

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 415**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/00** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 11186399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2422615**

54 Título: **Protección de proteínas KRP mutantes negativas dominantes contra la inhibición activa del complejo ciclina-CDK por parte de KRP de tipo salvaje**

30 Prioridad:

**29.07.2005 US 703999 P**

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

**03.10.2014**

73 Titular/es:

**TARGETED GROWTH, INC. (100.0%)  
2815 Eastlake Avenue East, Suite 300  
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**OLIVIER, PAUL y  
DEROCHER, JAY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 502 415 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**

Protección de proteínas KRP mutantes negativas dominantes contra la inhibición activa del complejo ciclina-CDK por parte de KRP de tipo salvaje

**5 Solicitudes relacionadas**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad frente a la Solicitud Estadounidense nº. 60/703.999, presentada el 29 de julio de 2005.

**10 Antecedentes de la invención**

[0002] Las plantas tienen el mismo ciclo celular básico que las células eucariotas. No es extraño que también tengan algo en común con las quinasas eucariotas denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que regulan las transiciones entre las diferentes fases del ciclo celular. La Arabidopsis, un sistema de planta modelo utilizado para estudiar el ciclo celular tiene varios subgrupos de CDK. El CDKA es el más parecido a la cdc2 (CDK1) de los mamíferos y contiene la secuencia de aminoácidos altamente conservada Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu (PSTAIRE) (SEC ID N°.:1) en una región que media la interacción con su parte de ciclina. La Arabidopsis también tiene un grupo de CDK específico para las plantas denominado CDKB que no se conserva en los animales superiores. Sin embargo, a las plantas les falta la contraparte de los mamíferos en las G<sub>1</sub> CDK: las CDK4 y las CDK6. Se ha propuesto que el CDKA sea la G<sub>1</sub> CDK (que es activada por las ciclinas tipo D de las plantas), al tiempo que ha quedado demostrado que el CDKB se expresa sobre todo en la fase S y posteriores y, por lo tanto, probablemente se le podría identificar como la CDK específica a las G<sub>2</sub>/M.

[0003] La activación/desactivación de estas CDK impulsa a las células hacia el ciclo celular y también determina cuándo deben abandonar las células el ciclo celular. La Arabidopsis contiene hasta 49 ciclinas agrupadas en 10 subclases (véase Wang et al., Plant Physiol. 135:1084-1099,2004). Parece que solo las clases A, B y D influyen en el ciclo celular y activan las CDK (Wang et al., Plant Physiol. 135:1084-1099, 2004). El CDKA es activado por las ciclinas tipo D mientras que el CDKB es activado por las ciclinas tipo A y B.

[0004] En los animales, las CDK son reguladas negativamente por dos familias de inhibidores de CDK (CKI). Una clase, denominada inhibidor de CDK4 (INK4) se compone de 4 miembros (p15, p16, p18 y p19) que se unen a y evitan que las G<sub>1</sub> CDK, a saber, la CDK4 y la CDK6, se unan a la ciclina. Al otro grupo de inhibidores se le denomina Proteínas Inhibidoras de Quinasas (KIP) o proteínas KIP (Proteína que Interactúa con CDK) y se conservan altamente en todos los animales. La familia CIP/KIP inhibe principalmente la actividad quinasa de los complejos ciclina A y E-CDK2. En las plantas, se han identificado CKI putativos (Wang et al., Nature 386:451-452, 1997; Wang et al., Plant J. 15:501-510, 1998; De Veylder et al., Plant Cell 13:1653-1667, 2001; Jasinski et al., Plant Physiol. 130:1871-1882, 2002) y han demostrado inhibir in vitro la actividad quinasa de los complejos ciclina/CDK purificados (Wang et al., 1997, supra; Wang et al., Plant J. 24:613-623, 2000; Lui et al., Plant J. 21:379-385, 2000). La expresión de los CKI de las plantas demostró un crecimiento reducido con órganos más pequeños que contienen células mayores (véase Wang et al., 2000, supra; Jasinski et al., J. Cell Sci. 115:973-982, 2001; De Veylder et al., supra; Zhou et al., Plant Cell Rep. 20:967-975, 2002; Zhou et al., Plant J. 35:476-489, 2003; Schnittger et al., Plant Cell 15:303-315, 2003). En la Arabidopsis, a estos CKI se les denomina Inhibidores de CDK (ICK) o proteínas relacionadas con KIP (KRP). Se han identificado siete miembros de la familia de los ICK que son los que más se asemejan a la familia de las CIP/KIP de los CKI. Cada uno de estos miembros de la familia de las ICK/KRP tiene una alta identidad de secuencia de aminoácidos con el p27<sup>KIP1</sup> pero la identidad está limitada a los 30 últimos aminoácidos del extremo C-terminal. Hasta la fecha, no se ha identificado ningún CKI relacionado con la INK en ninguna planta.

