TOF-EM y se usaron para identificar la secuencia de ácidos nucleicos EST mostrada en SEQ ID NO 25 se especifican en SEQ ID NO 23 y SEQ ID NO 24. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO 26 codifica una parte de una proteína OK1 de trigo y puede derivarse de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEQ ID NO 25.

35 Los siguientes parámetros se seleccionaron para llevar a cabo las comparaciones de bases de datos:

Programa:	tblastn
40 Matriz:	blosum62
Esperado:	100
Ecofiltro:	inutilizado
45 Descripciones:	20

50 Todos los otros parámetros marcan “por defecto”.

11. Preparación de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína OK1

55 Como antígeno, aproximadamente 100 μ g de proteína A.t.-OK1 purificada se separaron por medio de electroforesis en gel de SDS, las bandas de proteína que contenían la proteína A.t.-OK1 se escindieron y se enviaron a la empresa EUROGENTEC S.A. (Bélgica) que llevó a cabo por contrato la preparación del anticuerpo. Primero, los sueros preinmunes de conejos se investigaron para ver si ya reconocerían una proteína de un extracto total de A. t. antes de la inmunización con OK1 recombinante. Los sueros preinmunes de dos conejos no reconocieron proteínas en el intervalo 100-150 kDa y, por tanto, se eligieron para la inmunización. A cada conejo se le administraron cuatro inyecciones de 100 μ g de proteína (día 0, 14, 28, 56). De cada conejo se tomaron cuatro muestras de sangre: (día 38, día 66, día 87 y el sangrado final). El suero obtenido después del primer sangrado ya mostró una reacción específica con antígeno de OK1 en transferencia de Western. Sin embargo, en todas las otras pruebas se usó el sangrado final de un conejo.

65

ES 2 344 113 T3

12. Preparación de plantas de arroz transgénicas que tienen una actividad elevada o reducida de una proteína OK1

a) Preparación del plásmido pGlo-A.t.-OK1

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

10 El plásmido pIR115 se obtuvo clonando un trozo sintético de ADN constituido por los dos oligonucleótidos X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTTAC) y X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) en el vector pGSV71 escindido con SdaI y MuiI.

15 El plásmido pIR115 obtenido se escindió con SdaI, los extremos de 3' protuberantes se suavizaron con T4 ADN polimerasa y se insertó un fragmento *HindIII/SphI* de 197 pares de bases a partir de pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), suavizado por medio de T4 ADN polimerasa y conteniendo la señal de terminación del gel de la octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido obtenido se designó pIR96.

20 El plásmido pIR103 se obtuvo clonando un fragmento de ADN de 986 pares de bases de longitud a partir de pIR94 que contenía el promotor del gen de globulina de arroz en el plásmido pIR96.

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

30 pGSV7 contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (Bolívar y col., Gene 2, (1977), 95-113), además del origen de replicación del plásmido de *Pseudomonas* pVS1 (Itoh y col., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 también contiene el gen del marcador de selección *aadA*, a partir del transposón Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae*, que confiere resistencia a los antibióticos espectinomomicina y estreptomomicina (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky y Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40).

35 El plásmido pGSV71 se obtuvo clonando un gen *bar* quimérico entre la región fronteriza pGSV7. El gen *bar* quimérico contiene la secuencia de promotor del virus del mosaico de la coliflor para la iniciación de la transcripción (Odell y col., Nature 313, (1985), 180), el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson y col., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) y la región sin traducir de 3' del gen de la nopalina sintasa del ADN-T de pTiT37 para la terminación de la transcripción y poliadenilación. El gen *bar* proporciona tolerancia contra el herbicida glufosinato de amonio.

40 Un fragmento de ADN que contiene el marco de lectura abierto completo de la proteína OK1 de *Arabidopsis* se escindió del vector A.t.-ok1-pGEM-T y se clonó en el vector pIR103. Para este fin, el plásmido A.t.-OK1-pGEM-T se escindió con la enzima de restricción *Bsp120I*, los extremos se suavizaron con T4-ADN polimerasa y posteriormente se escindieron con *SalI*. El fragmento de ADN que codifica la proteína OK1 de *Arabidopsis thaliana* se clonó en el vector pIR103 escindido con *Ecl136II* y *XhoI*. El plásmido obtenido se designó pGlo-A.t.-OK1.

b) Preparación de un constructo para inhibir la proteína OK1 en arroz por medio de tecnología de ARNi

50 El plásmido pML125 que se usó para la transformación de plantas de arroz se obtuvo mediante recombinación específica de los plásmidos pML124 y pIR115 usando el sistema de clonación GatewayTM (Invitrogen).

55 pML124 se obtuvo clonando un fragmento de ADN de 359 pares de bases de longitud de pML119 (véase anteriormente, Ejemplo 9) que contenía parte del marco de lectura abierto que codifica la proteína OK1 de arroz en el vector pENTR-1A (Invitrogen, número de producto 11813-011) escindido con *EcoRI*.

60 El plásmido pIR87 se obtuvo amplificando el intrón 1 del gen que codifica la alcohol hidrogenasa de maíz con los cebadores Adh(i)-1 (TTTTCTCGAGGTCCGCCTTGTTCCT) y Adh(i)-2 (TTTTCTCGAGCTGCACGGGTC CAGGA) en el ADN genómico de maíz. El producto de la reacción en cadena de la polimerasa (30 x 30 s 94°C, 30 s 59°C, 1 min 72°C, MgCl₂ 2,5 mM) se digirió con la enzima de restricción *XhoI* y se clonó en el vector pBluescript II SK+ (registro de Genbank: X52328), que había sido escindido con la misma enzima.

65 Un fragmento de ADN de 986 pares de bases de longitud a partir de pIR94 que contenía el promotor del gen de globulina de arroz se clonó en el vector pIR96. El plásmido obtenido se designó pIR103.

El plásmido pIR107 se obtuvo clonando el "casete Rfa" (véase anteriormente) en el plásmido pIR103 escindido con la enzima de restricción *EcoRV*.

ES 2 344 113 T3

Un fragmento de 540 pares de bases de longitud que contenía el intrón 1 del gen que codificaba la alcohol deshidrogenasa de maíz se escindió del plásmido pIR87 con la enzima de restricción XhoI y se clonó en el plásmido pIR107, asimismo escindido con XhoI. El plásmido obtenido se designó pIR114. El plásmido pIR115 se obtuvo clonando el “casete Rfa” (véase anteriormente) en el plásmido pIR114 escindido con *Ecl*136II.

5

c) Transformación de plantas de arroz

Se transformaron plantas de arroz (variedad M202) usando *Agrobacterium* (que contiene tanto el plásmido pGlo-A.t.-OK1 como el plásmido pML125) usando el procedimiento descrito en Hiei y col. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282).

10

d) Análisis de las plantas de arroz transgénicas que expresaron la proteína A.t.-OK1 y el almidón sintetizado por estas plantas

15

Las plantas transformadas con el plásmido pGlo-A.t.-OK1 que presentaron una expresión de la proteína A.t.-OK1 heteróloga se identificaron por medio de un análisis de transferencia de Northern.

20

Las plantas que presentaron una cantidad detectable de ARNm que codifica la proteína A.t.-OK1 se cultivaron en el invernadero. Los granos de estas plantas se recogieron. El almidón de estos granos mostró un contenido elevado de fosfato unido covalentemente al almidón en cuestión.

25

e) Análisis de las plantas de arroz transgénicas en las que la expresión de la proteína OK1 endógena se reprimió por medio de tecnología de ARNi y el almidón sintetizado a partir de estas plantas

Plantas de arroz que se transformaron con el plásmido pML125 y presentaron una expresión reducida del ARNm endógeno que codifica la proteína OK1 se identificaron por medio de análisis de transferencia de Northern.

30

13. Preparación de plantas de patata transgénicas que tienen una actividad elevada o reducida de una proteína OK1

a) Preparación del plásmido pBinB33-Hyg

35

A partir del plásmido pBinB33, el fragmento *Eco*RI-*Hind*III que incluye el promotor B33, una parte del poliligador y el terminador ocs se escindieron y se ligaron en el vector correspondientemente escindido pBIB-Hyg (Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203). Acids Res. 18, 203).

40

El plásmido pBinB33 se obtuvo ligando el promotor del gen de la patatina B33 a partir de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa y col., 1989) como un fragmento Dral (nucleótido - 1512 - +14) en el vector pUC19 escindido con *Sst*I cuyos extremos habían sido suavizados usando T4 ADN polimerasa. Esto dio como resultado el plásmido pUC19-B33. El promotor B33 se escindió de este plásmido con *Eco*RI y *Sma*I y se ligó en el vector correspondientemente escindido pBinAR (Höfgen y Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230). Esto dio como resultado el vector de expresión vegetal pBinB33.

45

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

50

La secuencia codificante de la proteína A.t.-OK1 se escindió con las endonucleasas de restricción *Bsp*120I y *Sal*I a partir del plásmido OK1-pGEM y se ligó en el vector pBinB33-Hyg escindido con *Sma*I y *Sal*I. El plásmido obtenido se designó A.t.-OK1-pBinB33-Hyg.

55

c) Transformación de plantas de patata

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV2260) con el plásmido A.t.-OK1-pBinB33-Hyg. Entonces, las plantas de patata de la variedad Désirée se transformaron usando agrobacterias que contenían el plásmido A.t.-OK1-pBinB33-Hyg usando el procedimiento descrito en Rocha-Sosa y col. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) y se regeneraron las plantas. Las plantas obtenidas de este acontecimiento de transformación se designaron 385JH.

60

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

65

Las plantas que presentaron una elevada actividad de la proteína A.t.-OK1 heterológamente expresada y también plantas en las que la actividad de la proteína OK1 endógena se redujo por un efecto de cosupresión se identificaron por medio de un análisis de transferencia de Western. El análisis de transferencia de Western se llevó a cabo usando el anticuerpo descrito en el Ejemplo 11.

ES 2 344 113 T3

La Fig. 7 muestra a modo de ejemplo la detección de la proteína A.t.-OK1 en plantas individuales a partir del acontecimiento de transformación 385JH por medio de análisis de transferencia de Western. Para la inducción del promotor B33 en tejido de hojas, líneas individuales del acontecimiento de transformación 385JH se cultivaron sobre medio Murashige Skoog solidificado que contenía sacarosa 100 mM en cultivo de tejido durante dos días. Después de la recogida, los extractos de proteína se produjeron a partir de tejido de hojas de estas plantas según el procedimiento descrito en Procedimientos generales, Punto 1a). Después de la separación de las proteínas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante se analizaron 40 µg de extracto de proteína de cada línea por medio de análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo descrito en los Ejemplos, Punto 10. Como muestras de control también se analizaron extractos de proteína de plantas de *Arabidopsis* y de plantas naturales de patata (cv Désirée).

Las plantas que presentaron una elevada cantidad de la proteína A.t.-OK1 en comparación con las plantas naturales correspondientes se cultivaron en el invernadero. El almidón que se aisló de tubérculos de estas plantas mostró un contenido elevado de fosfato unido covalentemente al almidón en comparación con el almidón aislado de plantas naturales no transformadas.

