



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 217**

51 Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 1/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 9/00 (2006.01)
A01H 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00932464 .1**
96 Fecha de presentación : **15.05.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1179003**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2002**

54 Título: **Métodos para el aumento de la proliferación de células vegetales mediante la inhibición funcional de un gen inhibidor de la ciclina vegetal.**

30 Prioridad: **14.05.1999 US 134373 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2009

73 Titular/es:
**Fred Hutchinson Cancer Research Center
1100 Fairview Avenue North, MS C2M 027
Seattle, Washington 98109-1024, US**

72 Inventor/es: **Roberts, James y
Kelly, Beth**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 328 217 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

Métodos para el aumento de la proliferación de células vegetales mediante la inhibición funcional de un gen inhibidor de la ciclina vegetal.

5

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

La solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud Provisional de Estados Unidos de número de serie 60/134.373, solicitada el 14 de mayo de 1999.

10

Antecedentes de la invención

Las células eucariotas se desplazan de un estado proliferante a un estado inactivo sólo durante una ventana breve del ciclo celular. Temin. J. Cell. Phys. 78: 161 (1971). De este modo, dependiendo de su posición en el ciclo celular, las células privadas de mitógenos, tales como los presentes en el suero cuando se examinan células de mamífero, experimentarán una detención del ciclo celular inmediato, o completarán la mitosis y se detendrán en el siguiente ciclo celular. La transición desde la dependencia de mitógeno a la independencia de mitógeno tiene lugar en la fase media a tardía de G1 del ciclo celular. Pardee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1286 (1974), demostraron que muchas señales antimitogénicas diferentes provocan la detención del ciclo celular en un punto cinéticamente común y demostraron además que el ciclo celular se vuelve insensible a todas estas señales aproximadamente a la vez en la fase media a tardía de G1. Este punto se denominó el punto de restricción o punto R.

La cinematografía con el transcurso del tiempo de células individuales mitóticamente proliferantes también se ha utilizado para mapear de manera precisa la evolución temporal de la transición del ciclo celular a la independencia de mitógeno. Esto confirmó que la depleción de mitógeno u otras señales inhibitorias de crecimiento provocan que las células en la fase G1 temprana post-mitóticas dejen inmediatamente el ciclo celular y que el compromiso con el ciclo celular (autonomía de las señales mitogénicas) tiene lugar en la fase media de G1 (Larsson *et al.*, J. Cell. Phys. 139: 477 (1989) y Zetterberg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5365 (1985)). Estas observaciones conjuntas muestran que los controles dependientes de mitógeno en la proliferación celular están unidos a la progresión del ciclo celular.

30

El tránsito a través de la fase G1 y la entrada en la fase S requiere la acción de quinasas dependientes de ciclina (Cdks) (Sherr, Cell 79: 551 (1994)). Se ha observado que las señales inhibitorias de crecimiento previenen la activación de estas Cdks durante G1 (Serrano *et al.*, Nature 366: 704 (1993); Hannon y Beach, Nature 371: 257 (1994); El-Deiry *et al.*, Cell 75: 89 (1993); Xiong *et al.*, Nature 366: 701 (1993); Polyak *et al.*, Cell 78: 59 (1994); Toyoshima y Hunter, *ibid.*, p. 67; Lee *et al.*, Genes & Dev. 9: 639 (1995); Matsuoka *et al.*, *ibid.*, p. 650; Koff *et al.*, Science 260: 536 (1993)). Se sabe que la actividad catalítica de Cdks está regulada por dos mecanismos generales, la fosforilación de proteínas y la asociación con subunidades reguladoras (Gould *et al.*, EMBO J. 10: 3297 (1991); Solomon *et al.*, *ibid.*, 12: 3133 (1993); Solomon *et al.*, Mol. Biol. Cell 3: 13 (1992); Jeffrey *et al.*, Nature 376: 313 (1995); Morgan, Nature 374: 131 (1995)). Entre las subunidades reguladoras, la asociación de Cdks con subunidades CKI inhibitorias (Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina) se ha correlacionado más estrechamente con el efecto de la depleción de mitógeno en la proliferación celular y la actividad de Cdk.

35

Se utilizaron células vegetales en los estudios previos de crecimiento y división celular para establecer las fases del ciclo de células eucariotas. (Howard *et al.*, Heredity 6 (suppl.): 216-273 (1953)), pero poco se sabe sobre los mecanismos moleculares de la regulación del ciclo de las células vegetales. Las células vegetales que cesan su división *in vivo* debido a la dormancia, o *in vitro* debido a la privación de nutrientes, se detienen en los puntos de control principales en G1 y G2. (van't Hof *et al.*, in The Dynamics of Meristem Cell Populations, Miller *et al.* eds., Plenum, New York, pp 15-32 (1972), Gould *et al.*, Protoplasma 106: 1-13 (1981)). En general, este patrón está en concordancia con el observado en otros sistemas eucariotas. Se han aislado homólogos de cdc2 quinasa a partir de una serie de especies vegetales, incluyendo guisante (Feller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5397-5401 (1990)), alfalfa (Hirt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1636-1640 (1991) y Hirt *et al.*, Plant J. 4: 61-69 (1993)), y a partir de *A. thaliana*. (Ferreira *et al.*, Plant Cell 3: 531-540 (1991), Hirayama *et al.*, Gene 105: 159-165 (1991)), entre otros. Además, se han aislado de varias especies una serie de secuencias de ADNc que codifican ciclinas vegetales con características del tipo A, B o D o que tienen características del tipo A y B mixtas, incluyendo zanahoria y soja (Hata *et al.*, EMBO J. 10: 2681-2688 (1991)), y *Arabidopsis* (Hemerly *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3295-3299 (1992), y Soni *et al.*, Plant Cell 7: 85-103 (1995)), entre otros.

50

Recientemente, se han identificado secuencias de ADN que codifican inhibidores de quinasa dependientes de ciclinas de plantas de *Arabidopsis* (WO 99/14331; Wang *et al.*, Plant J. 15: 501-510 (1998)). Se ha sugerido las proteínas codificadas por las secuencias de ADN como moduladores de la división de células vegetales debido a su unión a ciclinas y efectos inhibitorios *in vitro* similares sobre quinasas. También se ha sugerido que la eliminación parcial y/o total de un gen o la reducción de la expresión de un gen que codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina vegetal podría influir y probablemente inhibiría la división celular (WO 99/14331).

60

La modificación genética de plantas, que supone el aislamiento y manipulación de material genético, y la posterior introducción de ese material en una planta, tejido vegetal o células vegetales, ha cambiado el cultivo de plantas y la agricultura de manera considerable durante los últimos años. Unas cantidades de alimentos de cosecha elevadas, mayores rendimientos, cantidad de alimento, menos costes de producción, resistencia a las plagas, tolerancia al estrés,

65

resistencia a la sequía y la producción de productos farmacéuticos y moléculas biológicas, así como otras características beneficiosas son todas potencialmente conseguibles mediante técnicas de modificación genética.

La capacidad de manipular la expresión de un gen proporciona un medio de producción de nuevas características en plantas transformadas. Por ejemplo, la capacidad de aumentar el tamaño del sistema de raíces de la planta permitiría la mayor asimilación de nutrientes de la tierra. Además, la capacidad de aumentar el crecimiento de las hojas, es decir, un aumento del tamaño de las hojas y/o el número de hojas, aumentaría la capacidad de una planta de asimilar energía solar. Obviamente, la capacidad de controlar el crecimiento de toda una planta, u órganos diana específicos de una planta, sería muy deseable.

Se pueden utilizar genes de control del ciclo celular para mejorar el crecimiento y desarrollo en las partes económicamente valiosas de las plantas de cosecha, incluyendo tanto plantas dicotiledóneas como plantas monocotiledóneas. En monocotiledóneas, el uso adicional de genes o proteínas de control del ciclo celular puede ser útil para mejorar su regenerabilidad a partir de callos.

Además, los genes del control del ciclo celular son sitios potenciales para influir en la división celular y el comportamiento en las etapas de desarrollo de plantas cuando el número de células influye en el rendimiento final de tejido económicamente valioso. Un ejemplo específico es el número de rondas de división nuclear en la etapa multinucleada del desarrollo de la endosperma en granos cereales o en la etapa de desarrollo del fruto o la flor.

En base a lo anterior, está claro que existe una necesidad por métodos para modular la división celular de células vegetales, tejidos vegetales, y plantas que albergan uno o más genes inhibidores de ciclina endógena funcionalmente inactivados y que también albergan opcionalmente un transgén que codifica un polipéptido inhibidor de ciclina heterólogo o una variante mutante del polipéptido inhibidor de ciclina que se expresa en por lo menos un subgrupo de células huésped. Los métodos y composiciones pueden aumentar la división celular mediante la inhibición funcional de la expresión o actividad de inhibidores de ciclina vegetal.

Además, la presente descripción proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína BRO4 de unión a ciclina del tipo D vegetal. Los transgenes de reconocimiento pueden inactivar un gen inhibidor de ciclina endógena, particularmente los genes que codifican proteínas que tienen motivos de unión para ciclina parecida a D vegetal y quinasas dependientes de ciclina. Los métodos pueden producir células vegetales transgénicas, tejidos vegetales transgénicos y plantas transgénicas que albergan un transgén correctamente reconocido de la invención. Los métodos también se pueden utilizar para inactivar genes inhibidores de ciclina en células explantadas de una planta (por ejemplo, para la inserción *ex vivo*), tal como para comunicar a las células reconocidas resultantes un fenotipo que resulta de un fenotipo de mayor proliferación celular.

Descripción resumida de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona un método para producir una variante de planta tal como se establece en la reivindicación 1.

Los métodos pueden modular el ciclo celular de células vegetales, de manera que se aumenta el crecimiento y/o rendimiento de una planta en comparación con una planta de tipo natural. El método comprende inactivar funcionalmente un gen inhibidor de ciclina parecida a D vegetal. La inactivación funcional se puede inducir mediante modificación genética del gen inhibidor de ciclina, tal como mediante la modificación física del gen inhibidor de ciclina, la inserción de un gen que codifica una molécula antisentido específica para una secuencia que codifica un gen inhibidor de ciclina, o el silenciamiento inducido por ARN de doble cadena, es decir (ARNi) y similares. El ciclo celular también se puede modular mediante la disposición de un inhibidor de la formación de un complejo ciclina/quinasa dependiente de ciclina, es decir, moléculas pequeñas, anticuerpos, policlonales y monoclonales, proteínas recombinantes de unión a antígeno, y similares.

Un método para producir células vegetales transgénicas que tienen una mayor velocidad de crecimiento y/o rendimiento en comparación con una planta de tipo natural correspondiente puede comprender, poner en contacto las células vegetales con secuencias de ácido nucleico que pueden desunir funcionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína inhibidora de ciclina para obtener células vegetales transformadas; producir plantas a partir de las células vegetales transformadas y seleccionar plantas que muestran una mayor velocidad de crecimiento o rendimiento en comparación con una planta de tipo natural. El gen que codifica el inhibidor de ciclina es el gen *BRO4*.

Un método para producir una planta caracterizada por tener una mayor velocidad de crecimiento y/o rendimiento en comparación con una planta de tipo natural puede comprender poner en contacto una planta con un agente que es un inhibidor de un inhibidor de ciclina. El agente evita que el inhibidor de ciclina interactúe con un complejo de ciclina parecida a D/quinasa dependiente de ciclina de plantas y, por lo tanto, permite que la célula continúe su división. Agentes adicionales pueden inducir la expresión de un inhibidor de la proteína inhibidora de ciclina.

Las poblaciones de células vegetales aisladas y plantas aisladas se pueden tratar con un inhibidor de un inhibidor de ciclina parecida a D vegetal y, por tanto, presentan una mayor proporción de células divisoras con respecto a células no divisoras en relación con la proporción en una población de células no tratadas. Las células divisoras, protoplastos transgénicos, son particularmente útiles en la generación de plantas completas transgénicas.

Las secuencias de polinucleótidos aisladas pueden codificar una proteína de unión a ciclina parecida a D vegetal designada como BRO4. En una realización particular, la proteína también es capaz de unirse e inactivar un complejo ciclina/quinasa dependiente de ciclina de plantas, es decir, un inhibidor de ciclina parecida a D vegetal, y se puede utilizar para aumentar la proliferación de células vegetales.

5 Una proteína inhibidora de ciclina parecida a D vegetal sustancialmente purificada puede ser purificada por la secuencia de polinucleótidos *BRO4*.

10 Los vectores pueden comprender la secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del inhibidor de ciclina BRO4, o el complemento de la misma. También se proporcionan sistemas vectores huésped para la expresión de un inhibidor de ciclina, donde el inhibidor es capaz de unir una ciclina parecida a D vegetal y un complejo de ciclina parecida a D/cdk de plantas.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 representa la medición de la anchura (mm) de la hoja más grande de roseta de varias líneas de plantas transgénicas ICK-IR y plantas de control.

20 La figura 2 representa la medición del peso de la primera hoja de caulina de varias líneas de plantas transgénicas ICK-IR y plantas de control.

La figura 3 representa la medición de las alturas del tallo (mm) de varias líneas de plantas transgénicas ICK-IR y plantas de control.

25 La figura 4 es una representación ilustrada de una unidad de metámero y la estructura en una planta.

Descripción de las realizaciones específicas

30 Antes de establecer la invención, puede ser de ayuda para la comprensión de la misma el establecimiento de definiciones de ciertos términos a utilizar en la presente.

Definiciones

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado tal como se entiende habitualmente por un técnico en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente invención para la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los objetivos de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

40 “Proteína inhibidora de ciclina” o “polipéptido inhibidor de ciclina”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una proteína o polipéptido que se une a e inactiva una quinasa dependiente de ciclina (CDK) o una proteína relacionada en el mecanismo de la ciclina en una célula. Las proteínas BRO3 y BRO4 son ejemplos de proteínas inhibidoras de ciclina vegetal. Un gen inhibidor de ciclina tal como se utiliza en la presente invención es una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína o polipéptido inhibidora de ciclina incluyendo todas las secuencias de nucleótidos que comprenden nucleótidos alternativos que codifican la misma secuencia de aminoácidos debido a la degeneración del código genético.