[0005] La sobreexpresión de las ciclinas o pérdidas de expresión de los CKI ilustran que el bien equilibrado motor del ciclo celular puede verse fácilmente perturbado en el caso de los mamíferos. Este desequilibrio puede llevar en último término a ciclos celulares acelerados, un aumento del tamaño de los animales y/o el desarrollo de tumores. La reducción o eliminación completa de la "actividad" de los CKI resulta en un aumento de la actividad quinasa del complejo ciclina/CDK. Este aumento de actividad resulta en la fosforilación de las dianas subsiguientes necesarias para la progresión del ciclo celular y en los animales lleva, en última instancia, a una hiperproliferación celular (Coats et al., Science 272:877-880, 1996). La delección del gen p27<sup>KIP1</sup> en ratones da como resultado ratones de mayor tamaño debido a una actividad excesiva del complejo ciclina/cdk que lleva a una proliferación celular excesiva (Fero et al., Cell 85:733-744, 1996; Kiyokawa et al., Cell 85:721-732, 1996; Nakayama et al., Cell 85:707-720,1996).

[0006] Existen mecanismos para suprimir la expresión de varios miembros de la familia de las KRP. El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) en las plantas es un mecanismo de degradación del ARN parecido al de la interferencia de ARN (ARNi) en animales. La ARNi resulta en la degradación específica al ARN de doble cadena (dsARN) en fragmentos cortos de dsARN de 21-23 pb que en última instancia influyen en la degradación de una población de ARN homólogos. En las plantas, la PTGS utiliza una estrategia de repeticiones

invertidas (IR) para suprimir la expresión génica en muchas especies de plantas, incluyendo las plantas de cultivo tales como el maíz, la soja y la colza por nombrar algunas. No obstante, la tecnología de las IR tiene varias desventajas como la eficiencia de la secuencia de las IR, la regulación génica fuera de las dianas (Jackson et al., Nature Biotech. 21:635-637, 2003), el silenciamiento transitorio, la estabilidad general de las IR, y análogos. Estas desventajas se ven agravadas en este caso por la necesidad de silenciar más de un gen a la vez.

[0007] La mejora del cultivo vegetal convencional ha sido la principal fuerza impulsora del aumento del rendimiento de los cultivos en los últimos 75 años (J. Fernandez-Cornejo, Agriculture Information Bulletin N°. (AIB786), pág. 81, febrero de 2004). Más recientemente, hay disponibles cultivos transgénicos que, por ejemplo, son resistentes a las plagas de insectos y a los herbicidas. No obstante, estos cultivos transgénicos vienen acompañados de una penalización sobre el rendimiento (Elmore et al., Agron. J. 93:408-412, 2001; Elmore et al., Agron. J. 93:404-407, 2001). Hasta la fecha, no hay ningún cultivo transgénico conocido en el comercio que provoque un aumento en el tamaño de las semillas o un aumento en el rendimiento de los cultivos.