14. *Análisis de plantas de Arabidopsis thaliana que presentan una actividad reducida de una proteína según la invención*

Los mutantes de inserción de ADN-T de *Arabidopsis thaliana* (disponible del Laboratorio de análisis genómicos del Instituto Salk, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/> bajo el número de registro: Salk_110814, Alias N610814) que eran homocigóticos con respecto a la inserción en el gen de OK1 se cultivaron bajo las siguientes condiciones:

Fase de luz:	16 horas, 20°C
Fase de oscuridad:	8 horas, 16°C

Poco antes de desarrollarse las flores, las plantas se cultivaron en una fase de luz de 12 horas a 20°C y una fase de oscuridad de 12 horas a 17°C.

Las plantas de la línea mutante obtenida (Salk_110814) se cultivaron a partir de 3 semillas diferentes del material de semilla original (Salk_110814-1, Salk_110814-2, Salk_110814-3) para análisis.

Al final de la fase de oscuridad, 10 hojas se eliminaron en cada caso de 6 plantas naturales (ecotipo Columbia) y se decoloraron en etanol al 70% a 50°C. Además, 6 hojas se eliminaron en cada caso de respectivamente 4 plantas diferentes de las líneas mutantes Salk_110814-1, Salk_110814-2 o Salk_110814-3 que eran en cada caso homocigóticas con respecto a la inserción de ADN-T en un gen de OK1, y éstas se decoloraron en etanol al 70% a 50°C. Entonces, las hojas se incubaron durante 10 minutos en disolución de Lugol antes de aclararse el exceso de disolución de Lugol de las hojas con agua de grifo. No todas las hojas de plantas naturales mostraron tinción con la disolución de Lugol. Por otra parte, todas las hojas de las líneas mutantes Salk_110814-1, Salk_110814-2 o Salk_110814-3 mostraron una coloración marrón oscura o negra (véase Fig. 7). Por tanto, las líneas mutantes mostraron un fenotipo de exceso de almidón en comparación con las plantas naturales. Durante el cultivo no pudieron establecerse diferencias referentes al crecimiento entre las líneas mutantes y las plantas naturales.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* genéticamente modificadas que se transformaron con un constructo de ARNi que contenía “repeticiones invertidas” de la región codificante de un gen de OK1 bajo el control del promotor 35S se analizaron con la ayuda de análisis de transferencia de Western usando el anticuerpo descrito en el Ejemplo 10. Se identificaron varias líneas independientes que presentaron una cantidad reducida de proteína OK1 en comparación con plantas naturales. Estas líneas se cultivaron bajo las condiciones de cultivo especificadas anteriormente. En cada caso, 5 hojas de las líneas individuales se eliminaron al final de la fase de oscuridad (12 horas a 17°C), se decoloraron en etanol y se tiñeron con disolución de Lugol. Todas las plantas mostraron un fenotipo de exceso de almidón en comparación con plantas naturales correspondientes. Durante el cultivo no pudieron establecerse diferencias referentes al crecimiento entre las plantas genéticamente modificadas y las plantas naturales. Por tanto, las plantas genéticamente modificadas por medio de tecnología de ARNi mostraron las mismas propiedades que las líneas mutantes Saik_110814-1, Salk_110814-2 o Salk_110814-3.

En cada caso, cuatro plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas A.t.-alfa-OK1-1, A.t.-alfa-OK1-2, A.t.-alfa-OK1-3, A.t.-alfa-OK1-4, A.t.-alfa-OK1-5, resultantes de acontecimientos de transformaciones independientes en los que la cantidad de proteína OK1 se reduce por medio de tecnología de ARNi, se investigaron para su contenido de almidón a diferentes veces. La reducción en la cantidad de proteína OK1 en las líneas respectivas se demostró por medio de análisis de transferencia de Western (véase la Fig. 8). El contenido de almidón en hojas de las líneas individuales se determinó usando los kits de almidón de Boehringer Mannheim (nº de producto: 0207748). Para este fin, en cada caso, todas las hojas de cuatro plantas de las líneas individuales se recogieron y las hojas se homogeneizaron usando

ES 2 344 113 T3

morteros. Se lavaron 40 mg a 60 mg del material de hojas homogeneizado dos veces con etanol al 80% en cada caso y el sobrenadante se desechó. El material restante, que no es soluble en etanol, se liofilizó después de lavarse una vez en 1 ml de agua, luego se disolvió en 0,5 ml de KOH 0,2M a 95°C durante 1 h y la disolución obtenida se ajustó a pH 7 usando 88 μ l de ácido acético 1 M. Se mezclaron 25 μ l de la disolución respectiva obtenida con 50 μ l de disolución de amiloglucosidasa (kit de almidón de Boehringer Mannheim, n° de producto: 0207748) a la que se había añadido 1 unidad de alfa-amilasa (de *Bacillus amyloliquefaciens*, Boehringer, n° de producto 161764) y se incubó durante 1 h a 55°C. Luego se usaron 20 μ l de la disolución tratada con amiloglucosidasa y alfa-amilasa para determinar la glucosa usando una prueba fotométrica acoplada a enzimática (véase la hoja de información del producto para la determinación de almidón nativo de Boehringer Ingelheim, n° de producto: 0207748). Al mismo tiempo que las líneas transgénicas, el almidón contenido también se determinó en hojas de plantas naturales de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia). Las plantas naturales y las plantas transgénicas se cultivaron bajo las mismas condiciones: 12 horas de fase de luz seguidas de 12 horas fase de oscuridad.

Las hojas de las líneas de plantas transgénicas respectivas y las plantas naturales se recogieron en cada caso aproximadamente 4,5 semanas después de la germinación de semillas después del final de la fase de oscuridad, después del final de una fase de luz y después del final de una segunda fase de oscuridad que siguió directamente a la fase de luz. Para cada línea de plantas transgénicas se produjeron en cada caso dos extractos independientes a partir de los cuales se hicieron dos mediciones del contenido de almidón en cada caso. Para plantas naturales se produjeron cuatro extractos en cada caso a partir de los cuales se hicieron dos mediciones del contenido de almidón en cada caso. La determinación de los contenidos de almidón en hojas dio los siguientes resultados:

TABLA 4

Cantidad de almidón en hojas en plantas de Arabidopsis thaliana en las que la cantidad de proteína OK1 se reduce usando tecnología de ARNi

	Línea	Contenido de almidón (mg/g de PF)	Desviación estándar*
Final			
Fase de oscuridad 1			
	A.t.-alfa-OK1-1	4,09	0,55
	A.t.-alfa-OK1-2	4,93	0,94
	A.t.-alfa-OK1-3	5,59	0,52
	A.t.-alfa-OK1-4	6,36	0,87
	A.t.-alfa-OK1-5	1,49	0,99
	Natural	0,78	0,14
Final			
Fase de luz			
	A.t.-alfa-OK1-1	9,30	0,96
	A.t.-alfa-OK1-2	9,86	1,45

ES 2 344 113 T3

	A.t.-alfa-OK1-3	11,68	1,60
	A.t.-alfa-OK1-4	9,53	1,25
5	A.t.-alfa-OK1-5	6,61	0,71
	Natural	5,61	0,72
	Final		
10	Fase de oscuridad 2		
	A.t.-alfa-OK1-1	3,92	0,83
	A.t.-alfa-OK1-2	4,35	1,07
15	A.t.-alfa-OK1-3	6,00	0,63
	A.t.-alfa-OK1-4	5,34	1,35
	A.t.-alfa-OK1-5	1,46	0,56
20	Natural	0,62	0,18

* Desviación estándar usando la fórmula general: raíz $[(n\sum x^2 - (\sum x)^2) / n(n-1)]$

25 15. *Análisis de almidón aislado de plantas que presentan una actividad reducida de una proteína OK1*

El almidón se aisló a partir de hojas de las plantas descritas en el Ejemplo 14 y se hidrolizó usando el procedimiento descrito en Procedimientos generales, Punto 13 y luego se separó por medio de análisis de HPAE. Se calcularon las áreas de las señales separadas obtenidas por medio de análisis de HPAE para fosfato en C-3 y fosfato en C-6 (software: Chromelion 6.20 de Dionex, EE.UU.) y los valores obtenidos se dieron como la relación entre sí. La relación de fosfato en C-6 respecto a fosfato en C-3 en plantas naturales fue 2,1. En las plantas descritas en el Ejemplo 14 en las que la actividad de la proteína OK1 se redujo por medio de tecnología de ARNi, por otra parte, la relación promedio de fosfato en C-6 respecto a fosfato en C-3 determinada analizando el almidón aislado de las líneas A.t.-alfa-OK1-1, A.t.-alfa-OK1-2, A.t.-alfa-OK1-3, A.t.-alfa-OK1-4 y A.t.-alfa-OK1-5 era 2,5. El análisis de almidón de la línea A.t.-alfa-OK1-5 dio la relación más baja de fosfato en C-6 respecto a fosfato en C-3 (relación de 2,2), el almidón de la línea A.t.-alfa-OK1-1 dio la relación más alta (relación de 2,7).

El almidón aislado de hojas de los mutantes descritos en el Ejemplo 13 que presentan una actividad reducida de una proteína OK1 mostró un aumento en la relación de fosfato en C-6 respecto a fosfato en C-3 en el almidón en cuestión.

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para identificar una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos y requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato en el que

- a) se incuban extractos de proteína con alfa-1,4-glucanos fosforilados,
- b) se disuelven proteínas específicamente unidas a los alfa-1,4-glucanos fosforilados de la Etapa a),
- 10 c) las proteínas obtenidas según la Etapa b) se incuban respectivamente con
 - i ATP y alfa-1,4-glucanos fosforilados y
 - 15 ii ATP y alfa-1,4-glucanos no fosforilados en preparaciones separadas entre sí,
- d) se examina el alfa-1,4-glucano respectivo obtenido después de la incubación en la Etapa c) i o la Etapa c) ii para comprobar la introducción de otros grupos fosfato y
- 20 e) se identifican proteínas que en la preparación de la incubación según c) i han introducido grupos fosfato en alfa-1,4-glucanos en una cantidad que es al menos dos veces superior a la cantidad determinada en experimentos de control y en la preparación de la incubación según c) ii no han introducido grupos fosfato en alfa-1,4-glucanos en una cantidad que es al menos dos veces superior a la cantidad determinada en experimentos de control.

25 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína con actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos usa almidón fosforilado como sustrato.

30 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la proteína con actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos procede de una planta.

35 4. Una proteína que requiere alfa-1,4-glucanos fosforilados como sustrato e introduce enlaces monoéster de fosfato en la posición C-3 de una molécula de glucosa del alfa-1,4-glucano, **caracterizada** porque su secuencia de aminoácidos codificante tiene un dominio de fosfohistidina que tiene al menos el 60% de identidad con el dominio de fosfohistidina como se identifica en SEQ ID No. 5.

40 5. Un procedimiento para identificar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos en el que

- a) se identifica una proteína mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3,
- b) se determinan secuencias de aminoácidos que codifican la proteína identificada según la Etapa a) y
- 45 c) se identifican moléculas de ácidos nucleicos usando los aminoácidos determinados según la Etapa b).

50 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que oligonucleótidos de ácidos nucleicos basados en la secuencia de aminoácidos determinada según la Etapa b) se preparan para identificar dicha molécula de ácido nucleico según la Etapa c).