50 Tal como se utiliza aquí, el término “gen inhibidor de ciclina” o “locus del gen inhibidor de ciclina” se refiere a una región de un cromosoma que abarca todos los exones que potencialmente codifican un polipéptido inhibidor de ciclina y que se extienden a través de secuencias flanqueantes (por ejemplo, que incluyen promotores, potenciadores y similares) que participan en la expresión de proteínas inhibidoras de ciclina. Una realización particular de la presente invención comprende el gen *BRO4*, que pueden estar desunido y, si se desea, puede ser sustituido por un gene o minigén heterólogo cognado, es decir, mediante una desunión estructural o silenciamiento.

55 El término “desunido”, tal como se utiliza aquí, significa que un locus de gen puede estar “estructuralmente desunido” para comprender por lo menos una mutación o alteración estructural, de manera que el gen desunido es incapaz de dirigir la expresión eficaz de un producto génico funcional o el gen puede estar “funcionalmente inactivado”, de manera que un locus de gen no se expresa o es incapaz de expresar un producto génico funcional. La inactivación funcional puede resultar de una desunión estructural y/o interrupción de la expresión al nivel de transcripción o traducción. La inactivación funcional de un gen inhibidor de ciclina endógena, tal como gen Bro3 (FL39), BRO4 o ICK1, también se puede producir mediante otros métodos, por ejemplo, supresión del gen de polinucleótidos antisentido, silenciamiento del gen inducido por ARN de doble cadena, y similar.

65 El término “correspondiente a” se entiende aquí como una secuencia de polinucleótidos que comparte identidad con toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia. El término “complementario a” se entiende aquí como la secuencia que es complementarias a toda o parte de la secuencia de polinucleótidos de referencia.

Los términos “sustancialmente corresponde a”, “sustancialmente homóloga” o “identidad sustancial”, tal como se utiliza aquí, indica una característica de una secuencia de ácidos nucleicos, donde la secuencia de ácidos nucleicos tiene por lo menos aproximadamente un 70 por ciento de identidad en la secuencia en comparación con una secuencia de referencia, habitualmente por lo menos aproximadamente un 85 por ciento de identidad en la secuencia, y preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95 por ciento de identidad en la secuencia en comparación con una secuencia de referencia. El porcentaje de identidad en la secuencia se calcula excluyendo pequeñas eliminaciones o adiciones que representan menos de un 25 por ciento de la secuencia de referencia. La secuencia de referencia puede ser un subgrupo de una secuencia más grande, tal como una parte de un gen o secuencia flanqueante o una parte repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, la secuencia de referencia tiene por lo menos 18 nucleótidos de largo, habitualmente por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de largo y preferiblemente por lo menos aproximadamente 50 a 100 nucleótidos de largo. “Sustancialmente complementaria”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia que es complementaria a una secuencia que sustancialmente corresponde a una secuencia de referencia.

La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith *et al.*, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman *et al.*, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), o mediante inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones por parejas de manera progresiva para mostrar la relación y el porcentaje de identidad en la secuencia. También permite la representación de un árbol o dendrograma que muestra las relaciones por agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng *et al.*, J. Mol. Evol. 35: 351-360 (1987). El método utilizado es similar al método descrito por Higgins *et al.*, CABIOS 5:151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple empieza con la alineación por parejas de las dos secuencias más relacionadas. Este grupo se alinea a continuación con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Se alinean dos grupos de secuencias mediante una simple extensión de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones progresivas por parejas. El programa se desarrolla mediante la designación de secuencias específicas y sus aminoácidos o nucleótidos se coordinan para la comparación con regiones de secuencias y mediante la designación de parámetros de programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia se puede comparar con otras secuencias de prueba para determinar el porcentaje de identidad en la secuencia utilizando los siguientes parámetros: peso de espacio defecto (3,00), peso de la longitud del espacio defecto (0,10) y espacios en los extremos ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad en la secuencia y de similitud en la secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar parejas de secuencias con una valoración elevada (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia en cuestión, que coincide o satisface parte de la valoración umbral T valorada de forma positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como la valoración umbral de palabras en la región (Altschul *et al.*, *supra*). Estos aciertos de palabras en la región iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largas que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden a continuación en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia de manera que se puede aumentar la valoración de la alineación acumulada. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detuvo cuando: la valoración de la alineación acumulada disminuye en una cantidad X desde su valor máximo conseguido; la valoración acumulada cae a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que se valoran en negativo; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de alineación. El programa BLAST utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, las alineaciones (B) de la matriz de valoración de BLOSUM62 (véase, Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1015 (1989)) de 50, expectación (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

Además de calcular el porcentaje en la identidad de secuencias, el algoritmo BLAST también realiza análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5878 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de la suma (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual un emparejamiento ente dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos tendría lugar por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de la suma en una prueba de comparación es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01 y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

En general, la eficacia de reconocimiento aumenta con la longitud de la parte transgén de reconocimiento (es decir, la región de homología) que es sustancialmente complementaria a una secuencia de referencia presente en el ADN diana (es decir, la secuencia diana de cruzamiento). En general, la eficacia de reconocimiento se optimiza con el uso de pinzas de homología de ADN isogénicas, aunque se reconoce que la presencia de varias recombinasas puede reducir el grado de identidad en la secuencia requerida para una recombinación eficaz.

ES 2 328 217 T3

El término “secuencia no homóloga”, tal como se utiliza aquí, tiene un significado tanto general como específico; se refiere en general a una secuencia que no es sustancialmente idéntica a una secuencia de referencia específica, y, cuando no se identifica explícitamente una secuencia de referencia concreta, se refiere específicamente a una secuencia que no es sustancialmente idéntica a una secuencia de por lo menos aproximadamente 50 bases contiguas en un gen inhibidor de ciclina endógeno reconocido, tal como un gen *BRO4*.

La hibridación específica se define aquí como la formación de híbridos entre una secuencia de transgén de reconocimiento (por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína inhibidora de ciclina parecida a D vegetal que puede incluir sustituciones, eliminaciones y/o adiciones) y una secuencia de ADN diana específica (por ejemplo, una secuencia del gen *BRO4*), donde una secuencia de transgén de reconocimiento marcada se hibrida preferencialmente a la diana, de manera que, por ejemplo, se puede identificar una única banda correspondiente a un fragmento de restricción de un gen inhibidor de ciclina genómica en una transferencia Southern de ADN preparado a partir de células utilizando dicha secuencia de transgén de reconocimiento marcada como sonda. Es evidente que las condiciones óptimas de hibridación variarán dependiendo de la composición de la secuencia y la longitud o longitudes del transgén o transgenes de reconocimiento y la diana o dianas endógenas y el método experimental seleccionado por el experto. Se pueden utilizar varias directrices para seleccionar las condiciones de hibridación apropiadas (véase, Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory Manual (1989) 2ª Ed., Cold Spring Harbor, N.Y. y Berger y Kimmel, Methods in Enzymology, Volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA.).

El término “natural”, tal como se utiliza aquí cuando se aplica a un objeto, se refiere a un objeto que se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se puede modificar intencionalmente por el hombre en el laboratorio es natural. Tal como se utiliza aquí, las cepas de plantas de laboratorio que se pueden reproducir selectivamente según la genética clásica se consideran plantas naturales.

El término “homólogo” tal como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia génica que está relacionada evolutivamente y funcionalmente ente especies.

Tal como se utiliza aquí, el término “construcción de reconocimiento” se refiere a un polinucleótido que comprende: (1) por lo menos una región de homología que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica o sustancialmente complementaria a una secuencia presente en un locus de gen endógeno de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal de una célula huésped, y (2) una región de reconocimiento que se integra en un locus de gen endógeno de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal de una célula huésped mediante la recombinación homóloga entre una región de homología de la construcción de reconocimiento y dicha secuencia del locus del gen endógeno de inhibidor de ciclina. Si la construcción de reconocimiento es una construcción del tipo “hit-and-run” o “in-and-out” (Valancius y Smithies, Mol. Cell Biol. 11: 1402 (1991); Donehower *et al.*, Nature 356: 215 (1992), la región de reconocimiento sólo se incorpora de manera transitoria en el locus del gen endógeno del inhibidor de ciclina y se elimina del genoma huésped mediante selección. Una región de reconocimiento puede comprender una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia de gen endógeno de inhibidor de ciclina y/o puede comprender una secuencia no homóloga, tal como un marcador seleccionable (por ejemplo, *neo*, *tk*, *gpt*). El término “construcción de reconocimiento” no indica necesariamente que el polinucleótido comprende un gen que se integra en el genoma huésped, ni indica necesariamente que el polinucleótido comprende una secuencia génica estructural completa. Tal como se utiliza en la técnica, el término “construcción de reconocimiento” es sinónimo con el término “transgén de reconocimiento” tal como se utiliza aquí.

El término “región de homología” o “pinza de homología”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un segmento (es decir, una parte) de una construcción de reconocimiento que tiene una secuencia que se corresponde sustancialmente o es sustancialmente complementaria a una secuencia génica endógena de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal predeterminada, la cual puede incluir secuencias que flanquean dicho gen inhibidor de ciclina. Una región de homología tiene en general por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos de largo, preferiblemente por lo menos aproximadamente de 250 a 500 nucleótidos de largo, habitualmente por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos de largo o más largos. Aunque no existe una longitud mínima teóricamente demostrada para una pinza de homología para mediar en la recombinación homóloga, se cree que la eficacia de la recombinación homóloga aumenta generalmente con la longitud de la pinza de homología. De manera similar, la eficacia de recombinación aumenta con el grado de homología de secuencia ente una región de homología de la construcción de reconocimiento y la secuencia diana endógena, teniendo lugar una óptima eficacia de recombinación cuando la pinza de homología es isogénica con la secuencia diana endógena.

Los términos “pinza de homología” y “región de homología” tal como se utilizan aquí son intercambiables y la terminología alternativa se utiliza por claridad, a la luz del uso inconsistente de términos similares en la técnica. Una pinza de homología no connota necesariamente la formación de una estructura híbrida de pares de bases con una secuencia endógena. Las secuencias de genes endógenos del inhibidor de ciclina parecida a D vegetal que corresponden sustancialmente o son sustancialmente complementarias a una región de homología de transgén se refieren aquí como “secuencias diana de cruzamiento” o “secuencias diana endógenas”.

Tal como se utiliza aquí, el término “construcción correctamente reconocida” se refiere a una parte de la construcción de reconocimiento que está integrada en una secuencia diana endógena de cruzamiento o adyacente a la misma, tal como una parte de un locus del gen endógeno *BRO4*. Es posible generar células que presenten tanto un transgén

o transgenes correctamente reconocidos como un transgén o transgenes incorrectamente reconocidos. Las células y plantas que tienen un transgén o transgenes correctamente reconocidos y/o un transgén o transgenes incorrectamente reconocidos se pueden identificar y aislar mediante PCR y/o análisis de transferencia Southern de ADN genómico.

5 Tal como se utiliza aquí, el término “región de reconocimiento” se refiere a una parte de una construcción de reconocimiento que se integra en una localización cromosómica endógena después de la recombinación homóloga entre una pinza de homología y un gen endógeno de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal, tal como una secuencia
 10 génica *BRO4*. Habitualmente, una región de conocimiento está flanqueada en cada lado por una pinza de homología, de manera que una recombinación de doble cruzamiento entre cada una de las pinzas de homología y sus correspondientes
 15 secuencias de genes endógenos de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal da lugar a una sustitución de la parte del locus del gen endógeno de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal por la región de reconocimiento; en dichas construcciones de reconocimiento por sustitución génica de doble cruzamiento, a la región de reconocimiento se puede hacer referencia como “región de sustitución”. Sin embargo, algunas construcciones de reconocimiento pueden utilizar sólo una única pinza de homología (por ejemplo, algunos vectores del tipo “hit-and-run”, véase Bradley *et al.*,
 Bio/Technology 10:534 (1992).

El término “agente” se utiliza aquí para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, es decir, un anticuerpo, policlonal o monoclonal, específico de un inhibidor de ciclina
 20 parecida a D vegetal, o un extracto fabricado a partir de materiales biológicos, tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos de animales (particularmente plantas).

El término “fenotipo knockout de inhibidor de ciclina” se refiere a una característica fenotípica presente en plantas +/- y -/- de genes inhibidores de ciclina (por ejemplo, *Arabidopsis hemizigótica* u homocigótica para alelos de inhibidores de ciclina funcionalmente inactivados, es decir, un gen de la familia *BRO4*) y ausente en plantas de tipo
 25 natural de la misma especie, cepa y edad cuando se desarrollaron en las mismas condiciones. Entre los ejemplos se incluyen los descritos aquí, por ejemplo, hiperplasia, hipertrofia general, características hiperplásicas, hipercelulares y otras características fenotípicas indicadas aquí cuando se comparan con el fenotipo de tipo natural.

El término “célula vegetal” tal como se utiliza aquí se refiere a protoplastos, células productoras de gametos y
 30 células que pueden regenerar las plantas completas. Tal como se utiliza aquí, el término “planta” se refiere a una planta completa, una célula vegetal o un grupo de células vegetales, tales como tejido vegetal o semilla vegetal. Las plaquetas también se incluyen en el significado de “planta”. Las plantas incluidas en la presente invención son cualquier planta, particularmente plantas económicamente importantes, susceptibles de técnicas de transferencia génicas, incluyendo gimnospermas y angiospermas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.
 35

Ejemplos de angiospermas monocotiledóneas incluyen, pero sin limitación, espárrago, maíz de campo y maíz dulce, cebada, trigo, arroz, sorgo, cebolla, mijo, centeno y avena y otros granos de cereales. Ejemplos de angiospermas dicotiledóneas incluyen, pero sin limitación, tomate, tabaco, algodón, colza, judía, soja, pimiento, lechuga y similares.
 40 Ejemplos de especies amaderadas incluyen álamo, pino, cedro, roble y similares.