[0008] Existe una necesidad en el estado de la técnica de métodos mejorados para modificar las características de ciertos cultivos de valor comercial, incluyendo por ejemplo, aunque no exclusivamente, el aumento del rendimiento de los cultivos, el aumento del tamaño de las semillas, el aumento del porcentaje de germinación, el aumento de la masa radicular y similares. La presente invención, tal como aquí se describe, satisface estas y otras necesidades.

## Breve resumen de la invención

[0009] La presente invención proporciona un polipéptido inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CKI) variante de plantas conforme a las reivindicaciones, que tiene al menos dos modificaciones relativas a un polipéptido CKI de tipo salvaje. Al menos una de las modificaciones se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto a la proteína CKI de tipo salvaje, una afinidad de unión modificada a la proteína CDK, manteniendo al mismo tiempo una afinidad de unión a una proteína ciclina. Los polipéptidos CKI variantes de la presente invención tienen una actividad antagonista negativa dominante contra la función de los CKI de tipo salvaje. Cuando la variante se expresa dentro de una célula que expresa la proteína CKI de tipo salvaje correspondiente, o una célula que expresa un CKI de tipo salvaje heterólogo a la proteína de tipo salvaje correspondiente pero que sustancialmente tiene una unión de tipo salvaje equivalente respecto a, entre otras, una unión a la ciclina y a la CDK, la actividad biológica del CKI de tipo salvaje queda inhibida, lo que lleva a una progresión acelerada a través del ciclo celular y a una mayor proliferación celular.

[0010] En otros aspectos, la presente invención proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido CKI variante conforme a las reivindicaciones, o un vector que comprende el ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico que codifica el CKI variante o vector puede introducirse en una célula huésped para la amplificación o expresión del ácido nucleico. Las células huésped pueden utilizarse, por ejemplo, en métodos de la invención para la producción de los polipéptidos CKI variantes. Además, la expresión del polipéptido CKI variante en una célula puede utilizarse en métodos de la invención para modular la división celular. Por ejemplo, la expresión del polipéptido CKI variante en una célula puede llevar a una progresión acelerada a través del ciclo celular y a una mayor proliferación celular.

[0011] En otros aspectos más, se proporciona una planta transgénica conforme a las reivindicaciones que comprende un transgén que codifica el polipéptido CKI variante. La expresión del polipéptido CKI variante en plantas transgénicas puede utilizarse en métodos de la invención para, por ejemplo, aumentar el vigor de las plantas, aumentar la masa radicular, aumentar el tamaño de las plantas o aumentar la germinación temprana, y similares.

## Definiciones

[0012] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entendería un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse otros métodos y materiales similares a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, solo se describen métodos y materiales ilustrativos. A efectos de la presente invención, los términos siguientes se definen a continuación.

[0013] Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0014] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas" (también denominado "inhibidor CDK" o "CKI" en el presente documento) se refiere a una clase de proteínas que regulan negativamente las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Los CKI adecuados para la presente invención son aquellos que tienen regiones polipeptídicas separadas capaces de unirse de manera independiente a una ciclina y a una CDK. Tales CKI incluyen, por ejemplo, familias identificadas de CKI de plantas (los siete CKI identificados de

la Arabidopsis), que tienen una homología con las Proteínas Inhibidoras de Quinasas (KIP) de los animales, denominadas proteínas relacionadas con KPI (KRP) (también conocidas como Inhibidores de "CDK" o "ICK").

5 [0015] Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos.

10 [0016] El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos bien en forma de cadena sencilla o doble. A menos que se especifiquen limitaciones, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos que tienen unas propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar al nucleótido de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también comprende implícitamente variantes modificadas de forma conservadora del mismo (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado). Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden realizarse generando secuencias en las que la

15 tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (véase, por ejemplo, Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994). El término ácido nucleico se utiliza indistintamente con gen, cADN y mRNA codificado por un gen.