7. Un procedimiento para identificar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que presenta actividad enzimática fosforilante de alfa-1,4-glucanos en el que

- a) se identifica una proteína mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3,
- 55 b) se producen anticuerpos que reaccionan específicamente con la proteína identificada según la Etapa a) y
- c) se identifican moléculas de ácidos nucleicos a modo de inmunocribado usando los anticuerpos producidos según la Etapa b).

60 8. Una célula vegetal genéticamente modificada **caracterizada** porque la modificación genética consiste en la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico extraña en el genoma de la planta, en la que la molécula de ácido nucleico extraña codifica una proteína según la reivindicación 4, en la que la célula vegetal genéticamente modificada sintetiza un almidón modificado que tiene un contenido elevado de fosfato de almidón y/o una distribución de fosfato modificada en comparación con almidón de plantas naturales correspondientes.

ES 2 344 113 T3

9. La célula vegetal según la reivindicación 8, en la que el almidón modificado se **caracteriza** porque presenta un contenido elevado de fosfato unido covalentemente al almidón en la posición C-3 de la molécula de glucosa en comparación con almidón de células vegetales naturales correspondientes.

5 10. Una planta que contiene células vegetales genéticamente modificadas según una de las reivindicaciones 8 ó 9.

11. La planta según la reivindicación 10, que es una planta de maíz, arroz, trigo, centeno, avena, cebada, mandioca, patata, sagú, judía mungo, guisante o sorgo.

10 12. La planta según la reivindicación 11, que es una planta de maíz o trigo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

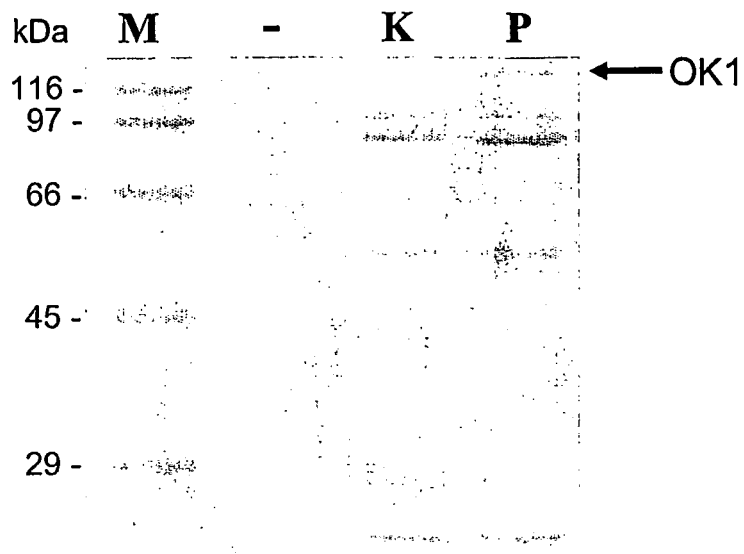


Fig. 1

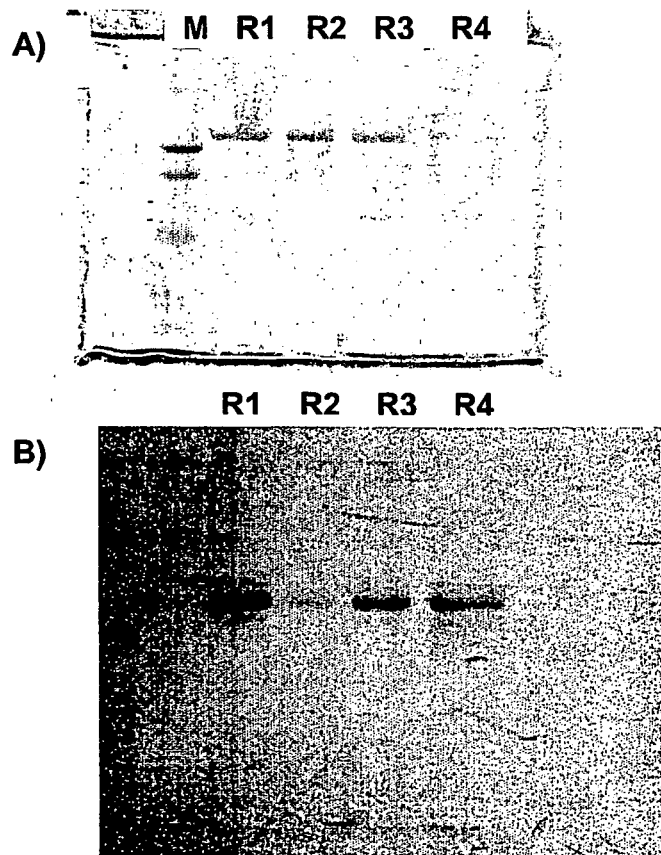


Fig. 2

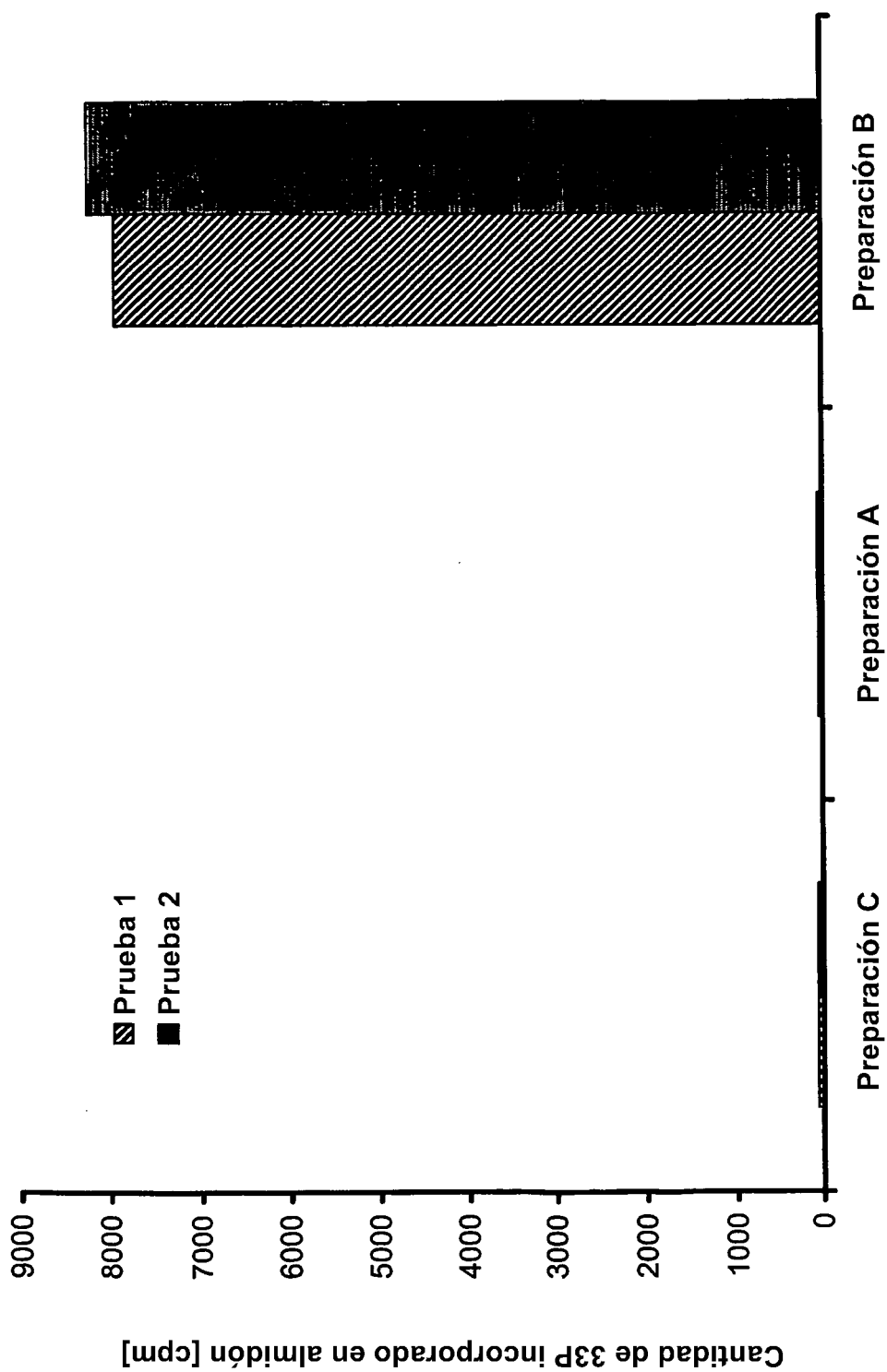
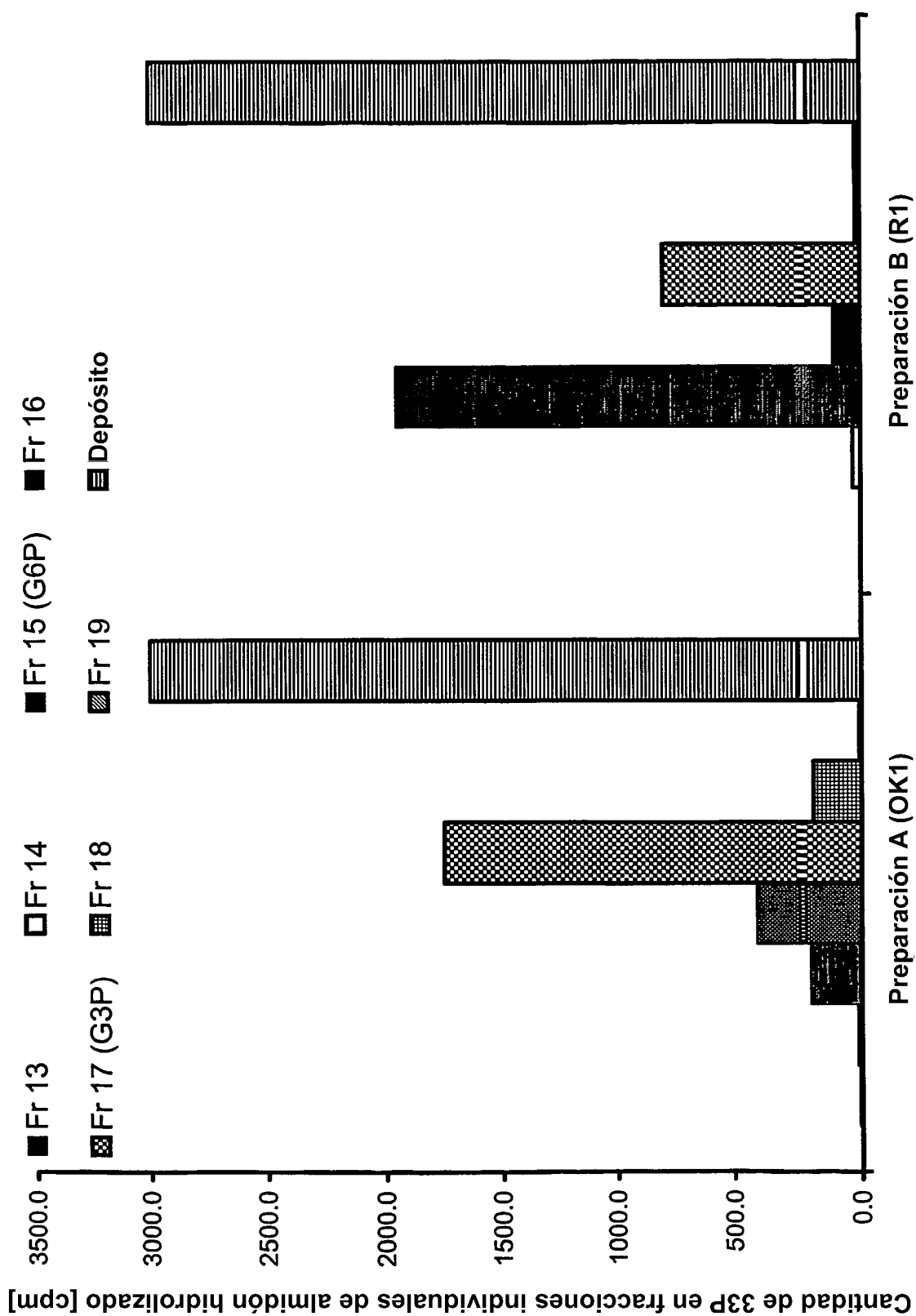