El término “modificación genética”, tal como se utiliza aquí, se refiere a la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico exógenas (es decir, un gen heterólogo), por ejemplo, una secuencia codificante de inhibidor de ciclina parecida a D vegetal, así como secuencias reguladoras en una o más células vegetales, que pueden generar plantas viables completas sexualmente competentes. El término “modificado genéticamente” tal como se utiliza aquí
 45 se refiere a una planta que se ha generado a través del proceso mencionado anteriormente.

Un método preferido de introducción de las secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo un gen heterólogo deseado, en células vegetales es infectar una célula vegetal, un explante, un meristema o una semilla con *Agrobacterium tumefaciens* transformada previamente con la secuencia de ácido nucleico. Bajo condiciones apropiadas conocidas
 50 en la técnica, las células vegetales transformadas crecen a partir de brotes, raíces y se desarrollan posteriormente a plantas. La secuencia de ácido nucleico se puede introducir en células vegetales apropiadas, por ejemplo, mediante el plásmido Ti o Ri de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti o Ri se transmite a las células vegetales tras la infección por *Agrobacterium tumefaciens* y se integra de manera estable en el genoma de la planta (Horsch *et al.*, Science 233: 496-498 (1984); Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983). Un método con *Agrobacterium* es la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* in planta por infiltración, por ejemplo, de plantas *Arabidopsis thaliana* adultas; Bechtold *et al.*, C.R. Acad. Sci. Life Sciences 316:1194-1199 (1993).
 55

Todas las células vegetales que se pueden infectar y posteriormente transformar por *Agrobacterium* y las plantas completas regeneradas a partir de las células transformadas también se pueden transformar según la presente invención
 60 para producir plantas completas transformadas que contienen la secuencia de ácidos nucleicos transferida. Las células vegetales se pueden transformar con *Agrobacterium* de varias maneras, incluyendo: co-cultivo de *Agrobacterium* con protoplastos aislados cultivados, transformación de células o tejidos con *Agrobacterium* o transformación de semillas, ápices o meristemas con *Agrobacterium*.

En la transformación de plantas con *A. Tumefaciens*, un ADN transformante (T-ADN) se modifica habitualmente para incorporar una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen heterólogo deseado. El T-ADN recombinante contiene el gen heterólogo deseado entre secuencias reguladoras no codificantes flanqueantes y las regiones límites izquierda y derecha del plásmido (Ti) inductor de tumores de tipo natural. El T-ADN recombinante se puede disponer
 65

como una parte de un plásmido integrador que se integra en un plásmido Ti de tipo natural mediante recombinación homóloga. Habitualmente, sin embargo, el T-ADN recombinante se dispone en un vector binario y se transfiere en una célula vegetal a través de la acción de genes *vir* que actúan en trans en un plásmido Ti auxiliar. El ADN-T se integra aleatoriamente en el genoma nuclear con algunos de los transformantes que permiten la expresión de la proteína deseada. La selección de transformantes también se puede realizar mediante la selección de un marcador fenotípico. Estos marcadores fenotípicos incluyen, pero sin limitación, resistencia a antibiótico, resistencia a herbicida u observación visual. Se conocen otros marcadores fenotípicos en la técnica y se pueden utilizar en la presente invención.

Si se eligen métodos de introducción de ácido nucleico desnudo, entonces el vector no necesita ser más de la secuencia de ácido nucleico mínima necesaria para conferir las características deseadas sin necesidad de otras secuencias adicionales. De este modo, los posibles vectores incluyen los vectores plásmidos Ti, vectores lanzadera diseñados únicamente para maximizar el rendimiento de cantidades elevadas de copias, vectores episomales que contienen secuencias mínimas necesarias para la replicación final una vez ha tenido lugar la transformación, vectores transposones, vectores de recombinación homólogos, vectores mini-cromosoma, y vectores virales, incluyendo la posibilidad de formas de ARN de secuencias génicas. La selección de vectores y métodos para construirlos son normalmente conocidos para personas expertas en la materia y se describen en referencias técnicas generales (Bai *et al.*, *Methods in Enzymology*, *supra*).

Sin embargo, cualquier secuencia de vector adicional que confiera resistencia a la degradación de la secuencia de ácidos nucleicos a introducir y que ayude en el proceso de integración genómica o proporcione un medio para seleccionar fácilmente aquellas células o plantas que están, en realidad, transformadas son ventajosas y disminuyen ampliamente la dificultad de seleccionar transgenotas utilizables.

Todas las plantas transformables a partir de las cuales pueden generarse las plantas completas regeneradas son útiles en la presente invención. Las monocotiledóneas se pueden transformar con *Agrobacterium* mediante electroporación (Fromm *et al.*, *Nature* 319: 791-793 (1986); Rhodes *et al.*, *Science* 240: 204-207 (1988)); mediante transferencia génica directa (Baker *et al.*, *Plant Genetics* 201-211 (1985)); mediante la utilización de vectores mediados por polen (EP 0 270 356); y mediante inyección de ADN en vástagos florales (de la Pena *et al.*, *Nature* 325: 274-276 (1987)).

Otro método para introducir un fragmento de ácido nucleico que codifica un gen inhibidor de ciclina en una célula vegetal es la penetración balística de alta velocidad mediante partículas pequeñas con la secuencia de ácidos nucleicos a introducir contenida en la matriz de dichas partículas o en la superficie de las mismas. (Klein *et al.*, *Nature* 327:70 (1970). También se describen métodos de transformación por bombardeo en Sanford *et al.* (*Techniques* 3: 3-16 (1991)) y Klein *et al.*, *Bio/Tecniques* 10:286 (1992)). Aunque habitualmente sólo se requiere una única introducción de una nueva secuencia de ácidos nucleicos, este método proporciona particularmente introducciones múltiples.

Para insertar fragmentos de ácidos nucleicos también se pueden utilizar otros virus que infectan ciertos tipos de plantas. Por ejemplo, también se puede utilizar el virus del mosaico de coliflor (CaMV). (Patente de Estados Unidos No. 4.407.956). El genoma del ADN viral de CaMV se inserta en un plásmido bacteriano parental que crea una molécula de ADN recombinante que se puede propagar en bacterias. Después de la clonación, el plásmido recombinante se puede clonar de nuevo y modificar adicionalmente mediante la introducción de la secuencia de ácidos nucleicos deseada. La parte viral modificada del plásmido recombinante se escinde a continuación del plásmido bacteriano parental y se utiliza para transformar o transfectar las células vegetales o plantas.

Normalmente, se regenera una célula vegetal para obtener una planta completa a partir del proceso de transformación. Al producto intermedio de la transformación se hace referencia como una "transgenota". La regeneración a partir de protoplastos varía de especie a especie de plantas, pero generalmente, se realiza en primer lugar una suspensión de protoplastos. En ciertas especies, la formación de embriones se puede entonces inducir a partir de la suspensión de protoplastos. El medio de cultivo contendrá generalmente varios aminoácidos y hormonas, necesarios para el crecimiento y la regeneración. Ejemplos de hormonas utilizadas incluyen auxinas y citoquininas. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo, y de la historia del cultivo. Si estas variables están controladas, la regeneración es reproducible.

La regeneración también tiene lugar a partir de callos, órganos y partes de la planta. La transformación se puede realizar en el contexto de la regeneración de partes de la planta. (véase, *Methods in Enzymology* 118, y Klee *et al.* *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38: 467 (1987)). Utilizando del método de transformación-regeneración de discos de hoja de Horsch *et al.*, *Science* 227: 1229 (1985), los discos se cultivan en medios selectivos, seguido de la formación de brotes en aproximadamente 2-4 semanas. Los brotes que se desarrollan se escinden de los callos y se transplantan a un medio selectivo adecuado inductor de raíces. Las plántulas con raíces se transplantan en la tierra tan pronto como es posible después de aparecer las raíces. Las plántulas se pueden replantar según sea necesario hasta alcanzar la madurez.

En cosechas propagadas de manera vegetativa, las plantas transgénicas maduras se pueden propagar mediante la utilización de esquejes o técnicas de cultivo de tejido para producir múltiples plantas idénticas. Se realiza la selección de transgenotas deseables y se obtienen nuevas variedades y de propagan de manera vegetativa para uso comercial.

En cosechas propagadas por semilla, las plantas transgénicas maduras se pueden autocruzar para producir una planta homocigótica endocriada. La planta endocriada resultante produce semillas que contienen el gen o genes ex-

ES 2 328 217 T3

traños recién introducidos. Estas semillas se pueden desarrollar para producir plantas que producirían el fenotipo seleccionado, por ejemplo, mayor tamaño y/o rendimiento.

Las partes obtenidas a partir de plantas regeneradas, tales como flores, semillas, hojas, ramas, raíces, fruto y similares están comprendidas como parte de la presente invención, siempre que estas partes comprendan células vegetales que han sido transformadas tal como se ha descrito. La progenie y variantes y mutantes de las plantas regeneradas también están incluidas en el alcance de la presente invención, siempre que estas partes comprendan las secuencias de ácidos nucleicos introducidas.

Un ácido nucleico, polinucleótido o polipéptido “aislado” es un ácido nucleico, polinucleótido o polipéptido que está sustancialmente separado de otros contaminantes que lo acompañan de manera natural, por ejemplo, proteínas, lípidos y otras secuencias de ácidos nucleicos y/o polinucleótidos. El término comprende secuencias de ácidos nucleicos y/o polinucleótidos que han sido extraídas o purificadas de su medio natural o biblioteca de clones e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos.

Una familia de genes, designada aquí como *BRO*, codifican productos proteicos capaces de unirse a una ciclina vegetal. El producto gen proteína es capaz de unirse a una ciclina vegetal y de inhibir la actividad de un complejo ciclina/quinasa dependiente de ciclina de plantas.

Los miembros de la familia del gen *BRO* codifican un dominio de secuencia de aminoácidos que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos, donde dicho dominio es el dominio de unión a ciclina vegetal. El dominio de unión de consenso para una ciclina parecida a D vegetal comprende la secuencia

Glu Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Phe,

donde Xaa₁ puede ser Leu, Ile u otro residuo de aminoácido hidrofóbico, Xaa₂ puede ser Glu o Asp, Xaa₃ puede ser Leu, Arg, Asp o cualquier otro residuo de aminoácido, y Xaa₄ puede ser Phe, Leu, u otro residuo de aminoácido hidrofóbico (SEC ID No. 9). Este dominio se localiza de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos desde el dominio de unión a quinasa dependiente de ciclina descrito aquí a continuación, cuando está presente el dominio de unión a quinasa dependiente de ciclina.

Los miembros de la familia del gen *BRO* codifican además una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se une específicamente a una quinasa dependiente de ciclina y que es capaz de inhibir la actividad del complejo ciclina/cdk en la regulación del ciclo celular. La secuencia de aminoácidos que codifica el motivo de quinasa dependiente de ciclina es homóloga a la de una quinasa dependiente de ciclina de células de mamífero y comprende generalmente la secuencia de residuos de aminoácidos:

Lys Tyr Asn Phe Asp Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Pro Leu

Xaa₆ Xaa₇ Gly Arg Tyr Xaa₈ Trp Xaa₉ Xaa₁₀ Leu Xaa₁₁;

donde Xaa₁ puede comprender Phe o Ile, Xaa₂ puede comprender Glu o Val, Xaa₃ puede comprender Lys o Asn, Xaa₄ puede comprender Asp o Glu, Xaa₅ puede comprender Glu o Lys, Xaa₆ puede comprender Gly o Glu, Xaa₇ puede estar ausente o puede comprender Gly, Xaa₈ puede comprender Glu o Lys, Xaa₉ puede comprender Val o Asp, Xaa₁₀ puede comprender Lys o Arg, Xaa₁₁ puede comprender Asn o Glu (SEC ID No. 10). Son aceptables otras sustituciones en la secuencia siempre y cuando la proteína sea capaz de unirse a una ciclina vegetal y sea capaz de inhibir la actividad del complejo ciclina/cdk.

La inhibición de la activación de un complejo ciclina/cdk de plantas se puede medir, por ejemplo, utilizando ensayos para (a) la fosforilación específica de sitio del grupo cdk o el complejo ciclina/cdk de plantas, y (b) la actividad de proteína quinasa. Dichos ensayos se describen de manera detallada en la presente invención. Estos ensayos se pueden realizar de un modo cinético, es decir, midiendo la velocidad de fosforilación o como ensayos estáticos cualitativos o cuantitativos, es decir, mediciones realizadas en puntos de tiempo seleccionados. Los expertos en la materia entenderán que se pueden utilizar un conjunto de enzimas y condiciones en dichos ensayos.

Se pueden obtener genes inhibidores de ciclina parecida a D vegetal, a modo de ejemplo, mediante la utilización de un cribado de dos híbridos en levadura. Los métodos para realizar un cribado de dos híbridos en levadura se describen en, por ejemplo, Fields y Sternglanz Trends in genetics 10: 286-292 (1994), y Bai *et al.*, Methods in Enzymology 273: 331-347 (1996). En general, el cribado de dos híbridos en levadura se ideó para identificar genes que codifican proteínas que se asocian físicamente con una proteína diana *in vivo*. En una realización preferida, la construcción “cebo” comprende un vector de expresión que codifica un dominio de unión a ADN, es decir, el vector del dominio de unión a ADN de *GAL4* pAS1, pAS2, pGBT9, o similares, fusionado a la secuencia de nucleótidos que codifica una ciclina vegetal. En una realización particularmente preferida, la construcción “cebo” codifica una ciclina parecida a D vegetal. A continuación, se puede producir una biblioteca de ADNc de fusión a partir de la planta de interés, es decir de *Arabidopsis thaliana* con el dominio de activación de *GAL4*, es decir, el vector del dominio de activación de *GAL4* pACT1, pACT2, o similares. Los dos plásmidos de fusión se pueden transformar a continuación en una cepa informadora de levadura. Se realiza la identificación de aquellas células de levadura que contienen secuencias

de nucleótidos de la biblioteca de *Arabidopsis* que interaccionan con una ciclina parecida a D vegetal y similares. A continuación, los fragmentos de ADNc que codifican miembros de la familia de genes inhibidores de ciclina BRO se pueden aislar e identificar.