Fig.: 3



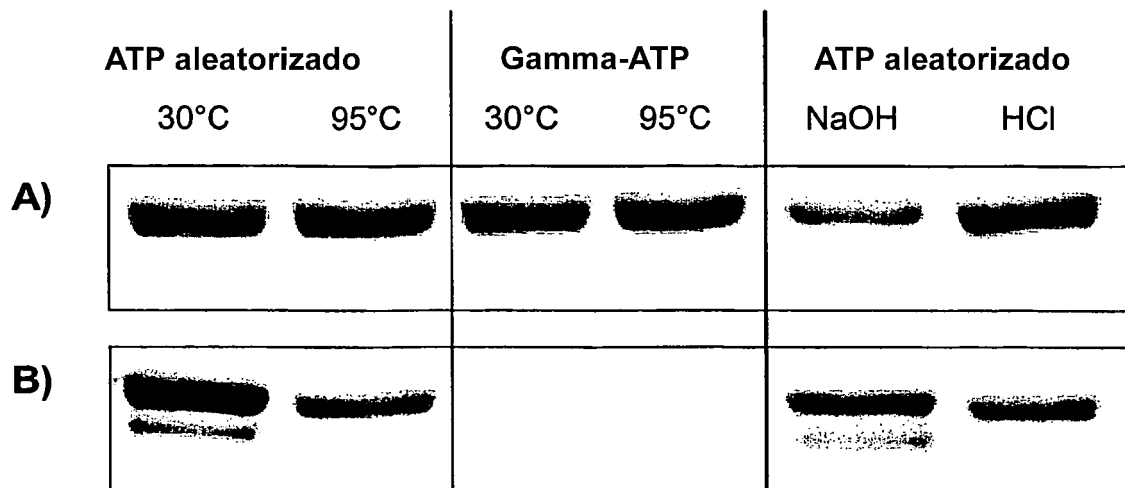


Fig. 5

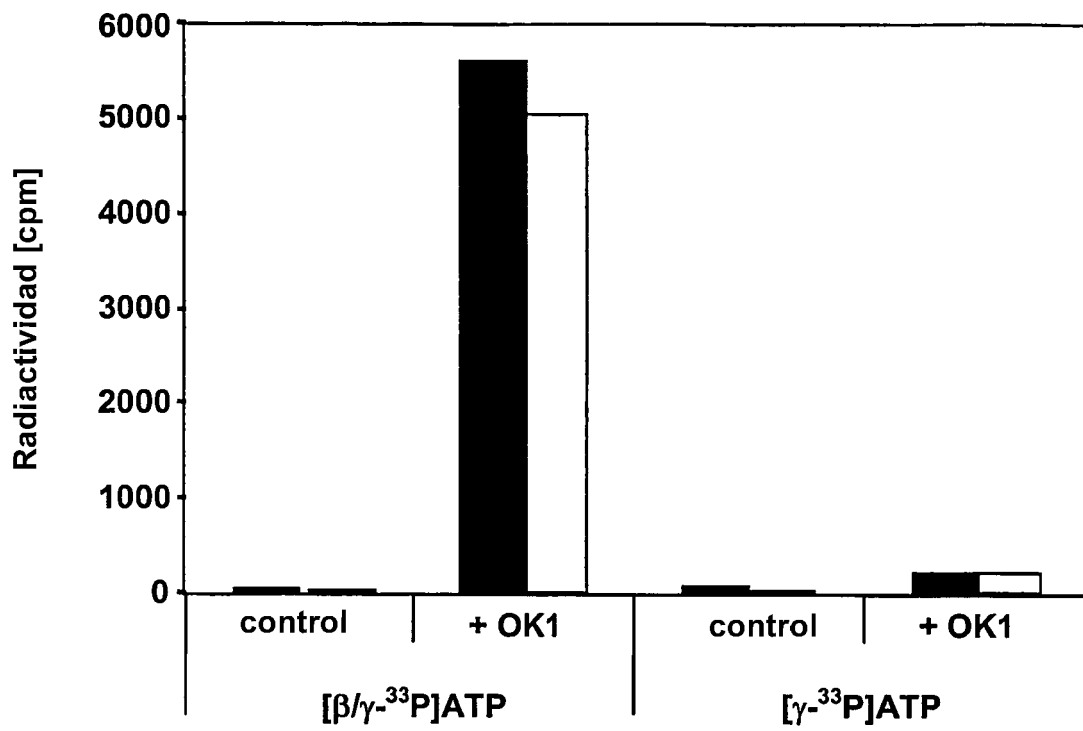


Fig. 6

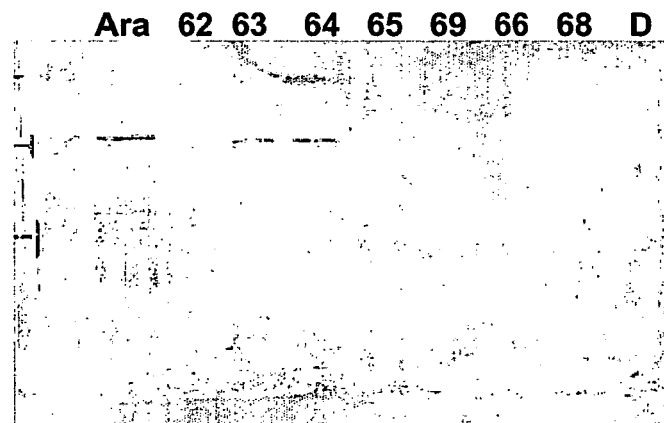
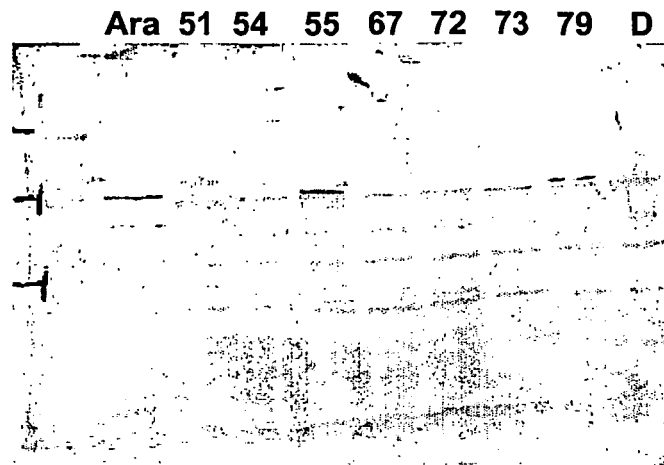


Fig. 7

ES 2 344 113 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayer Cropscience GmbH
5 <120> Procedimientos para identificar proteínas con actividad enzimática fosforilante de almidón
<130> BCS 04-5001-PCT
<150> EP04090483.1
<151> 15-12-2004
10 <150> EP04090121.7
<151> 29-03-2004
<150> EP04090087.0
<151> 05-03-2004
15 <150> US60/549.980 provisional
<151> 05-03-2004
<160> 26
20 <170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 3591
<212> ADN
25 <213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
30 <222> (1)..(3591)
<223>

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 113 T3

<400> 1

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

ES 2 344 113 T3

	260			265			270										
5	ata Ile	ggt Val	ggg Gly 275	agt Ser	ggt Val	gag Glu	agg Arg	gag Glu 280	gaa Glu	cga Arg	ttg Leu	aag Lys	gcg Ala 285	ctc Leu	ata Ile	tac Tyr	864
10	tct Ser	gca Ala 290	att Ile	tat Tyr	ttg Leu	aag Lys	tgg Trp 295	ata Ile	aac Asn	aca Thr	ggt Gly	cag Gln 300	att Ile	cct Pro	tgt Cys	ttt Phe	912
15	gaa Glu 305	gat Asp	gga Gly	ggg Gly	cat His	cac His 310	cgt Arg	cca Pro	aac Asn	agg Arg	cat His 315	gcc Ala	gag Glu	att Ile	tcc Ser	aga Arg 320	960
20	ctt Leu	ata Ile	ttc Phe	cgt Arg	gag Glu 325	ttg Leu	gag Glu	cac His	att Ile	tgc Cys 330	agt Ser	aag Lys	aaa Lys	gat Asp	gct Ala 335	act Thr	1008
25	cca Pro	gag Glu	gaa Glu	gtg Val 340	ctt Leu	ggt Val	gct Ala	cgg Arg	aaa Lys 345	atc Ile	cat His	ccg Pro	tgt Cys	tta Leu 350	cct Pro	tct Ser	1056
30	ttc Phe	aaa Lys	gca Ala 355	gag Glu	ttt Phe	act Thr	gca Ala 360	gct Val	gtc Val	cct Pro	cta Leu	act Thr	cgg Arg 365	att Ile	agg Arg	gac Asp	1104
35	ata Ile	gcc Ala 370	cat His	cgg Arg	aat Asn	gat Asp	att Ile 375	cct Pro	cat His	gat Asp	ctc Leu	aag Lys 380	caa Gln	gaa Glu	atc Ile	aag Lys	1152
40	cat His 385	acg Thr	ata Ile	caa Gln	aat Asn	aag Lys 390	ctt Leu	cac His	cgg Arg	aat Asn	gct Ala 395	ggt Gly	cca Pro	gaa Glu	gat Asp	cta Leu 400	1200
45	att Ile	gca Ala	aca Thr	gaa Glu	gca Ala 405	atg Met	ctt Leu	caa Gln	cga Arg	att Ile 410	acc Thr	gag Glu	acc Thr	cca Pro	gga Gly 415	aaa Lys	1248
50	tat Tyr	agt Ser	gga Gly	gac Asp 420	ttt Phe	gtg Val	gag Glu	cag Gln	ttt Phe 425	aaa Lys	ata Ile	ttc Phe	cat His	aat Asn 430	gag Glu	ctt Leu	1296
55	aaa Lys	gat Asp	ttc Phe 435	ttt Phe	aat Asn	gct Ala	gga Gly	agt Ser	ctc Leu	act Thr	gaa Glu	cag Gln	ctt Leu 445	gat Asp	tct Ser	atg Met	1344
60	aaa Lys	att Ile 450	tct Ser	atg Met	gat Asp	gat Asp	aga Arg 455	ggt Gly	ctt Leu	tct Ser	gcg Ala	ctc Leu 460	aat Asn	ttg Leu	ttt Phe	ttt Phe	1392
65	gaa Glu 465	tgt Cys	aaa Lys	aag Lys	cgc Arg	ctt Leu 470	gac Asp	aca Thr	tca Ser	gga Gly	gaa Glu 475	tca Ser	agc Ser	aat Asn	gtt Val	ttg Leu 480	1440
70	gag Glu	ttg Leu	att Ile	aaa Lys	acc Thr 485	atg Met	cat His	tct Ser	cta Leu	gct Ala 490	tct Ser	tta Leu	aga Arg	gaa Glu	aca Thr 495	att Ile	1488
75	ata Ile	aag Lys	gaa Glu	ctt Leu 500	aat Asn	agc Ser	ggc Gly	ttg Leu	cga Arg 505	aat Asn	gat Asp	gct Ala	cct Pro	gat Asp 510	act Thr	gcc Ala	1536
80	att Ile	gca Ala	atg Met 515	cgc Arg	cag Gln	aag Lys	tgg Trp	cgc Arg 520	ctt Leu	tgt Cys	gag Glu	atc Ile	ggc Gly 525	ctc Leu	gag Glu	gac Asp	1584
85	tac Tyr	ttt Phe	ttt Phe	ggt Val	cta Leu	cta Leu	agc Ser	aga Arg	ttc Phe	ctc Leu	aat Asn	gct Ala	ctt Leu	gaa Glu	act Thr	atg Met	1632

ES 2 344 113 T3

	530				535				540								
5	gga Gly 545	gga Gly	gct Ala	gat Asp	caa Gln	ctg Leu 550	gca Ala	aaa Lys	gat Asp	gtg Val	gga Gly 555	tca Ser	aga Arg	aac Asn	gtt Val	gcc Ala 560	1680
10	tca Ser	tgg Trp	aat Asn	gat Asp	cca Pro 565	cta Leu	gat Asp	gct Ala	ttg Leu	gtg Val 570	ttg Leu	ggt Gly	gtt Val	cac His	caa Gln 575	gta Val	1728
15	ggt Gly	cta Leu	tct Ser	ggt Gly 580	tgg Trp	aag Lys	caa Gln	gaa Glu	gaa Glu 585	tgt Cys	tta Leu	gcc Ala	att Ile	gga Gly 590	aat Asn	gaa Glu	1776
20	ctc Leu	ctt Leu	gct Ala 595	tgg Trp	cga Arg	gaa Glu	agg Arg	gac Asp 600	cta Leu	ctt Leu	gaa Glu	aaa Lys	gaa Glu 605	ggg Gly	gaa Glu	gag Glu	1824
25	gat Asp	gga Gly 610	aaa Lys	aca Thr	att Ile	tgg Trp	gcc Ala 615	atg Met	agg Arg	ctg Leu	aaa Lys	gca Ala 620	act Thr	ctt Leu	gat Asp	cga Arg	1872
30	gca Ala 625	cgc Arg	aga Arg	tta Leu	aca Thr	gca Ala 630	gaa Glu	tat Tyr	tct Ser	gat Asp	ttg Leu 635	ctt Leu	ctt Leu	caa Gln	ata Ile	ttt Phe 640	1920
35	cct Pro	cct Pro	aat Asn	gtg Val	gag Glu 645	att Ile	tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gct Ala 650	cta Leu	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu 655	aat Asn	1968
40	agt Ser	gtc Val	aag Lys	acc Thr 660	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gag Glu 665	att Ile	cgt Arg	gct Ala	gga Gly	att Ile 670	att Ile	ttc Phe	2016
45	cag Gln	atc Ile	tca Ser 675	aag Lys	ctc Leu	tgc Cys	act Thr	gtt Val 680	ctt Leu	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	gta Val 685	aga Arg	aat Asn	tca Ser	2064
50	ctt Leu	ggt Gly 690	tct Ser	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	gat Asp 695	gtc Val	gtt Val	gta Val	cct Pro	gga Gly 700	tcg Ser	acg Thr	tct Ser	ggg Gly	2112
55	aca Thr 705	tta Leu	gtt Val	cag Gln	gtt Val	gag Glu 710	agc Ser	att Ile	gtt Val	ccg Pro	gga Gly 715	tca Ser	ttg Leu	cca Pro	gca Ala	act Thr 720	2160
60	tct Ser	ggt Gly	ggt Gly	cct Pro	att Ile 725	att Ile	ctc Leu	ttg Leu	gtc Val	aat Asn 730	aaa Lys	gct Ala	gat Asp	ggc Gly	gat Asp 735	gaa Glu	2208
65	gag Glu	gta Val	agt Ser	gct Ala 740	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	aac Asn	ata Ile 745	gct Ala	gga Gly	gtc Val	atg Met	ctt Leu 750	ctg Leu	cag Gln	2256
70	gag Glu	ctg Leu	cct Pro 755	cac His	ttg Leu	tct Ser	cac His	ctt Leu 760	ggc Gly	gtt Val	aga Arg	gcg Ala	cgg Arg 765	cag Gln	gag Glu	aaa Lys	2304
75	att Ile	gtc Val 770	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	tgt Cys	gat Asp 775	gat Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys	gtt Val 780	gct Ala	gat Asp	ata Ile	cga Arg	2352
80	cga Arg 785	ctt Leu	gtg Val	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe 790	gtg Val	agg Arg	ttg Leu	gaa Glu	gca Ala 795	tct Ser	cca Pro	agt Ser	cat His	gtg Val 800	2400
85	aat Asn	ctg Leu	ata Ile	ctt Leu	tca Ser	act Thr	gag Glu	ggt Gly	agg Arg	agt Ser	cgc Arg	act Thr	tcc Ser	aaa Lys	tcc Ser	agt Ser	2448

ES 2 344 113 T3

	805					810					815						
5	gcg	acc	aaa	aaa	acg	gat	aag	aac	agc	tta	tct	aag	aaa	aaa	aca	gat	2496
	Ala	Thr	Lys	Lys	Thr	Asp	Lys	Asn	Ser	Leu	Ser	Lys	Lys	Lys	Thr	Asp	
				820					825					830			
10	aag	aag	agc	tta	tct	atc	gat	gat	gaa	gaa	tca	aag	cct	ggt	tcc	tca	2544
	Lys	Lys	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	
			835					840					845				
15	tct	tcc	aat	agc	ctc	ctt	tac	tct	tcc	aag	gat	atc	cct	agt	gga	gga	2592
	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Asp	Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	
		850					855					860					
20	atc	ata	gca	ctt	gct	gat	gca	gat	gta	cca	act	tct	ggt	tca	aaa	tct	2640
	Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Asp	Val	Pro	Thr	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	
	865				870						875				880		
25	gct	gca	tgt	ggt	ctt	ctt	gca	tct	tta	gca	gaa	gcc	tct	agt	aaa	gtg	2688
	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Val	
					885					890					895		
30	cac	agc	gaa	cac	gga	ggt	ccg	gca	tca	ttt	aag	ggt	cca	act	gga	ggt	2736
	His	Ser	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ala	Ser	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Gly	Val	
				900					905					910			
35	gtc	ata	cct	ttt	gga	tcg	atg	gaa	tta	gct	tta	aag	caa	aat	aat	tcg	2784
	Val	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	Asn	Asn	Ser	
			915				920						925				
40	gaa	gaa	aag	ttt	gcg	tct	ttg	cta	gaa	aaa	cta	gaa	acc	gcc	aga	cct	2832
	Glu	Glu	Lys	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	
		930					935					940					
45	gag	ggt	ggt	gag	cta	gac	gac	ata	tgt	gac	cag	atc	cat	gaa	gtg	atg	2880
	Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Asp	Ile	Cys	Asp	Gln	Ile	His	Glu	Val	Met	
	945					950					955					960	
50	aaa	acg	ttg	caa	gtg	cct	aaa	gaa	aca	atc	aac	agc	ata	agc	aaa	gcg	2928
	Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	
					965					970					975		
55	ttt	ctc	aaa	gat	gct	cgT	ctc	att	gtt	cgT	tca	agt	gct	aac	gtc	gag	2976
	Phe	Leu	Lys	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	
				980					985					990			
60	gac	tta	gcc	gga	atg	tca	gct	gca	gga	ctc	tat	gaa	tca	atc	cct	aac	3024
	Asp	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Asn	
			995				1000						1005				
65	gtg	agt	ccc	tcg	gat	cct	ttg	gtg	ttt	tca	gat	tcg	ggt	tgc	caa	3069	
	Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln		
		1010					1015					1020					
70	ggt	tgg	gct	tct	ctc	tac	aca	aga	aga	gct	ggt	cta	agc	cgT	aga	3114	
	Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg		
		1025					1030					1035					
75	gct	gct	ggt	gtc	tct	caa	aga	gaa	gct	tca	atg	gct	ggt	ctc	ggt	3159	
	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
			1040				1045					1050					
80	caa	gaa	atg	ctt	tcg	ccg	gac	tta	tca	ttc	ggt	ctg	cac	aca	gtg	3204	
	Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val		
		1055					1060					1065					
85	agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct	3249	
	Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala		

ES 2 344 113 T3

	1070		1075		1080											
5	cct Pro	ggt Gly 1085	tta Leu	ggt Gly	gag Glu	act Thr	tta Leu 1090	gct Ala	tca Ser	gga Gly	aca Thr	aga Arg 1095	gga Gly	aca Thr	cca Pro	3294
10	tgg Trp	aga Arg 1100	ctc Leu	gct Ala	tcg Ser	ggt Gly	aag Lys 1105	ctc Leu	gac Asp	ggg Gly	att Ile	gta Val 1110	caa Gln	acc Thr	tta Leu	3339
15	gct Ala	ttc Phe 1115	gca Ala	aac Asn	ttc Phe	agc Ser	gaa Glu 1120	gag Glu	ctt Leu	ctt Leu	gtg Val	tca Ser 1125	gga Gly	aca Thr	ggt Gly	3384
20	cct Pro	gct Ala 1130	gat Asp	gga Gly	aaa Lys	tac Tyr	gtt Val 1135	cgg Arg	ttg Leu	acc Thr	gtg Val	gac Asp 1140	tat Tyr	agc Ser	aaa Lys	3429
25	aaa Lys	cgt Arg 1145	tta Leu	act Thr	ggt Val	gac Asp	tcg Ser 1150	gtg Val	ttt Phe	aga Arg	c g n	cag Gln 1155	ctc Leu	ggt Gly	cag Gln	3474
30	aga Arg	ctc Leu 1160	ggt Gly	tcg Ser	ggt Val	ggt Gly	ttc Phe 1165	ttc Phe	ttg Leu	gaa Glu	aga Arg	aac Asn 1170	ttt Phe	ggc Gly	tgt Cys	3519
35	gct Ala	caa Gln 1175	gac Asp	ggt Val	gaa Glu	ggt Gly	tgt Cys 1180	ttg Leu	ggt Val	ggt Gly	gaa Glu	gat Asp 1185	ggt Val	tac Tyr	att Ile	3564
40	ggt Val	cag Gln 1190	tca Ser	agg Arg	cca Pro	caa Gln	cct Pro 1195	ctg Leu	tag							3591
45	<210> 2	<211> 1196	<212> PRT	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	<400> 2											
50	Met	Glu	Ser	Ile	Gly	Ser	His	Cys	Cys	Ser	Ser	Pro	Phe	Thr	Phe	Ile
55	1				5					10					15	
60	Thr	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Asn	Ile	Thr	His
65				20					25				30			
70	Arg	Val	Asn	Leu	Ser	His	Gln	Ser	His	Arg	Leu	Arg	Asn	Ser	Asn	Ser
75			35				40						45			
80	Arg	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ile	Glu	Glu	Gln	Arg
85		50					55					60				
90	Lys	Lys	Lys	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Arg	Leu	Asn	Val	Arg	Leu
95	65					70					75				80	
100	Asp	His	Gln	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	His	Val	Ala	Met	Phe	Gly	Ser	Ala
105																