5 Alternativamente, se puede ensayar una biblioteca genómica de una planta completa, un tejido vegetal o células vegetales con, por ejemplo, un cebador de oligonucleótidos híbridos degenerados de consenso (CODEHOP) para la amplificación de secuencias poco relacionadas tal como se describe por Rose *et al.* (Nuc. Acids Res. 26: 1628-1635 (1998)). Brevemente, se utiliza un cebador que comprende una región central degenerada 3' corta y una región pinza consenso 5' más larga para la amplificación PER. Con este método son necesarios sólo 3-4 residuos de aminoácidos
10 altamente conservados para diseñar la secuencia central, la cual se estabiliza por la pinza durante la hibridación a moléculas molde. Se puede utilizar una secuencia de nucleótidos del dominio de unión a ciclina de un gen de la familia BRO para generar una región pinza consenso 5' de desde aproximadamente 18 a aproximadamente 25 pares de bases. Se puede diseñar una región central 3' degenerada de aproximadamente 11 a 12 pares de bases en base a una de las secuencias del gen BRO proporcionadas como SEC ID No. 1, SEC ID No. 3, SEC ID No. 5 y SEC ID No. 7. El programa CODEHOP está disponible en <http://blocks.fhrc.org/codchop.html> y se relaciona directamente a partir de
15 la alineación de secuencias múltiples BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos empezando con un grupo de secuencias de proteínas relacionadas.

Los cebadores se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. El ADN genómico se puede extraer de una fuente vegetal, por ejemplo, utilizando kits disponibles comercialmente diseñados para ADN vegetal. Los productos de PCR completos se pueden clonar utilizando cualquiera de una serie de vehículos plasmídicos de clonación y se pueden analizar mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa y la secuenciación de ADN utilizando métodos estándar (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular
20 Biology, Wiley, Nueva York (1994). Se pueden producir dendrogramas utilizando procedimientos "neighbor-joining" y "bootstrapping" en ClustalW (Thompson *et al.*, Nuc. Acids Res. 22: 4673-4680 (1994)) tal como se implementa en la página web de BLOCKS (Lisitsyn *et al.*, Science 259: 946-951 (1993); <http://blocks.fhrc.org>).

En general, la secuencia de polinucleótidos del inhibidor de ciclina parecida a D vegetal transcribable o su complemento inverso contienen un promotor unido operativamente capaz de actuar en la célula vegetal en la que se transfiere el polinucleótido. Entre los ejemplos de promotores funcionales en plantas se incluyen, sin limitación, CaMV 35S, E8 de tomate, patatina, ubiquitina, manopina sintasa (*mas*), *actina I* de arroz, glicina de proteína de semilla de soja (Gyl) y la proteína de almacenamiento vegetativo de soja (*vsp*). Muchos promotores híbridos, tales como Mac, que comprende elementos de la CaMV 35S combinados con la región 3' del promotor de manopina sintasa (Comai *et al.*,
35 Plant Mol, Biol. 15: 373-381 (1990)) son también útiles en la presente invención.

La secuencia de polinucleótidos del inhibidor de ciclina parecida a D vegetal transcribable tiene habitualmente por lo menos 25 nucleótidos de largo, más habitualmente por lo menos 50-100 nucleótidos de largo, frecuentemente por lo menos 100-200 nucleótidos de largo, a menudo por lo menos 500 nucleótidos de largo, o más largos, hasta la longitud del gen endógeno completo (que se extiende desde el promotor hasta la secuencia de terminación de la transcripción/sitio de poliadenilación). La secuencia del inhibidor de ciclina transcribable está situada en relación al promotor, de manera que un transcrito de ARN de la secuencia transcribable tiene la misma polaridad o del complemento inverso que el transcrito de ARNm del gen endógeno (es decir, orientación de sentido o antisentido).

45 El polinucleótido que codifica el inhibidor de ciclina parecida a D vegetal puede ser parte de un polinucleótido más grande, tal como un transgén que tiene un marcador seleccionable para identificar células que tienen integrado el transgén, o una construcción de recombinación homóloga que tiene un marcador o marcadores seleccionables y regiones de homología para dirigir el polinucleótido del inhibidor a una posición predeterminada en el genoma de las células. Los polinucleótidos que codifican el inhibidor pueden estar en forma de un cassette de expresión heteróloga
50 en una célula transfectante o célula transgénica. Frecuentemente, el polinucleótido que codifica el inhibidor se obtiene como un vector producido con ADN aislado de una copia clonada (o parte de la misma) del gen endógeno diana. La secuencia de polinucleótidos del inhibidor se aísla normalmente como parte de un clon del gen genómico, aunque en algunas realizaciones se puede utilizar un clon de ADNc (o parte de la misma) de la proteína diana a inhibir (para métodos generales de ADNc, véase Goodspeed *et al.*, Gene 76:1 (1989); Dunn *et al.*, J. biol. Chem. 264: 13057 (1989)).

Los vectores que contienen una secuencia de polinucleótidos del inhibidor se desarrollan habitualmente en bacterias, tales como *E. coli*, y a continuación, se aíslan utilizando métodos estándar de biología molecular. O se pueden sintetizar como oligonucleótidos. La síntesis directa de polinucleótidos y la unión se pueden llevar a cabo (si es necesario) sin necesitar de vectores procariontes o eucariotes. Los polinucleótidos (y transgenes que comprenden a los mismos) se pueden transferir a células huésped mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo infiltración al vacío de células transformadas en una planta intacta (Bechtold *et al.*, C.R. Acad. Sci. La Vie/Life Sci. 316: 1194-1199 (1993)), microinyección, electroporación, lipofección, biolística, precipitación con fosfato cálcico y vectores de base viral, entre otras (por ejemplo, las patentes de estados Unidos 5.442.052, 5.354.854, 5.278.057, 5.262.316, 5.137.817
65 y 4.962.028).

Inhibidores de ciclina

Los inhibidores de ciclina que evitan la activación de un complejo ciclina/cdk de plantas se pueden identificar en una serie de formatos de ensayo de cribado. Se pueden cribar los inhibidores de ciclina que mediaban en la activación de un complejo ciclina/cdk de plantas, por ejemplo, utilizando un ensayo en el que se exponen sustancias de prueba a una cantidad adecuada de ciclina vegetal, es decir, una ciclina parecida a D vegetal y una quinasa dependiente de ciclina vegetal bajo condiciones que permiten la formación de complejos activos de ciclina/cdk de plantas. El complejo activo de ciclina/cdk de planta formado se cuantifica a continuación y se compara con los complejos inactivos formados en ausencia de la sustancia de prueba. Las sustancias de prueba que dan lugar a complejos menos activos en comparación con complejos activos en ausencia de la sustancia de prueba son inhibidores de ciclina.

También se pueden detectar inhibidores de inhibidores de ciclina. El cribado de dichas sustancias comprende, por ejemplo, utilizar un ensayo en el que las sustancias de prueba se exponen a cantidades adecuadas de inhibidor de ciclina, ciclina vegetal, es decir, una ciclina parecida a D vegetal y una quinasa dependiente de ciclina en condiciones que permiten la formación de complejos activos de ciclina/cdk de plantas en ausencia de inhibidor de ciclina. Los complejos activos de ciclina/cdk formados a continuación se pueden cuantificar y comparar con la cantidad de complejos activos formados en ausencia de la sustancia de prueba. Las sustancias de prueba que dan lugar a complejos más activos en comparación con complejos activos en ausencia de la sustancia de prueba son inhibidores del inhibidor de ciclina.

Las sustancias que pueden servir como inhibidores de la actividad de un inhibidor de ciclina de la familia BRO incluyen, pero sin limitación, a) compuestos capaces de inhibir la inhibición mediada por BRO de la activación del complejo ciclina parecida a D/cdk de plantas, que se pueden identificar tal como se ha descrito anteriormente, b) compuestos que inhiben específicamente la interacción entre una proteína de la familia de BRO el complejo ciclina/cdk de plantas, pero no la fosforilación específica de sitio del grupo cdk del complejo ciclina/cdk en ausencia de un inhibidor de ciclina de BRO, c) compuestos que degradan o inactivan la proteína inhibidora de ciclina BRO, y d) compuestos que interfieren con la expresión de la proteína inhibidora de ciclina BRO, y similares. Dichos agentes pueden incluir compuestos químicos inhibidores de una proteína inhibidora de ciclina BRO, incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos, miméticos de péptidos y similares, antagonistas de inhibidores de ciclina y moléculas que inhiben la expresión de un inhibidor de ciclina de la familia BRO, tales como oligonucleótidos formadores de cadenas triples, oligonucleótidos antisentido, por ejemplo, molécula antisentido genómicas y sintéticas, ribozimas, ARNi, y similares.

Para su uso como inhibidor de la familia de genes *BRO* para mediar la progresión del ciclo celular, los oligonucleótidos formadores de cadenas triples son agentes de unión a ADN específicos de secuencia de *BRO* que interfieren con la transcripción de un gen de la familia de *BRO*. Los oligonucleótidos formadores de cadenas triples se describen en general en Maher, *Bioassays* 14: 807-815 (1992); Gee *et al.*, *Gene* 149: 109-114 (1994); Noonberg *et al.*, *Gene* 149: 123-126 (1994); Song *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 761: 97-108 (1995); Westin *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 23: 2184-2191 (1995); y Wand y Glazer, *J. Biol. Chem.* 207: 22595-22901 (1995). Estos oligonucleótidos forman complejos helicoidales triples, bajo condiciones fisiológicas, sobre ADN de doble cadena que inhiben selectivamente la transcripción de un gen inhibidor de ciclina mediante el bloqueo físico del acceso de la ARN polimerasa o el factor de transcripción al ADN molde del gen inhibidor de ciclina. Véase también, por ejemplo, WO95/25818; WO 95/20404; WO 94/15616; WO 94/04550; y WO 93/09788. Los oligonucleótidos formadores de cadenas triples dirigidos al gen *BRO4* o al gen *ICK1* pueden contener una cola de nucleótidos o no nucleótidos para aumentar la inhibición de la unión al factor de transcripción.

Los oligonucleótidos antisentido que interfieren con la expresión de un gen inhibidor de ciclina de la presente invención y permiten la progresión a través del ciclo celular, tal como se ejemplifica en los ejemplos descritos a continuación, son particularmente útiles en la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido del gen inhibidor de ciclina, específicamente para *BRO4* o *ICK1*, se identifican utilizando métodos, por ejemplo, tal como se describe con detalle en los Ejemplos. El uso de oligonucleótidos antisentido y sus aplicaciones se describen en general en, por ejemplo, Mol y Van der Krul, eds., *Antisense Nucleic Acids and Proteins Fundamentals and Applications*, Nueva York, NY, 1992.

Las moléculas antisentido tal como se utilizan en la presente invención incluyen moléculas antisentido tanto genéticas como sintéticas tal como se disponen a continuación. Los oligonucleótidos antisentido adecuados tienen por lo menos 11 nucleótidos de longitud y hasta e incluyendo secuencias codificantes asociadas y no traducidas en dirección 5' de un gen inhibidor de ciclina. Tal como será evidente para un experto en la materia, la longitud óptima de oligonucleótidos antisentido depende de la fuerza de la interacción entre los oligonucleótidos antisentido y su secuencia complementaria en el ARNm, la temperatura y el medio iónico en que tiene lugar la traducción, las secuencias de bases del oligonucleótidos antisentido y la presencia de estructura secundaria y terciaria en el ARNm y/o en el oligonucleótido antisentido.

Las secuencias diana adecuadas para oligonucleótidos antisentido incluyen uniones intrón-exón (para evitar el "splicing"), regiones en las que los híbridos ADN/ARN evitarán el transporte de ARNm desde el núcleo al citoplasma, los sitios de unión al factor de iniciación, sitios de unión a ribosoma y sitios que interfieren con la progresión de los ribosomas. Una región diana particularmente preferida para el oligonucleótido antisentido es la región no traducida 5' de un gen inhibidor de ciclina.

ES 2 328 217 T3

Además, se puede utilizar el silenciamiento del gen de ARN de doble cadena (ARNi) para inhibir o silenciar funcionalmente la expresión de un inhibidor de ciclina parecida a D vegetal. Los genes se pueden modificar de manera que contengan una repetición invertida de un inhibidor de ciclina parecida a D vegetal, es decir, BR04 o ICK1, que contiene una estructura de tallo ("stem") de 100 a 300 pares de bases, una estructura de bucle que comprende de 200 a 500 pares de bases que codifican un segmento del inhibidor de ciclina y la región de repetición invertida de la estructura de tallo complementaria a la estructura de tallo que formará el tallo de doble cadena. La construcción se puede cortar y empalmar en un plásmido que comprende un promotor funcional de planta, es decir, caMV 35S, E8 de tomate, patatina, ubiquitina, manopina sintasa, *actina 1* de arroz, glicina de proteína de semilla de soja (Gyl) y la proteína de almacenamiento vegetativo de soja. Además, los promotores híbridos, tales como Mac, comprenden elementos de la región 3' de la CaMV 35 y la manopina sintasa, o un promotor específico de tejido. Después de la amplificación, la construcción se puede introducir en un vector de transferencia, tales como un vector de *Agrobacterium*, que se utiliza para transformar plantas o células vegetales.

Se pueden utilizar métodos de control de la expresión de ciertos genes de plantas para modificar un fenotipo de la planta según se desee, tales como controlar la velocidad o tiempo en el que tiene lugar la maduración de la fruta o incluso la velocidad de crecimiento de una planta, tejido vegetal, o células. Una manera de controlar la expresión de genes endógenos de plantas es la inhibición de la expresión de genes específicos mediante la supresión de oligonucleótidos antisentido (Patentes de Estados Unidos 5.457.281, 5.453.566, 5.365.015, 5.254.800, 5.107.065 y 5.073.676) y un método alternativo para inhibir la expresión de genes específicos es la supresión de oligonucleótidos de sentido (Patentes de Estados Unidos 5.283.184, 5.231.020 y 5.034.323).

Los polinucleótidos antisentido dirigidos a un gen inhibidor de ciclina vegetal se preparan mediante la inserción de una molécula de ADN que contiene la secuencia de ADN diana en un vector de expresión adecuado, de manera que la molécula de ADN se inserta en dirección 3' de un promotor en una orientación inversa en comparación con el propio gen. El vector de expresión a continuación se puede transducir, transformar o transfectar en una célula adecuada que da lugar a la expresión de polinucleótidos antisentido.

Alternativamente, los oligonucleótidos antisentido se pueden sintetizar utilizando técnicas manuales estándar o de síntesis automatizadas. Los oligonucleótidos sintetizados se pueden introducir en células adecuadas mediante una serie de medios, incluyendo la electroporación (por ejemplo, tal como se describe en Yang et al. Nucl. Acids. Res. 23: 2803-2810 (1995)), precipitación fosfato de calcio, microinyección, poli-L-ornitina/DMSO (Dong et al., Nucl. Acids. Res. 21: 771-772 (1993)). La selección de un método de administración de oligonucleótidos antisentido adecuado será evidente para un experto en la materia. Con respecto a oligonucleótidos sintetizados *in vitro*, la estabilidad de los híbridos oligonucleótidos antisentido-ARNm se puede incrementar mediante la adición de agentes estabilizantes al oligonucleótido. Los agentes estabilizantes incluyen agentes intercalantes que están unidos covalentemente a alguno o ambos extremos del oligonucleótido. Los oligonucleótidos se pueden hacer resistentes a nucleasas mediante, por ejemplo, modificaciones al esqueleto fosfodiéster mediante la introducción de fosfotriésteres, fosfonatos, fosforotioatos, fosforoselenoatos, fosforamidatos o fosforoditioatos. Los oligonucleótidos también se pueden hacer resistentes a nucleasas mediante la síntesis de los oligonucleótidos con anómeros alfa de los desoxirribonucleótidos, tal como se describen en general en Mol y Van der Krul, *supra*.

Para inhibidores basados en oligonucleótidos, la elección de una secuencia adecuada estará dirigida por, por ejemplo, el tipo de inhibidor (es decir, oligonucleótidos u oligonucleótidos antisentido formadores de cadenas triples) y las especies a tratar. Puede ser preferible elegir secuencias que se conservan entre especies para permitir su uso en modelos fácilmente disponibles. Para el uso en los modelos se pueden elegir oligonucleótidos antisentido para secuencias en el gen BRO que se conservan.

Las composiciones y métodos para inhibir la expresión de un miembro de la familia del gen BRO y permitir así la progresión del ciclo celular puede utilizar ribozimas. Los ribozimas se pueden administrar de varias maneras, incluyendo por genes dirigidos a una célula deseada. Un ribozima reconoce los transcritos de ARN de un gen de la familia BRO. Cada molécula de ribozima contiene un segmento catalíticamente activo capaz de dividir un ARN inhibidor de ciclina, y comprende además secuencias flaqueantes que tienen una secuencia de nucleótidos complementaria a partes del ARN dirigido. Las secuencias flaqueantes sirven para hibridar el ribozima al ARN de una manera específica de sitio. No es necesaria la complementariedad absoluta de las secuencias flaqueantes a la secuencia inhibidora de ciclina diana, sin embargo, sólo es necesaria una cantidad de complementariedad suficiente para formar una doble cadena con el ARN diana y para permitir que el segmento catalíticamente activo de la ribozima se divida en los sitios diana. De este modo, sólo se requiere complementariedad suficiente para permitir que el ribozima sea hibridable con el ARN diana.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ribozima" significa una molécula de ARN que presenta una actividad enzimática que es capaz de dividir o empalmar otras moléculas de ARN separadas de una manera específica de la secuencia de bases del nucleótido. En referencia a la molécula de ARN catalítica o enzimática se entiende una molécula de ARN que presenta complementariedad en una región de unión a sustrato a un ARN diana específico de BRO4 y también presenta actividad enzimática que es activa para dividir y/o empalmar el ARN en esa diana, alterando de este modo la molécula diana.

La molécula de ARN enzimática se puede formar en un motivo de cabeza de martillo, pero el ribozima también se puede formar en el motivo en el motivo de horquilla, virus hepatitis delta, intrón grupo I o ARN de ARNasa P (en asociación con una secuencia guía de ARN). Ejemplos de motivos de cabeza de martillo se describen por Rossi et

al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 8: 183 (1992), los motivos de horquilla se describen por Hampel *et al.*, Biochem. 28: 4929 (1989) y Hampel *et al.*, Nucl. Acids. Res. 18: 299 (1990), el motivo del virus de la hepatitis delta se ejemplifica en Perrotta y Been, Biochem 31:16 (1992), un motivo de ARNasa P se describe en Guerrier-Takada *et al.*, Cell 35: 849 (1983) y ejemplos del motivo de intrón del grupo I se describen en Cech *et al.*, Patente de Estados Unidos No. 4.987.071.

Estos motivos específicos no son limitantes en la presente invención y los expertos en la materia entenderán que una molécula de ARN enzimática de la presente invención tiene un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más regiones de ARN dianas inhibitoras de ciclina y que tiene secuencias de nucleótidos en ese sitio de unión a sustrato o alrededor del mismo que transmiten una actividad de división del ARN a la molécula.

Las secuencias flanqueantes en dirección 5' y 3' respecto al sitio catalítico del ribozima puede comprender segmentos de cualquier longitud que transmiten de manera eficaz el grado deseado de especificidad de reconocimiento para el ribozima. Preferiblemente, una secuencia flanqueante comprende desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 24 nucleótidos, más preferiblemente desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 15 nucleótidos y habitualmente desde aproximadamente 9 hasta 12, y da lugar a un emparejamiento de bases con la secuencia del sustrato inmediatamente en dirección 5' y 3' de las secuencias de ARN inhibitoras de ciclina, es decir *BRO4*, que comprende el sitio de división.

Las mutaciones que proporcionan una reducción de la función de las proteínas inhibitoras de ciclina parecida a D vegetal también se pueden identificar mediante métodos, tales como TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes; Nat Biotechnol. 18: 455-457 (2000)), donde las plantas se pueden mutagenizar con, por ejemplo, metanosulfonato de etilo (EMS), y las plantas que muestran un fenotipo hiperplásico, es decir, hojas, flores, estructuras que contienen semillas, frutos y similares más grandes, se pueden cribar por las mutaciones en los genes inhibitoras de ciclina parecida a D vegetal de secuencia conocida mediante, por ejemplo, la formación de cadenas dobles heterogéneas.

Los siguientes ejemplos se proporciona a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se utiliza un cribado de dos híbridos en levadura para aislar ADNc que codifican proteínas que interaccionan con ciclinas de tipo D de *Arabidopsis thaliana*, D1 y D2. Los cribados de dos híbridos en levadura se revisan tal como se ha descrito en Fields y Stemglanz (Trends in Genetics 10: 286-292 (1994)). Los métodos utilizados se describen brevemente a continuación.

Se aislaron proteínas que codifican ADN complementario capaces de interaccionar con las ciclinas de tipo D de *Arabidopsis thaliana*, D1 y D2, designadas CycD1_{At} y CycD2_{At} utilizando el método del cribado de dos híbridos descrito esencialmente por Fields y Song (Nature 340:245 (1989) y la Patente de Estados Unidos No. 5.283.173 modificada tal como se describe en la presente invención. Las construcciones "cebo" contenían un vector de expresión que codificaba una proteína de fusión GAL4-CycD1_{At} o GAL4-CycD2_{At}. Para construir el plásmido "cebo" GAL4-CycD1_{At}, pGBT9CycD1_{At}, se obtuvo el inserto de CycD1 del plásmido pJG8(D1) (Soni *et al.*, The Plant Cell 7: 85-103 (1995)) mediante amplificación por PCR con cebadores de oligonucleótidos diseñados para añadir un sitio BamHI a cada extremo del gen. El fragmento de PCR amplificado que codifica los aminoácidos 1 a 334 de CycD1_{At}, que comprende la secuencia codificante entera, se digirió con BamHI y se unió en el vector pGBT9 (Clontech Laboratories, Inc. y Bartel *et al.* en Cellular Interaction in Development: a Practical Approach, Ed. Hartley, Oxford University Press, Oxford, ENGLAND, pág. 153-179 (1993)), digerido previamente con BamHI para obtener una secuencia de polinucleótidos que codifica una fusión GAL4-CycD1_{At}. El plásmido pGBT9 es un vector portador de 2 μ M de levadura que contenía un vector de expresión de GAL4 que contenía el promotor ADHI de *S. cerevisiae*, el dominio de unión a ADN de GAL4, un sitio polienlazador y una secuencia terminadora que contiene un codón de terminación en todos los marcos seguido del terminador ADHI de *S. cerevisiae*.

La biblioteca de fusión de ADNc de *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11786-11791 (1997)) que contenía ADNc de oligo-dT aleatorios y el dominio de activación de GAL4, se preparó tal como se ha descrito por Kim *et al.* (*supra*). Brevemente, el ARN total se aisló de *Arabidopsis* etiolada de 3 días de vida mediante la solubilización de los embriones en isotiocianato de guanidinio seguido de la agrupación del ARN mediante gradiente de protección de cloruro de cesio.

Se sintetizó la primera cadena de ADNc a 37°C a partir de 5 μ g de ARN poli(A) con oligo(dT) y 1.000 unidades de SUPERSRIPT (BRL). Después de la reacción de la segunda cadena, el ADNc se precipitó con espermina y se lavó con tampón de lavado de espermina. El ADNc se disolvió en 40 μ l de tampón TE y se alineó con T4 ADN polimerasa según las instrucciones de los proveedores (New England Biolabs). Después de la inactivación de la enzima mediante la adición de 5 μ l de EDTa 0,5 M, las muestras se extrajeron con fenol/cloroformo y se precipitaron con etanol. El ADNc se resuspendió en 12 μ l de tampón TE y, a continuación, se unió con 3 μ l de igual mezcla de adaptadores fosforilados (100 μ M) en un volumen total de 20 μ l a 4°C durante toda la noche. Las secuencias adaptadoras (Elledge *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1731-1735 (1991) se hibridaron mediante calor durante 2 minutos a 88°C, 10 minutos a 65°C, 10 minutos a 37°C y 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la unión, las muestras se precipitaron mediante la adición de espermina y se lavaron tal como se ha descrito (Elledge, *supra*).

ES 2 328 217 T3

El ADNc adaptado se resuspendió en 20 μ l de TE y se pasó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% de temperatura de fusión baja. Los ADNcs de más de 570 pares de bases de longitud se purificaron en gel para la unión a brazos λ -ACT. El ADNc preparado a partir de ARN poli(A) se unió a 2 μ g de ADN plasmídico con λ -ACT relleno de T en un volumen de 5 μ l a 4°C durante toda la noche y se empaquetó utilizando el extracto de empaquetamiento GIGApack Gold (Stratagen). La conversión por subclonación automática de la biblioteca de ADNc de Arabidopsis en la biblioteca de plásmidos se realizó tal como se ha descrito (Harper *et al.*, Cell 75: 805-816 (1993)).

La biblioteca de fagos se amplificó en *E. coli* y se almacenó a -80°C en presencia de dimetilsulfóxido al 7% hasta su uso.

El cribado de dos híbridos se realizó tal como se ha descrito previamente (Vijtek *et al.*, Cell 74: 205-214 (1993); y Hollenberg *et al.*, Mol. Cell. Biol. 15: 3813-3822 (1995);) con algunas modificaciones. La cepa Y190 de *S. cerevisiae* (*MATa*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *trp1-901*, *his3-200*, *ade2-101*, *GAL4-fa180*, *URA3 GAL-lacZ*, *LYS GAL-HIS3*, *cyh'*) se utilizó como cepa huésped para el cribado. La cepa huésped se transformó con pGBT9cycD1_{AI} o pGBT9cycD2_{AI}. La cepa huésped transformada se transformó posteriormente con la biblioteca de fusiones de Arabidopsis. Los transformantes se seleccionaron en un medio que contenía 3-amino-1,2,4-triazol (25 mM) y carecía de histidina. Las células positivas en histidina se ensayaron por la actividad de β -galactosidasa.

Se utilizó el ADN aislado de la levadura transformada que mostraba un crecimiento vigoroso sobre medio con His y sobre medio que contenía 3-aminotriazol y también niveles elevados de actividad de β -galactosidasa para transformar *E. coli*. El ADN plasmídico de *E. coli* se transformó de nuevo en levadura. A partir de aproximadamente 2 x 10⁶ clones transformados con ciclina D1 como cebo, se seleccionaron tres clones designados como BRO2 (que comprendía la secuencia de oligonucleótidos para *BRO2*, SEC ID No. 3), BRO3 (que comprendía la secuencia de oligonucleótidos para *BRO3*, SEC ID No. 5) y BRO4 (que comprendía la secuencia de oligonucleótidos para *BRO4*, SEC ID No. 7) y se secuenciaron mediante métodos de rutina.

La secuencia de aminoácidos de cada uno de los marcos de lectura abiertos que contenían un gen BRO se predijo a partir de la secuencia de nucleótidos determinada de los clones. El examen del marco de lectura abierto que codifica BRO2 reveló una proteína de aproximadamente 128 residuos de aminoácidos con la Met de iniciación en el residuo 20 de la SEC ID No. 4 y la terminación con la Arg en el residuo de aminoácido 147. Un examen similar de BRO3 reveló una proteína de aproximadamente 183 residuos de aminoácidos que empieza con la Met en la posición 20 (SEC ID No. 6) y termina con la Pro en el residuo de posición 202. Bro 4 comprende una proteína de aproximadamente 196 aminoácidos que se inicia en el residuo de aminoácido de posición 13 (SEC ID No. 8) y que termina con Leu en la posición 208. La inspección visual de las secuencias de aminoácidos de BRO3 (SEC ID No. 6) y BRO4 (SEC ID No. 8) reveló una región de aproximadamente 22 aminoácidos que eran sustancialmente homólogos con el dominio de unión a quinasa dependiente de ciclina de consenso de mamífero. El examen de las secuencias de aminoácidos de BRO2, BRO3 y BRO4 (SEC ID No.4, SEC ID No. 6 y SEC ID No. 8, respectivamente) reveló una región conservada de aproximadamente 6 residuos de aminoácidos aproximadamente de 17 a veinte aminoácidos en dirección 5' del dominio de unión a cdk. En las células de mamíferos, se sabe que el dominio de unión a ciclina se encuentra aproximadamente a esta distancia del dominio de unión a cdk. A medida que se aislaron los tres clones en base a la unión a la ciclina parecida a D vegetal, se determinó que esta región de 6 aminoácidos es probablemente el dominio de unión a ciclina. Por lo tanto, se identificaron *BRO2*, *BRO3* y *BRO4* como fragmentos de ADNc que codifican proteínas de unión a ciclina que presentan el motivo de unión definido.