ES 2 344 113 T3

	85					90					95					
5	Lys	Glu	Ile	Gly 100	Ser	Trp	Lys	Lys	Lys 105	Ser	Pro	Leu	Asn	Trp 110	Ser	Glu
10	Asn	Gly	Trp 115	Val	Cys	Glu	Leu	Glu 120	Leu	Asp	Gly	Gly	Gln 125	Val	Leu	Glu
15	Tyr	Lys 130	Phe	Val	Ile	Val	Lys 135	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu 140	Ser	Trp	Glu	Ser
20	Gly 145	Asp	Asn	Arg	Val	Leu 150	Lys	Val	Pro	Asn	Ser 155	Gly	Asn	Phe	Ser	Val 160
25	Val	Cys	His	Trp	Asp 165	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr 170	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln 175	Glu
30	Val	Gly	Asn	Asp 180	Asp	Asp	Val	Gly	Asp 185	Gly	Gly	His	Glu	Arg 190	Asp	Asn
35	His	Asp	Val 195	Gly	Asp	Asp	Arg	Val 200	Val	Gly	Ser	Glu	Asn 205	Gly	Ala	Gln
40	Leu	Gln 210	Lys	Ser	Thr	Leu	Gly 215	Gly	Gln	Trp	Gln	Gly 220	Lys	Asp	Ala	Ser
45	Phe 225	Met	Arg	Ser	Asn	Asp 230	His	Gly	Asn	Arg	Glu 235	Val	Gly	Arg	Asn	Trp 240
50	Asp	Thr	Ser	Gly	Leu 245	Glu	Gly	Thr	Ala	Leu 250	Lys	Met	Val	Glu	Gly	Asp 255
55	Arg	Asn	Ser	Lys 260	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys 265	Leu	Glu	Met	Val	Arg 270	Glu	Val
60	Ile	Val	Gly 275	Ser	Val	Glu	Arg	Glu 280	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala 285	Leu	Ile	Tyr
65	Ser	Ala 290	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp 295	Ile	Asn	Thr	Gly	Gln 300	Ile	Pro	Cys	Phe
70	Glu 305	Asp	Gly	Gly	His	His 310	Arg	Pro	Asn	Arg	His 315	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg 320
75	Leu	Ile	Phe	Arg	Glu 325	Leu	Glu	His	Ile	Cys 330	Ser	Lys	Lys	Asp	Ala 335	Thr
80	Pro	Glu	Glu	Val 340	Leu	Val	Ala	Arg	Lys 345	Ile	His	Pro	Cys	Leu 350	Pro	Ser
85	Phe	Lys	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp

ES 2 344 113 T3

	355						360									365			
5	Ile	Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys			
		370					375					380							
	His	Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu			
	385					390					395					400			
10	Ile	Ala	Thr	Glu	Ala	Met	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Thr	Pro	Gly	Lys			
					405					410					415				
15	Tyr	Ser	Gly	Asp	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Lys	Ile	Phe	His	Asn	Glu	Leu			
				420					425					430					
20	Lys	Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Glu	Gln	Leu	Asp	Ser	Met			
			435					440					445						
25	Lys	Ile	Ser	Met	Asp	Asp	Arg	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Phe			
		450					455					460							
30	Glu	Cys	Lys	Lys	Arg	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Glu	Ser	Ser	Asn	Val	Leu			
	465					470					475					480			
35	Glu	Leu	Ile	Lys	Thr	Met	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Glu	Thr	Ile			
					485					490					495				
40	Ile	Lys	Glu	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	Ala	Pro	Asp	Thr	Ala			
				500					505					510					
45	Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Leu	Glu	Asp			
			515					520					525						
50	Tyr	Phe	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu	Asn	Ala	Leu	Glu	Thr	Met			
		530					535					540							
55	Gly	Gly	Ala	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Asn	Val	Ala			
	545					550					555					560			
60	Ser	Trp	Asn	Asp	Pro	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Val	His	Gln	Val			
					565					570					575				
65	Gly	Leu	Ser	Gly	Trp	Lys	Gln	Glu	Glu	Cys	Leu	Ala	Ile	Gly	Asn	Glu			
				580					585					590					
70	Leu	Leu	Ala	Trp	Arg	Glu	Arg	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Glu	Gly	Glu	Glu			
			595					600					605						
75	Asp	Gly	Lys	Thr	Ile	Trp	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg			
		610					615					620							
80	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe			

ES 2 344 113 T3

	625				630					635				640		
5	Pro	Pro	Asn	Val	Glu 645	Ile	Leu	Gly	Lys	Ala 650	Leu	Gly	Ile	Pro	Glu 655	Asn
10	Ser	Val	Lys	Thr 660	Tyr	Thr	Glu	Ala	Glu 665	Ile	Arg	Ala	Gly	Ile 670	Ile	Phe
15	Gln	Ile	Ser 675	Lys	Leu	Cys	Thr	Val 680	Leu	Leu	Lys	Ala	Val 685	Arg	Asn	Ser
20	Leu	Gly 690	Ser	Glu	Gly	Trp	Asp 695	Val	Val	Val	Pro	Gly 700	Ser	Thr	Ser	Gly
25	Thr 705	Leu	Val	Gln	Val	Glu 710	Ser	Ile	Val	Pro	Gly 715	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr 720
30	Ser	Gly	Gly	Pro	Ile 725	Ile	Leu	Leu	Val	Asn 730	Lys	Ala	Asp	Gly	Asp 735	Glu
35	Glu	Val	Ser	Ala 740	Ala	Asn	Gly	Asn	Ile 745	Ala	Gly	Val	Met	Leu 750	Leu	Gln
40	Glu	Leu	Pro 755	His	Leu	Ser	His	Leu 760	Gly	Val	Arg	Ala	Arg 765	Gln	Glu	Lys
45	Ile	Val 770	Phe	Val	Thr	Cys	Asp 775	Asp	Asp	Asp	Lys	Val 780	Ala	Asp	Ile	Arg
50	Arg 785	Leu	Val	Gly	Lys	Phe 790	Val	Arg	Leu	Glu	Ala 795	Ser	Pro	Ser	His	Val 800
55	Asn	Leu	Ile	Leu	Ser 805	Thr	Glu	Gly	Arg	Ser 810	Arg	Thr	Ser	Lys	Ser 815	Ser
60	Ala	Thr	Lys	Lys 820	Thr	Asp	Lys	Asn	Ser 825	Leu	Ser	Lys	Lys	Lys 830	Thr	Asp
65	Lys	Lys	Ser 835	Leu	Ser	Ile	Asp	Asp 840	Glu	Glu	Ser	Lys	Pro 845	Gly	Ser	Ser
70	Ser	Ser 850	Asn	Ser	Leu	Leu	Tyr 855	Ser	Ser	Lys	Asp	Ile 860	Pro	Ser	Gly	Gly
75	Ile 865	Ile	Ala	Leu	Ala	Asp 870	Ala	Asp	Val	Pro	Thr 875	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser 880
80	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu 885	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala 890	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys 895	Val
85	His	Ser	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ala	Ser	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Gly	Val

ES 2 344 113 T3

	900	905	910	
5	Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser 915 920 925			
10	Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro 930 935 940			
15	Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met 945 950 955 960			
20	Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala 965 970 975			
25	Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu 980 985 990			
30	Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro A: 995 1000 1005			
35	Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln 1010 1015 1020			
40	Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg 1025 1030 1035			
45	Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val 1040 1045 1050			
50	Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val 1055 1060 1065			
55	Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala 1070 1075 1080			
60	Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro 1085 1090 1095			
65	Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu 1100 1105 1110			
	Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly 1115 1120 1125			
	Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys 1130 1135 1140			
	Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln 1145 1150 1155			
	Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys			

ES 2 344 113 T3

	1160		1165		1170	
5	Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile					
	1175		1180		1185	
10	Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu					
	1190		1195			
	<210> 3					
	<211> 3644					
15	<212> ADN					
	<213> <i>Oryza sativa</i>					
	<220>					
20	<221> CDS					
	<222> (13)..(3633)					
	<223>					
25	<400> 3					
	cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata					51
		Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile				
30		1 5 10				
	ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt					99
	Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly					
	15 20 25					
35	gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc					147
	Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg					
	30 35 40 45					
40	ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca					195
	Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr					
	50 55 60					
45	aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc					243
	Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu					
	65 70 75					
50	cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att					291
	Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile					
	80 85 90					
55	atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg					339
	Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu					
	95 100 105					
60	gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa					387
	Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu					
	110 115 120 125					
65	aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat					435
	Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp					
	130 135 140					

ES 2 344 113 T3

	aaa	ata	tgg	gaa	gat	ggt	aat	aac	cgt	gtt	gtt	gag	ctg	ccg	aag	gat	483
	Lys	Ile	Trp	Glu 145	Asp	Gly	Asn	Asn	Arg 150	Val	Val	Glu	Leu	Pro 155	Lys	Asp	
5	ggt	aag	ttt	gat	ata	gta	tgc	cac	tgg	aat	aga	aca	gaa	gag	cca	tta	531
	Gly	Lys	Phe 160	Asp	Ile	Val	Cys	His 165	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu 170	Glu	Pro	Leu	
10	gaa	ctt	tta	gga	aca	cca	aag	ttt	gag	ttg	gtc	gga	gaa	gct	gaa	aag	579
	Glu	Leu 175	Leu	Gly	Thr	Pro	Lys 180	Phe	Glu	Leu	Val	Gly 185	Glu	Ala	Glu	Lys	
15	aat	act	ggc	gag	gat	gct	tca	gca	tct	gta	act	ttt	gca	cct	gaa	aaa	627
	Asn 190	Thr	Gly	Glu	Asp	Ala 195	Ser	Ala	Ser	Val	Thr 200	Phe	Ala	Pro	Glu	Lys 205	
20	ggt	caa	gat	att	tca	ggt	ggt	gag	aat	ggt	gat	cca	gca	cca	gag	gcc	675
	Val	Gln	Asp	Ile	Ser 210	Val	Val	Glu	Asn	Gly 215	Asp	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	
25	gag	tca	agc	aaa	ttt	ggt	ggg	caa	tgg	caa	gga	agt	aaa	act	gtt	ttc	723
	Glu	Ser	Ser	Lys 225	Phe	Gly	Gly	Gln	Trp 230	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr 235	Val	Phe	
30	atg	aga	tca	aat	gag	cat	ctg	aat	aag	gag	gct	gat	agg	atg	tgg	gat	771
	Met	Arg	Ser 240	Asn	Glu	His	Leu	Asn 245	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg 250	Met	Trp	Asp	
35	aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819
	Thr	Thr 255	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile 260	Ala	Leu	Lys	Leu	Val 265	Glu	Gly	Asp	Lys	
40	gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867
	Ala 270	Ser	Arg	Asn	Trp 275	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val 280	Val	Arg	Gly	Ile	Leu 285	
45	tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915
	Ser	Glu	Ser	Phe	Asp 290	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu 295	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr 300	Ser	
50	gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggt	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963
	Ala	Ile	Tyr	Leu 305	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr 310	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys 315	Phe	Glu	
55	gat	ggt	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011
	Asp	Gly	Gly 320	His	His	Arg	Pro	Asn 325	Lys	His	Ala	Glu	Ile 330	Ser	Arg	Gln	
60	ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059
	Ile	Phe 335	Arg	Glu	Leu	Glu	Met 340	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys 345	Thr	Thr	Ser	Ala	
65	aag	gat	ggt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107
	Lys 350	Asp	Val	Leu	Val 355	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro 360	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe 365	
70	aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155
	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr 370	Ala	Ser	Val	Pro	Leu 375	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp 380	Ile	
75	gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203
	Ala	His	Arg	Asn 385	Asp	Ile	Pro	His	Asp 390	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile 395	Lys	His	
80	act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251
	Thr	Ile	Gln 400	Asn	Lys	Leu	His	Arg 405	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu 410	Asp	Leu	Ile	