Se cribaron aproximadamente 7,2 x 10⁵ clones transformados con ciclina D2 como cebo, se seleccionó un clon designado como BRO1 (que comprendía la secuencia de oligonucleótidos de *BRO1*, SEC ID No. 1) para un análisis posterior. El clon se secuenció y se predijo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de ADN del clon (SEC ID No. 2). El examen de la secuencia de aminoácidos reveló un polipéptido de aproximadamente 135 residuos de aminoácidos que empiezan con la Met en la posición 1 (SEC ID No. 2) y que termina con la Arg en la posición 135. La inspección visual de la supuesta secuencia de aminoácidos reveló un motivo del dominio de unión a ciclina con una secuencia de siete aminoácidos similar al determinado para *BRO2*, *BRO3* y *BRO4*. El fragmento de ADNc de *BRO1* se identificó por tanto como que codifica una proteína de unión a ciclina.

Inicialmente pareció a partir de la inspección visual de las secuencias de aminoácidos de *BRO1* y *BRO2* que los correspondientes fragmentos de ADNc podrían estar incompletos. El resto del marco de lectura abierto que codifica el gen completo para estas proteínas se determinó mediante el sondeo de una biblioteca genómica de hipocótilo de *Arabidopsis* en un vector λ . La biblioteca se sondó para los genes *BRO2* y *BRO1* y las secuencias completas son tal como se proporcionan en la presente invención. Se determinó que sólo la secuencia para *BRO1* había sido incompleta.

60 Ejemplo 2

En este ejemplo se ha clonado cada una de las secuencias de ácidos nucleicos identificadas para codificar un inhibidor de proteína quinasa dependiente de ciclina a partir del vector pACT utilizado en el cribado de dos híbridos de levadura, se ha insertado en un plásmido pCGN1547 en la orientación inversa y se ha utilizado para transformar plantas *Arabidopsis*. Se examinan las plantas transgénicas para moléculas antisentido a los genes BRO por los cambios fenotípicos característicos de la modulación de la regulación del ciclo celular, incluyendo, es decir, la velocidad del crecimiento de la raíz, hoja y tallo, el incremento en la producción de biomasa, y similares

ES 2 328 217 T3

Brevemente, se clonaron las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la familia *BRO* a partir de los vectores pACT en el plásmido pLAY112 que contiene un promotor de planta quimérica que comprende los elementos CaMV 35s y MAS combinados. (Comai *et al.*, Plant Mol. Biol. 15:373-381 (1990)). Se digirieron *BRO1* y *BRO2* con BglIII y a continuación se clonaron en el sitio BamHI de pLAY 112. Se cortó *BRO3* con XhoI y se rellenaron los extremos con fragmento Klenow. Se ligó el fragmento XhoI que contenía la secuencia que codifica *BRO3* en pLAY112 previamente digerido con SmaI. Se digirió *BRO4* con HincII (romo) y EcoRI. Se rellenaron los extremos de FcoRI con dNTPs y Klenow. Se aisló el fragmento *BRO4* y se ligó en pLAY112 previamente digerido con SmaI. Se transformaron las mezclas de unión en *E. coli* y se seleccionaron los transformantes en los medios apropiados. Se desarrollaron los transformantes seleccionados en medios LB líquidos con antibióticos. Se aisló el ADN plasmídico de cada transformante y se evaluó el ADN por la inserción apropiada.

Se cortaron los plásmidos pLAY112BRO1, pLAY112BR03 y pLAY112BR04 con PstI y se clonaron en el sitio PstI del plásmido pCGN1547 (McBride *et al.*, Plant Mol. Biol. 14:269-276 (1990)). Se cortó el plásmido pLAY112BRO2 con BglIII y se clonó en el sitio BamHI de pCGN1547. Se transformaron las mezclas de unión en *E. coli* y se seleccionaron los transformantes en los medios apropiados. Se desarrollaron los transformantes seleccionados en medios líquidos con antibióticos. Se aisló el ADN plasmídico de cada transformante y se evaluó el ADN por la inserción apropiada.

Se utilizaron los plásmidos pCGN1547BRO1 y pCGN1547BRO2 para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. Se transformó *Arabidopsis thaliana* con cada miembro de la familia *BRO* mediante infiltración al vacío (Bechtold *et al.*, Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316:1194 (1993)), y se seleccionaron plantas de semillero transgénicas (generación T0) en placas AB con canamicina 50 µg/ml y se compararon con las de tipo natural.

Ejemplo 3

En este ejemplo se examinó el efecto de la supresión de los genes inhibidores de ciclina parecida a D vegetal en la proliferación celular.

Brevemente, se manipularon los genes de manera que contuvieran “repeticiones invertidas” de regiones que codifican *ICK1* (tallo de 244 pares de bases, bucle de 420 pares de bases) y *BRO4* (tallo de 203 pares de bases y bucle de 303 pares de bases) (Waterhouse *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:13959-13964 (1998)). Para construir las Repeticiones Invertidas de *ICK1* y *BRO4* se amplificaron los fragmentos diana mediante PCR utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 1. Cada cebador contiene un sitio de restricción apropiado que puede cortarse para permitir el ensamblaje de los productos de PCR individuales en la repetición invertida.

TABLA 1

Cebadores de PCR utilizados para construir estructuras de repeticiones invertidas

ICK1	IR1	ggtacccgatttctgagaaggagaagc	SEC ID N°: 11
ICK1	IR2	gatatcgacacgacttttctgggctc	SEC ID N°: 12
ICK1	IR3	gatatcctacggagccggagaattg	SEC ID N°: 13
ICK1	IR4	actagtittgtttctcagcttccacaaaa	SEC ID N°: 14
ICK1	IR5	actagtgacacgacttttctgggctc	SEC ID N°: 15
ICK1	IR6	gagctccgatttctgagaaggagaagc	SEC ID N°: 16
BRO4	IR1	ggtacccgacaacagaaatggaatcatc	SEC ID N°: 17
BRO4	IR2	gtcgacaaagtcgatcccacttgtagc	SEC ID N°: 18
BRO4	IR3	gtcgacaaagcgagagcttgcagaag	SEC ID N°: 19
BRO4	IR4	actagtcggtttctgatttgatgatcc	SEC ID N°: 20
BRO4	IR5	actagtaaagtcgatcccacttgtagc	SEC ID N°: 21
BRO4	IR6	gagctccgacaacagaaatggaatcatc	SEC ID N°: 22

ES 2 328 217 T3

Se empalmaron las construcciones en pLAY112, un plásmido que combina los elementos de CaMV 35S y la región 3' de manopina sintasa para formar el promotor híbrido Mac (Comai *et al.*, Plant Mol. Biol. 15:373-381 (1990)), y se introdujeron en el vector binario pCGN1547 (McBride y Summerfelt, Plant Mol. Biol. 14:269-276 (1990)) utilizando procedimientos estándar. Se transformó el vector binario en la cepa At503 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se transformaron los genes en los ecotipos Ler y Col-0 de *Arabidopsis* (Bechtold y Pelletier, Methods Mol. Biol. 82:259-266 (1998)). Se identificaron las plantas transgénicas por su fenotipo de resistencia a la canamicina y se examinaron por su fenotipo morfológico.

10 Fenotipo de *ICK1-IR*

Las plantas transgénicas para *ICK1-IR* demostraron tres signos de mayor crecimiento: hojas más anchas y más grandes (tanto caulinares como en racimo), de 3 a 4 carpelos en lugar de 2, y grietas en el tallo principal, como si los tejidos internos del tallo crecieron excesivamente y no correspondían por el crecimiento en las capas de tejidos externas. Las mediciones de tamaño de la hoja y el carpelo y los números de varias líneas de plantas transgénicas y plantas de control se representan en las Figuras 1 a 3 y la Tabla 2. El fenotipo se ha medido mediante dos experimentos diferentes.

El fenotipo de múltiples carpelos es particularmente importante en la interpretación de los efectos de la supresión de *ICK1*. Ese fenotipo ha sido bien estudiado porque es similar al causado por mutaciones de los genes *CLAVATA 1, 2* y *3* (Chen *et al.*, Genesis 26:42-54 (2000); Clark *et al.*, Development 122:1567-1575 (1996); Fletcher *et al.*, Science 283:1911-1914 (1999)).

TABLA 2

Número de carpelo ICK1-IR y control (1547 plantas)

Genotipo	Silicuas (carpelo #) ¹	
	2	3 ó 4
Ick 1 IR 2-7	31	1
Ick 1 IR 3-14	32	4
Ick 1 IR 4-10	8	9
Ick 1 IR 5-6	25	1
Ick 1 IR 6-20	7	14
Ick 1 IR 7-7	5	14
1547 2D 10	18	
1547 9A 18	16	

¹se examinaron las cuatro primeras silicuas producidas

Los meristemas son los órganos apicales responsables del brote y crecimiento de la raíz. En mutantes de clavata, las divisiones celulares en exceso forman meristemas más grandes, los cuales a su vez forman carpelos supernumerarios. Los genes de *CLAVATA* codifican los componentes de un sistema de comunicaciones de célula a célula. El fenotipo de *ICK1-IR* es la primera evidencia directa de que se pueden formar meristemas más grandes mediante el control de reguladores de la división celular. Esto proporciona evidencias que se pueden usar las manipulaciones de *ICK1* para modificar las propiedades de crecimiento de las plantas.

60 Fenotipo de *BRO4*

Las plantas transgénicas para *BRO4-IR* eran más espesas, es decir, tenían más coflorescencias y más hojas en cada coflorescencia. Las plantas parecen haber desarrollado este fenotipo al haber formado más metámeros, las unidades básicas de desarrollo. Cada metámero consiste en un internódulo y un nódulo que porta el órgano (Figura 4). Los metámeros se forman por la acción del meristema apical. Cada crecimiento lateral (órgano primordial) en el ápice de meristema forma un nódulo. Cada nódulo lleva una hoja y en la axila de la hoja existe un brote lateral. Por lo tanto, una planta con más nódulos se vuelve más espesa al formar más brotes laterales. Es posible que la supresión de *BRO4* de lugar a una formación acelerada de órganos laterales, y por lo tanto, más nódulos.

ES 2 328 217 T3

Deposito de Material Biológico

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, bajo los términos del Tratado de Budapest.

5

	<u>Plásmido</u>	<u>No. de acceso</u>	<u>Fecha de depósito</u>
10	pACT BRO1	ATCC 203953	23 abril 1999
	pACT BRO2	ATCC 203954	23 abril 1999
	pACT BRO3	ATCC 203955	23 abril 1999
15	pACT BRO4	ATCC 203956	23 abril 1999

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los objetivos de claridad o comprensión, será evidente que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

25

Documentos de patente citados en la descripción

30

- US 13437399 P [0001]
- WO 9914331 A [0006] [0006]

35

- EP 0270356 A [0053]

- US 4407956 A [0055]

40

- US 5442052 A [0072]

- US 5354854 A [0072]

- US 5278057 A [0072]

45

- US 5262316 A [0072]

- US 5137817 A [0072]

- US 4962028 A [0072]

50

- WO 9525818 A [0076]

- WO 9520404 A [0076]

55

- WO 9415616 A [0076]

- WO 9404550 A [0076]

- WO 9309788 A [0076]

60

- US 5457281 A [0081]

- US 5453566 A [0081]

65

- US 5365015 A [0081]

- US 5254800 A [0081]

ES 2 328 217 T3

- US 5107065 A [0081]
- US 5073676 A [0081]
- 5 • US 5283184 A [0081]
- US 5231020 A [0081]
- US 5034323 A [0081]
- 10 • US 4987071 A, Cech [0087]
- US 5283173 A [0093]
- 15 • US 60134373 B [0116]

Documentos no relacionados en la descripción

- **Temin.** *J. Cell. Phys.*, 1971, vol. 78, 161 [0002]
- 20 • **Pardee.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, 1286 [0002]
- **Larsson et al.** *J. Cell. Phys.*, 1989, vol. 139, 477 [0007]
- 25 • **Zetterberg et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5365 [0003]
- **Sherr.** *Cell*, 1994, vol. 79, 551 [0004]
- **Serrano et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 704 [0004]
- 30 • **Hannon; Beach.** *Nature*, 1994, vol. 371, 257 [0004]
- **El-Deiry et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 89 [0004]
- 35 • **Xiong et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 701 [0004]
- **Polyak et al.** *Cell*, 1994, vol. 78, 59 [0004]
- **Toyashima; Hunter.** *CELL*, 67 [0004]
- 40 • **Lee et al.** *Genes & Dev.*, 1995, vol. 9, 639 [0004]
- **Matsuoka et al.** *GENES & DEV.*, 650 [0004]
- 45 • **Koff et al.** *Science*, 1993, vol. 260, 536 [0004]
- **Gould et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3297 [0004]
- **Solomon et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 3133 [0004]
- 50 • **Solomon et al.** *Mol. Biol. Cell*, 1992, vol. 3, 13 [0004]
- **Jeffrey et al.** *Nature*, 1995, vol. 376, 313 [0004]
- 55 • **Morgan.** *Nature*, 1995, vol. 374, 131 [0004]
- **van't Hof et al.** *The Dynamics of Meristem Cell Populations. Plenum*, 1972, 15-32 [0005]
- **Gould et al.** *Protoplasma*, 1981, vol. 106, 1-13 [0005]
- 60 • **Feller et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 5397-5401 [0005]
- **Hirt et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1991, vol. 88, 1636-1640 [0005]
- 65 • **Hirt et al.** *Plant J.*, 1993, vol. 4, 61-69 [0005]
- **Ferreira et al.** *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 531-540 [0005]

ES 2 328 217 T3

- **Hirayama et al.** *Gene*, 1991, vol. 105, 159-165 [0005]
- **Hata et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 2681-2688 [0005]
- 5 • **Hemerly et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3295-3299 [0005]
- **Soni et al.** *Plant Cell*, 1995, vol. 7, 85-103 [0005]
- **Wang et al.** *Plant J.*, 1988, vol. 15, 501-510 [0006]
- 10 • **Smith et al.** *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0029]
- **Needleman et al.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0029]
- 15 • **Pearson et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0029]
- **Feng et al.** *J. Mol. Evol.*, 1987, vol. 35, 351-360 [0030]
- **Higgins et al.** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0030]
- 20 • **Altschul et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0031]
- **Henikoff et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 89, 10915 [0031]
- 25 • **Karlin et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5787 [0032]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, 1989 [0035]
- **Berger; Kimmel.** *Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques. Academic Press, Inc*, 1987, vol. 152 [0035]
- 30 • **Valancius; Smithies.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 1402 [0038]
- **Donehower et al.** *Nature*, 1992, vol. 356, 215 [0038]
- 35 • **Bradley et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 534 [0042]
- **Horsch et al.** *Science*, 1984, vol. 233, 496498 [0048]
- 40 • **Fraley et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4803 [0048]
- **Bechtold et al.** *C.R. Acad. Sci. Life Sciences*, 1993, vol. 316, 1194-1199 [0048]
- **Bai.** *Methods in Enzymology* [0051]
- 45 • **Fromm et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 791-793 [0053]
- **Rhodes et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 204-207 [0053]
- 50 • **Baker et al.** *Plant Genetics*, 1985, 201-211 [0053]
- **Pena et al.** *Nature*, 1987, vol. 325, 274-276 [0053]
- **Klein et al.** *Nature*, 1970, vol. 327, 70 [0054]
- 55 • **Sanford et al.** *Techniques*, 1991, vol. 3, 3-16 [0054]
- **Klein et al.** *Bio/Techniques*, 1992, vol. 10, 286 [0054]
- 60 • *Methods in Enzymology*, 118 [0057]
- **Klee et al.** *Ann. Rev. Plant Physiol*, 1987, vol. 38, 467 [0057]
- **Horsch et al.** *Science*, 1985, vol. 227, 1229 [0057]
- 65 • **Fields; Sternglanz.** *Trends in Genetics*, 1994, vol. 10, 286-292 [0066]
- **Bai et al.** *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 273, 331-347 [0066]

ES 2 328 217 T3

- **Rose et al.** *Nuc. Acids Res.*, 1998, vol. 26, 1628-1635 [0067]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*, 1989 [0068]
- 5 • **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology. Wiley*, 1994 [0068]
- **Thompson et al.** *Nuc. Acids Res.* 1994, vol. 22, 4673-4680 [0068]
- 10 • **Lisitsyn et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 946-951 [0068]
- **Comai et al.** *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 15, 373-381 [0069]
- **Goodspeed et al.** *Gene*, 1989, vol. 76, 1 [0071]
- 15 • **Dunn et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 13057 [0071]
- **Bechtold et al.** *C.R. Acad. Sci. la Vie/Life Sci.*, 1993, vol. 316, 1194-1199 [0072]
- 20 • **Maher.** *Bioassays*, 1992, vol. 14, 807-815 [0076]
- **Gee et al.** *Gene*, 1994, vol. 149, 109-114 [0076]
- **Noonberg et al.** *Gene*, 1994, vol. 149, 123-126 [0076]
- 25 • **Song et al.** *Ann. NY Acad. Sci.*, 1995, vol. 761, 97-108 [0076]
- **Westin et al.** *Nuc. Acids. Res.*, 1995, vol. 23, 2184-2191 [0076]
- 30 • **Wand; Glazer.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 207, 22595-22901 [0076]
- *Antisense Nucleic Acids and Proteins Fundamentals and Applications.* 1992 [0077]
- **Yang et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1995, vol. 23, 2803-2810 [0083]
- 35 • **Dong et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 771-772 [0083]
- **Rossi et al.** *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 1992, vol. 8, 183 [0087]
- 40 • **Hampel et al.** *Biochem.*, 1989, vol. 28, 4929 [0087]
- **Hampel et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 299 [0087]
- **Perrotta; Been.** *Biochem.*, 1992, vol. 31, 16 [0087]
- 45 • **Guerrier-Takada et al.** *Cell*, 1983, vol. 35, 849 [0087]
- *Genomes. Nat Biotechnol*, 2000, vol. 18, 455-457 [0090]
- 50 • **Fields; Stemglanz.** *Trends in Genetics*, 1994, vol. 10, 286-292 [0092]
- **Fields; Song.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245 [0093]
- **Soni et al.** *The Plant Cell*, 1995, vol. 7, 85-103 [0093]
- 55 • Clontech Laboratories, Inc.; **Bartel et al.** *Cellular Interaction in Development: A Practical Approach. Oxford University Press*, 1993, 153-179 [0093]
- **Kim et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 11786-11791 [0094]
- 60 • **Elledge et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1731-1735 [0095]
- **Harper et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 805-816 [0096]
- 65 • **Vojtek et al.** *Cell*, 1993, vol. 74, 205-214 [0098]
- **Hollenberg et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1995, vol. 15, 3813-3822 [0098]

ES 2 328 217 T3

- **Comai et al.** *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 15, 373-381 [0109]
- **McBride et al.** *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 14, 269-276 [0105]
- 5 • **Bechtold et al.** *Acad. Sci. Paris, Life Sci.*, 1993, vol. 316, 1194 [0106]
- **Waterhouse et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1998, vol. 95, 13959-135964 [0108]
- 10 • **McBride; Summerfelt.** *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 14, 269-276 [0109]
- **Bechtold; Pelletier.** *Methods Mol. Biol.*, 1998, vol. 82, 259-266 [0109]
- **Chen et al.** *Genesis*, 2000, vol. 26, 42-54 [0111]
- 15 • **Clark et al.** *Development*, 1996, vol. 122, 1567-1575 [0111]
- **Fletcher et al.** *Science*, 1999, vol. 283, 1911-1914 [0111]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para producir una variante de planta que tiene un mayor número de nódulos laterales en relación con una planta de tipo natural, comprendiendo el método la inactivación funcional de la expresión de un gen inhibidor de la ciclina parecida a D en dicha variante de planta, en el que dicho gen inhibidor de la ciclina parecida a D comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8.

10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el gen inhibidor de la ciclina parecida a D comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No. 7.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho gen inhibidor de la ciclina parecida a D inactivado funcionalmente está estructuralmente desunido en dicha variante de planta.

15 4. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de dicho gen inhibidor de la ciclina parecida a D está funcionalmente inactivada por un polinucleótido antisentido o de repetición invertida.

20 5. Método según la reivindicación 4, en el que el polinucleótido de repetición invertida es amplificado utilizando como cebador un oligonucleótido que tiene la secuencia mostrada en SEC ID No. 17, SEC ID No. 18, SEC ID No. 19, SEC ID No. 20, SEC ID No. 21 o SEC ID No. 22.

6. Método según la reivindicación 3, en el que el gen inhibidor de la ciclina parecida a D vegetal inactivado funcionalmente está estructuralmente desunido por recombinación homóloga con una construcción de reconocimiento.

25 7. Método para producir una variante de planta que tiene un mayor número de nódulos laterales, que comprende expresar en dicha planta un polinucleótido antisentido o de repetición invertida que inhibe un inhibidor de la ciclina parecida a D en una cantidad suficiente para producir dicha variante de planta, siendo el mayor número de nódulos laterales en relación con una planta no tratada, en el que dicho inhibidor de la ciclina parecida a D comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8.

30 8. Método según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de la ciclina parecida a D comprende un polinucleótido codificado por un ácido nucleico que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID No. 7.

35 9. Método según la reivindicación 7, en el que el polinucleótido de repetición invertida es amplificado utilizando como cebador un oligonucleótido que tiene la secuencia mostrada en SEC ID No. 17, SEC ID No. 18, SEC ID No. 19, SEC ID No. 20, SEC ID No. 21 o SEC ID No. 22.

40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la planta se forma mediante la transformación de progenitores de la planta que comprenden protoplastos, semillas, células de la raíz, células de los meristemas o células de las hojas.

45 11. Inhibidor de un inhibidor de la ciclina parecida a D vegetal que es un oligonucleótido que se une específicamente a ADN que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8 o un ARN transcrito a partir del mismo, e inhibe la expresión del inhibidor de la ciclina parecida a D vegetal para producir una planta que tiene un mayor número de nódulos laterales; en el que dicho inhibidor de la ciclina parecida a D vegetal tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID No. 8.

12. Inhibidor según la reivindicación 11, en el que el oligonucleótido se une específicamente a ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID No. 7.

50 13. Inhibidor según la reivindicación 19 o la reivindicación 11, en el que el oligonucleótido comprende una repetición invertida amplificada utilizando como cebador un oligonucleótido que tiene la secuencia mostrada en SEC ID No. 17, SEC ID No. 18, SEC ID No. 19, SEC ID No. 20, SEC ID No. 21 o SEC ID No. 22.

55

60

65

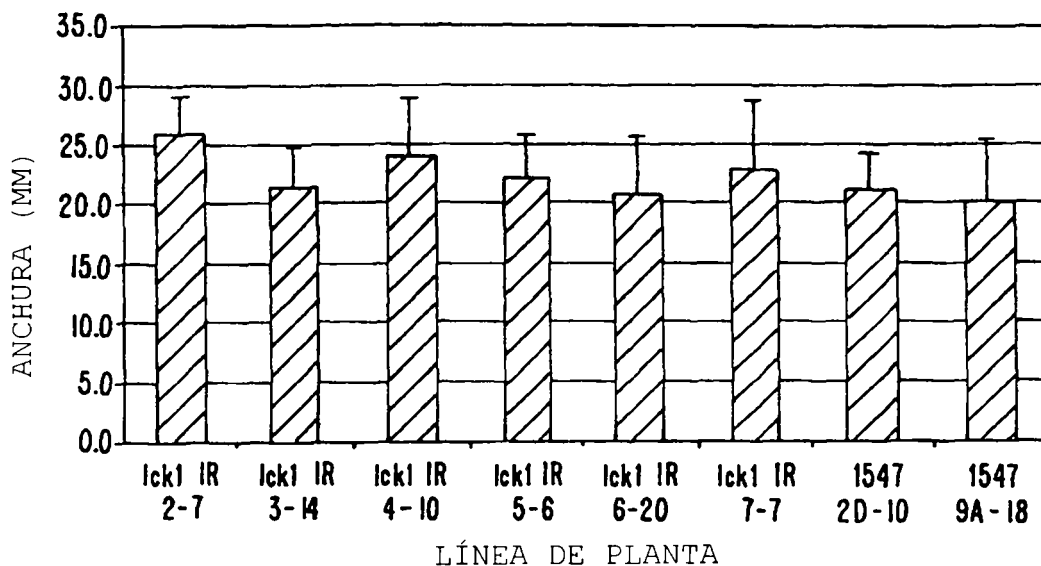


FIG. 1.

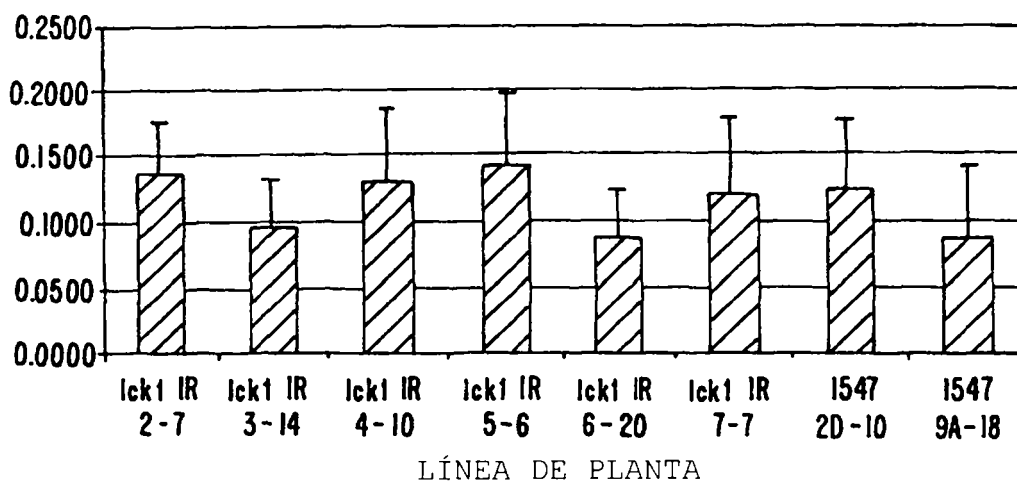


FIG. 2.

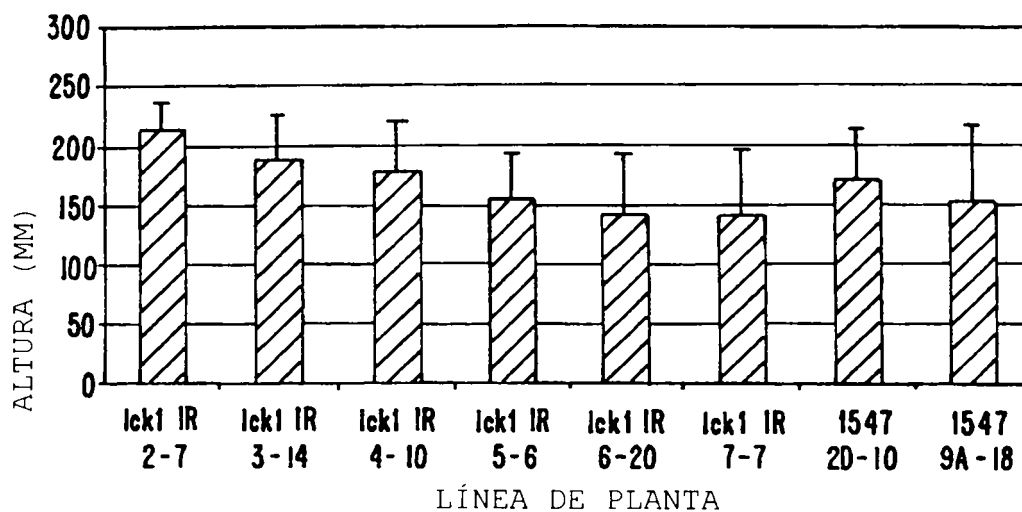


FIG. 3.