ES 2 344 113 T3

	gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	taC	1299
	Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr	
5	agt	gaa	aca	ttt	gtt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347
	Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	
10	gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395
	Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	
15	gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	gtt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443
	Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu	
20	acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491
	Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	
25	aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539
	Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	
30	cta	aga	tcg	gtt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587
	Leu	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	
35	gcg	cct	gat	aat	gct	ata	gca	atg	cga	caa	aag	tgg	cgc	ctt	tgt	gaa	1635
	Ala	Pro	Asp	Asn	Ala	Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu	
40	att	agt	ctt	gag	gat	tat	tca	ttt	gtt	ctg	tta	agc	aga	ttc	atc	aat	1683
	Ile	Ser	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Ile	Asn	
45	act	ctt	gaa	gcc	tta	ggt	gga	tca	gct	tca	ctt	gca	aag	gat	gta	gct	1731
	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Ala	
50	aga	aat	act	act	cta	tgg	gat	act	act	ctt	gat	gcc	ctt	gtc	att	ggc	1779
	Arg	Asn	Thr	Thr	Leu	Trp	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	
55	atc	aat	caa	gtt	agc	ttt	tca	ggt	tgg	aaa	aca	gat	gaa	tgt	att	gcc	1827
	Ile	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Trp	Lys	Thr	Asp	Glu	Cys	Ile	Ala	
60	ata	ggg	aat	gag	att	ctt	tcc	tgg	aag	caa	aaa	ggt	cta	tct	gaa	agt	1875
	Ile	Gly	Asn	Glu	Ile	Leu	Ser	Trp	Lys	Gln	Lys	Gly	Leu	Ser	Glu	Ser	
65	gaa	ggt	tgt	gaa	gat	ggg	aaa	tat	att	tgg	tca	cta	aga	ctt	aaa	gct	1923
	Glu	Gly	Cys	Glu	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ile	Trp	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ala	
70	aca	ctg	gac	aga	gca	cgg	aga	tta	acg	gaa	gag	tac	tct	gaa	gca	ctt	1971
	Thr	Leu	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu	
75	ctt	tct	ata	ttc	cct	gaa	aaa	gta	atg	gtt	att	ggg	aaa	gcc	ctt	gga	2019
	Leu	Ser	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Val	Met	Val	Ile	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	
80	ata	cca	gat	aac	agt	gtg	aga	act	tac	aca	gag	gca	gaa	att	cgt	gct	2067
	Ile	Pro	Asp	Asn	Ser	Val	Arg	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	

ES 2 344 113 T3

	ggc	att	ggt	ttt	cag	gta	tct	aaa	cta	tgc	aca	gta	ctt	cag	aaa	gca	2115
	Gly	Ile	Val	Phe	Gln	Val	Ser	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Lys	Ala	
					690					695					700		
5	att	cga	gaa	gta	ctt	gga	tca	act	ggc	tgg	gat	ggt	ctt	ggt	cct	gga	2163
	Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Thr	Gly	Trp	Asp	Val	Leu	Val	Pro	Gly	
				705					710					715			
10	gtg	gcc	cat	gga	act	ctg	atg	cgg	gtg	gaa	aga	att	ctt	cct	gga	tca	2211
	Val	Ala	His	Gly	Thr	Leu	Met	Arg	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	
			720					725					730				
15	tta	cct	tca	tct	gtc	aaa	gaa	cct	gtg	ggt	cta	att	gta	gat	aag	gct	2259
	Leu	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Glu	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Val	Asp	Lys	Ala	
		735				740						745					
20	gat	gga	gat	gaa	gag	gtc	aaa	gct	gct	ggg	gat	aat	ata	ggt	ggt	ggt	2307
	Asp	Gly	Asp	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Asn	Ile	Val	Gly	Val	
	750				755						760					765	
25	att	ctt	ctt	cag	gaa	cta	cct	cac	ctt	tca	cat	ctt	ggt	ggt	aga	gct	2355
	Ile	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	
				770						775					780		
30	cgt	caa	gag	aat	ggt	gta	ttt	gta	act	tgt	gaa	tat	gat	gac	aca	ggt	2403
	Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	
				785					790					795			
35	aca	gat	gtg	tat	ttg	ctt	gag	gga	aaa	tat	atc	aga	tta	gaa	gca	tca	2451
	Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	
			800					805					810				
40	tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	ggt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	2499
	Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala	
		815					820					825					
45	gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	2547
	Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	
	830				835						840					845	
50	caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	2595
	Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met	
				850					855						860		
55	tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggt	agt	ttt	gct	gct	ctt	2643
	Ser	Lys	Gln	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	
				865					870					875			
60	gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggt	gca	aaa	gct	gct	gca	2691
	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	
			880					885					890				
65	tgc	aga	act	ctt	tct	ggt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	2739
	Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	
		895				900						905					
70	gat	caa	gga	ggt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggt	gct	gtg	ata	2787
	Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	
	910				915						920					925	
75	cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcg	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	2835
	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	
				930						935					940		
80	tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	2883
	Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	
				945					950					955			

ES 2 344 113 T3

	ggc gaa gtc gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat	2931
	Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His	
	960 965 970	
5	ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca	2979
	Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro	
	975 980 985	
10	cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg	3027
	Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu	
	990 995 1000 1005	
15	gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc	3072
	Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val	
	1010 1015 1020	
	agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt	3117
	Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val	
	1025 1030 1035	
20	tgg gct tct tta tac aca agg aga gcc atc cta agc cgt cga gcc	3162
	Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala	
	1040 1045 1050	
25	gct ggt gtt tat cag aga gac gcg aca atg gct gtt ctt gtc caa	3207
	Ala Gly Val Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln	
	1055 1060 1065	
30	gaa ata ctg cag cca gat ctc tcc ttc gtg ctt cat act gtt tgc	3252
	Glu Ile Leu Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys	
	1070 1075 1080	
35	ccc gct gac cat gac ccc aag gtt gtc cag gct gag gtc gcc cct	3297
	Pro Ala Asp His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro	
	1085 1090 1095	
40	ggg ctg ggt gaa acg ctt gct tca gga acc cgt ggc acc ccg tgg	3342
	Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp	
	1100 1105 1110	
45	agg ctg tca tgt aac aaa ttc gat gga aaa gtt gcc act ctt gcc	3387
	Arg Leu Ser Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala	
	1115 1120 1125	
50	ttt tca aat ttc agt gag gag atg gtg gtg cac aac tct ggt cct	3432
	Phe Ser Asn Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro	
	1130 1135 1140	
55	gcc aat gga gaa gta att cgt ctt act gtt gat tac agc aag aag	3477
	Ala Asn Gly Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys	
	1145 1150 1155	
60	cca ttg tcg gtt gat aca acc ttt agg aag cag ttt ggt cag cga	3522
	Pro Leu Ser Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg	
	1160 1165 1170	
65	ctg gct gcg att ggc cag tat ctg gag cag aag ttc ggg agt gca	3567
	Leu Ala Ala Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala	
	1175 1180 1185	
70	cag gat gtg gaa ggt tgc ctg gtt ggg aaa gat att ttt ata gtg	3612
	Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val	
	1190 1195 1200	
75	caa agc agg cca cag cca tag aagccgaatt c	3644
	Gln Ser Arg Pro Gln Pro	
	1205	

ES 2 344 113 T3

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

5 <213> *Oryza sativa*

<400> 4

10 Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg
1 5 10 15

15 Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val
20 25 30

20 Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala
35 40 45

25 Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys
50 55 60

25 Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys
65 70 75 80

30 Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser
85 90 95

35 Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr
100 105 110

40 Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val
115 120 125

40 Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp
130 135 140

45 Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe
145 150 155 160

50 Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu
165 170 175

55 Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly
180 185 190

60 Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp
195 200 205

60 Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser
210 215 220

65

ES 2 344 113 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

70

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

75

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

80

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

ES 2 344 113 T3

Ile Gln Ile Leu₅₀₀ Met Thr Thr Leu Gln₅₀₅ Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 5 Val Leu Met₅₁₅ Lys Gly Leu Glu Ser₅₂₀ Gly Leu Arg Asn Asp₅₂₅ Ala Pro Asp
 10 Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln₅₃₅ Lys Trp Arg Leu Cys₅₄₀ Glu Ile Ser Leu
 15 Glu Asp Tyr Ser Phe Val₅₅₀ Leu Leu Ser Arg Phe₅₅₅ Ile Asn Thr Leu Glu₅₆₀
 20 Ala Leu Gly Gly Ser₅₆₅ Ala Ser Leu Ala Lys₅₇₀ Asp Val Ala Arg Asn Thr
 25 Val Ser Phe₅₉₅ Ser Gly Trp Lys Thr₆₀₀ Asp Glu Cys Ile Ala₆₀₅ Ile Gly Asn
 30 Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln₆₁₅ Lys Gly Leu Ser Glu₆₂₀ Ser Glu Gly Cys
 35 Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu₆₃₅ Lys Ala Thr Leu Asp₆₄₀
 40 Arg Ala Arg Arg Leu₆₄₅ Thr Glu Glu Tyr Ser₆₅₀ Glu Ala Leu Leu Ser Ile
 45 Phe Pro Glu Lys₆₆₀ Val Met Val Ile Gly₆₆₅ Lys Ala Leu Gly Ile₆₇₀ Pro Asp
 50 Asn Ser Val₆₇₅ Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala₆₈₅ Gly Ile Val
 55 Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys₆₉₅ Thr Val Leu Gln Lys₇₀₀ Ala Ile Arg Glu
 60 Val Leu Gly Ser Thr Gly₇₁₀ Trp Asp Val Leu Val₇₁₅ Pro Gly Val Ala His₇₂₀
 65 Gly Thr Leu Met Arg₇₂₅ Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro₇₃₅ Ser
 70 Ser Val Lys Glu₇₄₀ Pro Val Val Leu Ile₇₄₅ Val Asp Lys Ala Asp₇₅₀ Gly Asp
 75 Glu Glu Val₇₅₅ Lys Ala Ala Gly Asp₇₆₀ Asn Ile Val Gly Val₇₆₅ Ile Leu Leu

ES 2 344 113 T3

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

ES 2 344 113 T3

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

<210> 5

50 <211> 12

<212> PRT

<213> *Oryza sativa, Arabidopsis thaliana, Sorghum bicolor*

55 <400> 5

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

60

<210> 6

<211> 7

65 <212> PRT

<213> *Hordeum vulgare*

ES 2 344 113 T3

<400> 10

5 Ala Arg Gly Val Leu Pro Asn Val Ser Leu Ser Asp Pro Thr Asn Phe
1 5 10 15

10 Gly Ser Ala Val Ala Arg Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala
20 25 30

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

20 Ala Val Leu Val Gln Glu Met Leu Glu Pro Glu Leu Ser Phe Val Leu
50 55 60

25 His Thr Val Ser Pro Ser Asp His Asp Thr Arg Val Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

30 Val Ala Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ala Gly Thr Arg Gly Thr
85 90 95

35 Pro Trp Arg Leu Ser Cys Asp Lys Phe Asp Thr Asp Val Ala Thr Leu
100 105 110

40 Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Met Arg Val Leu Gly Ser Gly Pro
115 120 125

45 Ala Asp Gly Glu Val Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Thr Lys Leu
130 135 140

50 Leu Ser Val Asp Arg Thr Phe Arg Gln Lys Phe Gly Gln Arg Leu Ala
145 150 155 160

55 Ala Val Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Arg Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
165 170 175

60 Glu Gly Cys Met Val Trp Glu Asp Ile Tyr Ile Val Gln Ser Met Pro
180 185 190

65 Gln Pro Leu
195

55 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

60 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 11

65 Pro Glu Glu Cys Lys Ala Val Gly Asn
1 5

ES 2 344 113 T3

<400> 20

5 Val Asn Lys Ala Asp Gly
1 5

<210> 21

<211> 1526

10 <212> ADN

<213> *Sorghum bicolor*

<220>

15 <221> CDS

<222> (2)..(1525)

<223>

20 <400> 21

25	g cac gag gct gaa tat gtt cat gat cag agt cac ctg gag gct ctt aca His Glu Ala Glu Tyr Val His Asp Gln Ser His Leu Glu Ala Leu Thr 1 5 10 15	49
30	tat tct gca ata tat cta aag tgg ata tat act ggt caa ata cca tgc Tyr Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Pro Cys 20 25 30	97
35	ttt gag gat ggt ggt cac cat cga ccc aat aaa cat gct gag ata tcc Phe Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser 35 40 45	145
40	agg caa att ttt cgt gaa att gaa agg ata tac tat ggg gaa aac aca Arg Gln Ile Phe Arg Glu Ile Glu Arg Ile Tyr Tyr Gly Glu Asn Thr 50 55 60	193
45	tca gct cag gat ttg ctt gtg ata cgc aag att cat cct tgt cta cct Ser Ala Gln Asp Leu Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro 65 70 75 80	241
50	tca ttt aaa tca gaa ttt act gcc tct gtt cct cta aca cga att cgt Ser Phe Lys Ser Glu Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg 85 90 95	289
55	gat att gct cat cgt aat gac ata cca cat gat ctc aag caa gaa atc Asp Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile 100 105 110	337
60	aag cat act ata caa aac aag ctt cac cgg aat gcc ggc cct gag gat Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp 115 120 125	385

55

60

65

ES 2 344 113 T3

	ctt att gct act gaa gcc atg ctt gct agg att act aag act cct gga	433
	Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly	
	130 135 140	
5	gag tac agt gaa gct ttt gtt gaa caa ttc aag acg ttt tat agt gaa	481
	Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu	
	145 150 155 160	
10	tta aaa gat ttc ttc aat gct ggc agc cta ctg gag caa gtg caa tcc	529
	Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser	
	165 170 175	
15	atc gag caa tct ttg gat gag tct ggc tta gaa gct ctc tca tcc ttt	577
	Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe	
	180 185 190	
20	ctg aaa acc aaa aag aat tta gac caa ctg gaa gat gca aaa gat ttg	625
	Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu	
	195 200 205	
25	gat gaa aat ggt ggc gtt caa gtt ttg ttg aaa gcc ttg ctg tcg tta	673
	Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu	
	210 215 220	
30	tct tat cta aga tca att cta atg aag ggt ctg gaa agt ggc ctt aga	721
	Ser Tyr Leu Arg Ser Ile Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg	
	225 230 235 240	
35	aat gat gct cca gat agt gct att gca atg cga caa aag tgg cgt ctt	769
	Asn Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu	
	245 250 255	
40	tgt gag atc ggg ctt gaa gat tat tcg ttt gta ttg tta agt aga tac	817
	Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr	
	260 265 270	
45	atc aat gct ctt gaa gct ttg ggt gga tca gct tca ctt gca gag ggt	865
	Ile Asn Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Gly	
	275 280 285	
50	ctt cct aca aat aca agt cta tgg gat gat gcc ctt gat gcc ctt gtc	913
	Leu Pro Thr Asn Thr Ser Leu Trp Asp Asp Ala Leu Asp Ala Leu Val	
	290 295 300	
55	att ggc ata aat caa gtt agc ttt tca gga tgg aaa cca aat gag tgt	961
	Ile Gly Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Pro Asn Glu Cys	
	305 310 315 320	
60	act gca ata gtg aat gag ctt ctt tct tgg aag cag aaa ggt cta tct	1009
	Thr Ala Ile Val Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser	
	325 330 335	
65	gaa ttt gaa ggc agt gag gat gga aag tat att tgg gca ctg aga ctc	1057
	Glu Phe Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ala Leu Arg Leu	
	340 345 350	
70	aaa gcc act ctt gat aga tca cga aga cta aca gaa gaa tac tct gaa	1105
	Lys Ala Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu	
	355 360 365	
75	gca ctt ctt tct ata ttt cct gaa aaa gtc aag gtt ctt ggg aaa gcc	1153
	Ala Leu Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Lys Val Leu Gly Lys Ala	
	370 375 380	
80	ctt gga ata cca gag aac agt gtg aga aca tac act gaa gct gaa att	1201
	Leu Gly Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile	
	385 390 395 400	

ES 2 344 113 T3

Lys His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp
 115 120 125
 5
 Leu Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly
 130 135 140
 10
 Glu Tyr Ser Glu Ala Phe Val Glu Gln Phe Lys Thr Phe Tyr Ser Glu
 145 150 155 160
 15
 Leu Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Leu Glu Gln Val Gln Ser
 165 170 175
 20
 Ile Glu Gln Ser Leu Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe
 180 185 190
 25
 Leu Lys Thr Lys Lys Asn Leu Asp Gln Leu Glu Asp Ala Lys Asp Leu
 195 200 205
 30
 Asp Glu Asn Gly Gly Val Gln Val Leu Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu
 210 215 220
 35
 Ser Tyr Leu Arg Ser Ile Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg
 225 230 235 240
 40
 Asn Asp Ala Pro Asp Ser Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu
 245 250 255
 45
 Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr
 260 265 270
 50
 Ile Asn Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Glu Gly
 275 280 285
 55
 Leu Pro Thr Asn Thr Ser Leu Trp Asp Asp Ala Leu Asp Ala Leu Val
 290 295 300
 60
 Ile Gly Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Pro Asn Glu Cys
 305 310 315 320
 65
 Thr Ala Ile Val Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser
 325 330 335
 70
 Glu Phe Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ala Leu Arg Leu
 340 345 350
 75
 Lys Ala Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu
 355 360 365
 80
 Ala Leu Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Lys Val Leu Gly Lys Ala
 370 375 380

ES 2 344 113 T3

Leu Gly Ile Pro Glu Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile
385 390 395 400

5 Arg Ala Gly Val Ile Phe His Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu
405 410 415

10 Lys Ala Thr Arg Ala Val Leu Gly Ser Ser Val Trp Asp Val Leu Val
420 425 430

15 Pro Gly Val Ala His Gly Ala Leu Ile Gln Val Glu Arg Ile Ala Pro
435 440 445

Gly Ser Leu Pro Ser Ser Ile Lys Glu Pro Val Val Leu Val Val Asn
450 455 460

20 Lys Ala Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val
465 470 475 480

25 Gly Val Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val
485 490 495

30 Arg Ala Arg Gln Glu Lys Val Val Phe Val Thr Cys
500 505

<210> 23

35 <211> 8

<212> PRT

<213> *Triticum aestivum*

40 <400> 23

Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly
1 5

45 <210> 24

<211> 8

<212> PRT

50 <213> *Triticum aestivum*

<400> 24

55 Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp Asp
1 5

60 <210> 25

<211> 509

<212> ADN

<213> *Triticum aestivum*

65 <220>

<221> CDS

ES 2 344 113 T3

<222> (1)..(507)

<223>

5 <400> 25

10	aat ggc gct ttt gtc gaa caa ttt caa ata ttt tat agc gaa cta aaa	48
	Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys	
	1 5 10 15	
15	gac ttc ttt aat gcc ggc agc ctg ttt gaa caa ctg gaa tcc atc aag	96
	Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys	
	20 25 30	
20	gaa tct ttg aat gat tct ggc tta gaa gca ctg tca tca ttt gtc aaa	144
	Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys	
	35 40 45	
25	acc aaa cag agt ttg gac caa gtg gat gct gcg aac att caa gtt gtg	192
	Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val	
	50 55 60	
30	atg aag acc ttg cag tca ttg tct tca ttg aga tca gtt cta atg aag	240
	Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys	
	65 70 75 80	
35	ggc ctt gaa agt gcc ctt aga aat gat gcg act gat gcc ggt ata gca	288
	Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala	
	85 90 95	
40	atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gag att ggt ctt gag gat tat tct	336
	Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser	
	100 105 110	
45	ttt gtt ttg tta agc aga tat atc aat ggt ctt gaa gct tca ggt gga	384
	Phe Val Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly	
	115 120 125	
50	tca gct tca ctt gca caa tgt gtg gct gga aat aca agt gta tgg gac	432
	Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp	
	130 135 140	
55	gat acc ctt gat gcc ctt att att ggc gtc aat caa gtt agc ttt tca	480
	Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser	
	145 150 155 160	
60	ggt tgg aag cca gag gaa tgc att gct at	509
	Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala	
	165	

50 <210> 26

<211> 169

<212> PRT

55 <213> *Triticum aestivum*

60

65

ES 2 344 113 T3

<400> 26

5 Asn Gly Ala Phe Val Glu Gln Phe Gln Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys
1 5 10

10 Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys
20 30

15 Glu Ser Leu Asn Asp Ser Gly Leu Glu Ala Leu Ser Ser Phe Val Lys
35 40 45

20 Thr Lys Gln Ser Leu Asp Gln Val Asp Ala Ala Asn Ile Gln Val Val
50 55 60

25 Met Lys Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser Val Leu Met Lys
65 70 75 80

30 Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Thr Asp Ala Gly Ile Ala
85 90 95

35 Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp Tyr Ser
100 105 110

40 Phe Val Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Gly Leu Glu Ala Ser Gly Gly
115 120 125

45 Ser Ala Ser Leu Ala Gln Cys Val Ala Gly Asn Thr Ser Val Trp Asp
130 135 140

50 Asp Thr Leu Asp Ala Leu Ile Ile Gly Val Asn Gln Val Ser Phe Ser
145 150 155 160

55 Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Ile Ala
165