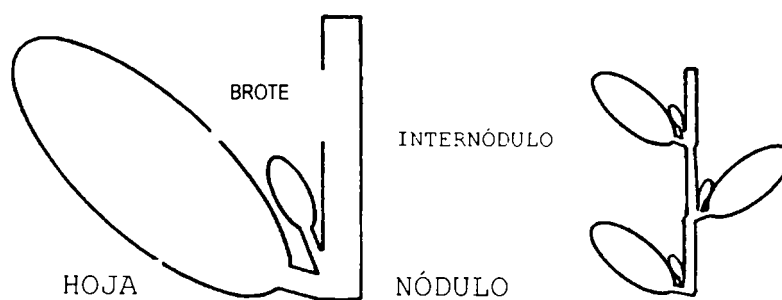


FIG. 4.

ES 2 328 217 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roberts, James A
Kelly, Beth L.

5

<120> MÉTODOS PARA EL AUMENTO DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES MEDIANTE
LA INHIBICIÓN FUNCIONAL DE UN GEN INHIBIDOR DE LA CICLINA VEGETAL

10

<130> 14538A-#45-1

<140>

<141>

15

<150> 60/134,373

<151> 1999-05-14

20

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

25

<210> 1

<211> 408

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

30

<400> 1

35

```
atggcatcaa aaaaagcaag aaaaccaaac cgagccgaaa agaaactcac aagaagctgt 60
ttcaagaaac aagttcctca acacaacaac atcaacacaa gtataactct cgatcaaaca 120
tctacatcta ctattgtctc tacatgttct tcttcatcaa cgactttgtc ttctcctcta 180
gacacaatct actctgttcc ctctccatcc ccagcagcgg tgctgacgtc accaggcggg 240
40  tgttgtaccc cgaaagccaa gaagtctagg ataccggaga tgctgacgtg tccaccggcg 300
ccgaagaagc aaaggtctc gaaaaactgt gtgttacgac ggagacagat cgttttcttt 360
gctccgccgg agatagagct cttcttcgtc aacgcacacg atcgatga 408
```

45

<210> 2

<211> 135

<212> PRT

50

<213> *Arabidopsis thaliana*

55

60

65

ES 2 328 217 T3

<400> 2

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

10 Thr Arg Ser Cys Phe Lys Lys Gln Val Pro Gln His Asn Asn Ile Asn
 20 25 30

15 Thr Ser Ile Thr Leu Asp Gln Thr Ser Thr Ser Thr Ile Val Ser Thr

20 35 40 45

Cys Ser Ser Ser Ser Thr Thr Leu Ser Ser Pro Leu Asp Thr Ile Tyr
 50 55 60

25 Ser Val Pro Ser Pro Ser Pro Ala Ala Val Leu Thr Ser Pro Gly Gly
 65 70 75 80

30 Cys Cys Thr Pro Lys Ala Lys Lys Ser Arg Ile Pro Glu Met Leu Thr
 85 90 95

35 Cys Pro Pro Ala Pro Lys Lys Gln Arg Val Ser Lys Asn Cys Val Leu
 100 105 110

40 Arg Arg Arg Gln Ile Val Phe Phe Ala Pro Pro Glu Ile Glu Leu Phe
 115 120 125

45 Phe Val Asn Ala His Asp Arg
 130 135

<210> 3

45 <211> 639

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

50 <400> 3

ctcgagattt accaaaaaag tttcccaaaa aaacaaaaac atacacaagt ttagatatgg 60
 55 atcttgaatt actacaagat ttgtccaaat tcaatttccc aacacccatc aagatccgat 120
 ccaaaacctc aaaaacaaag aaggacgaag gtgatgacga cgaagatgac ctccgctgca 180
 gcacaccac atccaagaa cacaagattc ccgctcgtct agactctcca cctcctccgc 240
 cgagaaaacc cggccacca ccgtcagcac cgctcggctac ggcggctctg atgatcagat 300
 60 cgtgcaagag gaagcttta gtgtcgactt gtgagataat catgaatcgg gaagagattg 360
 accgtttctt ctctccgtc tacaatgaga cgctcgactac ggctaaacgg cggagaagtt 420
 acccttattg ttctcgaaga tgaggcttaa ttcaatattt acattttttt acagttttac 480
 tggaatatt gtgaaattaa ttatctgttg gtgttcggtt ttaaattttt ttaatttaat 540
 65 tatgaatatg gatggataat tttctgcaac cgcgcatatt aatttcgcat ggaggggtcg 600
 atgttgtaaa ttgagtaata aatgaagta aatctcgag 639

ES 2 328 217 T3

<210> 4

<211> 213

<212> PRT

5 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

```

10      Pro Arg Asp Leu Pro Lys Lys Phe Pro Lys Lys Thr Lys Thr Tyr Thr
        1              5              10              15

15      Ser Leu Asp Met Asp Leu Glu Leu Leu Gln Asp Leu Ser Lys Phe Asn
        20              25              30

20      Phe Pro Thr Pro Ile Lys Ile Arg Ser Lys Thr Ser Lys Thr Lys Lys
        35              40              45

25      Asp Glu Gly Asp Asp Asp Glu Asp Asp Leu Arg Cys Ser Thr Pro Thr
        50              55              60

30      Ser Gln Glu His Lys Ile Pro Ala Val Val Asp Ser Pro Pro Pro Pro
        65              70              75              80

35      Pro Arg Lys Pro Arg Pro Pro Pro Ser Ala Pro Ser Ala Thr Ala Ala
        85              90              95

40      Leu Met Ile Arg Ser Cys Lys Arg Lys Leu Leu Val Ser Thr Cys Glu
        100             105             110

45      Ile Ile Met Asn Arg Glu Glu Ile Asp Arg Phe Phe Ser Ser Val Tyr
        115             120             125

50      Asn Glu Thr Ser Thr Thr Ala Lys Arg Arg Arg Ser Tyr Pro Tyr Cys
        130             135             140

55      Ser Arg Arg Xaa Gly Leu Ile Gln Tyr Leu His Phe Phe Thr Val Leu
        145             150             155             160

60      Leu Glu Ile Leu Xaa Asn Xaa Leu Ser Val Gly Val Arg Phe Xaa Ile
        165             170             175

65      Phe Leu Ile Glx Leu Xaa Ile Trp Met Asp Asn Phe Leu Gln Pro Arg
        180             185             190

70      Ile Leu Ile Ser His Gly Gly Val Asp Val Val Asn Xaa Val Ile Asn
        195             200             205

75      Glu Gly Lys Ser Arg
        210

```

60 <210> 5

<211> 809

<212> ADN

65 <213> *Arabidopsis thaliana*

ES 2 328 217 T3

<400> 5

```

5      ctcgagattt accacgagat gtggttgaag agaatggagt tacgacgacg acggtgaaac 60

      gaaggaagat ggaggaggaa gtggatttag tggaatctag gataattctg tctccgtgtg 120
      tacaggcgac gaatcgcggt ggaattgtgg cgagaaattc agcaggagcg tcggagacga 180
10     gtgttggtat agtacgacgg cgagattctc ctccggttga agaacagtgt caaatcgaag 240
      aagaagattc gtcggtttcg tgttgttcta catcggaaaga gaaatcgaaa cggagaatcg 300
      aattttaga tcttgaggaa aataacggtg acgatcgtga aacagaaacg tcgtggattt 360
15     acgatgattt gaataagagt gaggaatcga tgaacatgga ttcttcttcg gtggctgttg 420
      aagatgtaga gtctcgccgc aggttaagga agagtctcca tgagacggtg aaggaagctg 480
      agttagaaga cttttttcag gtggcggaga aagatcttcg gaataagttg ttggaatggt 540
      ctatgaagta taacttcgat ttcgagaaaag atgagccact tggtgaggga agatacagat 600
      gggtaaatt gaatccatga agaagacgat gatgataatg atgatcattg ttttcaccaa 660
20     agtacttatt atttctcttc tgtaataatc tttgctttga ttttctttt aacaaaatcc 720
      aaatgtagat atctttctct cgaataatca ataacatgta attcaactaa aaaaaaaaaa 780
      aaaaaaaaaa aaaaaaggta aatctcag                                     809
  
```

25

<210> 6

<211> 203

30 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 6

35

```

      Pro Arg Asp Val Val Glu Glu Asn Gly Val Thr Thr Thr Thr Val Lys
      1          5          10          15

40     Arg Arg Lys Met Glu Glu Glu Val Asp Leu Val Glu Ser Arg Ile Ile
      20          25          30

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

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

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

50     Ser Val Ser Cys Cys Ser Thr Ser Glu Glu Lys Ser Lys Arg Arg Ile
      85          90          95

      Glu Phe Val Asp Leu Glu Glu Asn Asn Gly Asp Asp Arg Glu Thr Glu
      100         105         110

55     Thr Ser Trp Ile Tyr Asp Asp Leu Asn Lys Ser Glu Glu Ser Met Asn
      115         120         125

60     Met Asp Ser Ser Ser Val Ala Val Glu Asp Val Glu Ser Arg Arg Arg
      130         135         140
  
```

65

ES 2 328 217 T3

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

5 Phe Phe Gln Val Ala Glu Lys Asp Leu Arg Asn Lys Leu Leu Glu Cys
 165 170 175

10 Ser Met Lys Tyr Asn Phe Asp Phe Glu Lys Asp Glu Pro Leu Gly Gly
 180 185 190

15 Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu Asn Pro Xaa
 195 200

<210> 7

<211> 626

20 <212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 7

25 ctcgagattt acccaaaaat ccaagagaga aaaaaatgag cgagagaaag cgagagcttg 60
 cagaagaage ttcaagcaca agcttctcac cactgaagaa aacgaagctt aatgattctt 120
 30 ctgattcate accggactct catgacgtca tcgtcttcgc ggtttcatct tcttccgttg 180
 cttcgctcgc ggctttagcg tctgatgaat gttccgttac catcgggtga gaagaaagtg 240
 atcagtcctc gagtatcagc tccggttggt tcaccagtga atcgaaagaa atcgcgaaga 300
 acagttcgtc gtttgggtga gatctggagg atcatcaaat cgaaaccgaa accgaaacct 360
 35 caacattcat caccagcaat ttcagaaaag agacgagtc agtgagtga ggtttgggag 420
 aaacgacaac agaaatggaa tcatcatcgg caacgaagag aaaacaaccg ggggtgagga 480
 agactccaac ggcggcggag attgaggatt tgttctcggg gctagagagt ccagacgata 540
 agaagaagca attcatagaa aagtacaact tcgatattgt caatgacgaa ccgcttgaag 600
 40 gtcgctacaa gtgggatcga ctttaa 626

<210> 8

<211> 209

45 <212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

50 Pro Arg Asp Leu Pro Lys Asn Pro Arg Glu Lys Lys Met Ser Glu Arg
 1 5 10 15
 55 Lys Arg Glu Leu Ala Glu Glu Ala Ser Ser Thr Ser Phe Ser Pro Leu
 20 25 30
 60 Lys Lys Thr Lys Leu Asn Asp Ser Ser Asp Ser Ser Pro Asp Ser His
 35 40 45
 65 Asp Val Ile Val Phe Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Ala Ser Ser Ala
 50 55 60

ES 2 328 217 T3

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

5 Asp Gln Ser Ser Ser Ile Ser Ser Gly Cys Phe Thr Ser Glu Ser Lys
85 90 95

10 Glu Ile Ala Lys Asn Ser Ser Ser Phe Gly Val Asp Leu Glu Asp His
100 105 110

15 Gln Ile Glu Thr Glu Thr Glu Thr Ser Thr Phe Ile Thr Ser Asn Phe
115 120 125

20 Arg Lys Glu Thr Ser Pro Val Ser Glu Gly Leu Gly Glu Thr Thr Thr
130 135 140

25 Glu Met Glu Ser Ser Ser Ala Thr Lys Arg Lys Gln Pro Gly Val Arg
145 150 155 160

30 Lys Thr Pro Thr Ala Ala Glu Ile Glu Asp Leu Phe Ser Glu Leu Glu
165 170 175

35 Ser Pro Asp Asp Lys Lys Lys Gln Phe Ile Glu Lys Tyr Asn Phe Asp
180 185 190

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

45 Xaa

<210> 9
<211> 6
40 <212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 9

50 Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
1 5

55 <210> 10
<211> 23
<212> PRT
55 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 10

60 Lys Tyr Asn Phe Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Xaa Xaa Gly Arg
1 5 10 15

65 Tyr Xaa Trp Xaa Xaa Leu Xaa
20

ES 2 328 217 T3

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

10 <400> 11

ggtacccgat ttcgagaagg agaagc 26

15

<210> 12

<211> 26

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 12

30 gatatcgaca cgacttttct gggctc 26

<210> 13

35 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 13

45

gatatcctac ggagccggag aattg 25

50 <210> 14

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

60 <400> 14

actagtttgt ttctcagctt ccacaaaa 28

65

<210> 15

<211> 26

ES 2 328 217 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 15

10 ggtacccgat ttcgagaagg agaagc 26

<210> 16
15 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 16

25 actagtgaca cgacttttct gggctc 26

<210> 17
30 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 17

40 ggtacccgac aacagaaatg gaatcatc 28

45 <210> 18
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 18

60 gtcgacaaag tcgatcccac ttgtagc 27

<210> 19
65 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 328 217 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

5 <400> 19

gtcgcacaaag cgagagcttg cagaag 26

10

<210> 20

<211> 26

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

20

<400> 20

actagtcggt ttcgatttga tgatcc 26

25

<210> 21

<211> 27

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

<400> 21

40

actagtaaag tcgatccac ttgtagc 27

45

<210> 22

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador PCR

55 <400> 22

gagctccgac aacagaaatg gaatcatc 28

60

65