20 [0017] El término "de origen natural", en el contexto de los polipéptidos y ácidos nucleicos CKI, significa un polipéptido o ácido nucleico que tiene una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, es decir, una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que puede aislarse de una fuente de la naturaleza (un organismo) y que no ha sido modificada intencionadamente por la intervención humana. Tal como se utiliza en este documento, a las cepas de plantas de laboratorio que han podido ser criadas selectivamente conforme a la

25 genética tradicional se les considera plantas de origen natural.

[0018] Tal como se utiliza en este documento, "gen CKI de tipo salvaje" o "ácido nucleico CKI de tipo salvaje" se refiere a una secuencia de ácido nucleico, correspondiente a un locus genético CKI en el genoma de un organismo, que codifica un producto génico que realiza la función normal de la proteína CKI codificada por una secuencia de nucleótidos de origen natural correspondiente al locus genético. Un locus genético puede tener más de una

30 secuencia o alelo en una población de individuos, y el término "de tipo salvaje" abarca todos esos alelos de origen natural que codifican un producto génico que realiza la función normal. "De tipo salvaje" también abarca secuencias de genes que no son necesariamente de origen natural, pero que aún así siguen codificando un producto génico con una función normal (por ejemplo, genes que tienen mutaciones silenciosas o que codifican proteínas con sustituciones conservadoras).

35

[0019] El término "polipéptido CKI de tipo salvaje" o "proteína CKI de tipo salvaje" se refiere a un polipéptido CKI codificado por un gen de tipo salvaje. Un locus genético puede tener más de una secuencia o alelo en una población de individuos, y el término "de tipo salvaje" abarca todos esos alelos de origen natural que codifican un producto

40 génico que realiza la función normal.

[0020] El término "mutante" o "variante", en el contexto de los polipéptidos y ácidos nucleicos CKI de la presente invención, significa un polipéptido o ácido nucleico modificado respecto a un polipéptido o ácido nucleico de tipo salvaje correspondiente.

45 [0021] El término "polipéptido CKI de referencia" es un término utilizado en este documento para definir un polipéptido CKI mutante o variante: el término se refiere a un polipéptido CKI que se compara con un polipéptido CKI mutante con objeto de definir las modificaciones en la secuencia de aminoácidos. Así, un polipéptido CKI mutante "que comprende una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido CKI de referencia" significa que, excepto por la o las modificaciones de los aminoácidos, el polipéptido CKI mutante

50 comprende de lo contrario la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Al llevar a cabo la presente invención tal como se describe en este documento, los polipéptidos CKI de referencia se determinan de antemano. Un polipéptido CKI de referencia puede ser, por ejemplo, un polipéptido CKI de tipo salvaje y/o de origen natural, o un polipéptido CKI que ha sido modificado intencionadamente.

55 [0022] El término "unión modificada" o "unión alterada" se refiere a un polipéptido CKI mutante codificado por un gen de tipo salvaje cuyo polipéptido CKI de referencia se une a un complejo ciclina/CDK. En este documento, el término "unión modificada" o "unión alterada" se refiere a la unión del CKI mutante al complejo quinasa ciclina/CDK. El término "unión modificada" o "unión alterada" se refiere a la unión relativa del polipéptido CKI mutante en comparación con el polipéptido CKI de referencia. "Unión modificada" o "unión alterada" puede referirse a un

60 polipéptido CKI mutante que tiene una unión igual, una unión reducida o una unión equivalente al complejo de ciclina/CDK en comparación con el polipéptido CKI de referencia.

[0023] "Recombinante", tal como se utiliza en este documento se refiere a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de nucleótidos que ha sido intencionadamente modificada mediante métodos recombinantes. El término

“ácido nucleico recombinante” significa en este documento un ácido nucleico, formado originalmente in vitro, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico con endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Así, a un ácido nucleico CKI mutante o variante aislado, en una forma lineal, o a un vector de expresión formado in vitro ligando moléculas de ADN que no se unen normalmente, se les considera a ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que se produce un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula u organismo huésped, se replicará de manera no recombinante, a saber, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped en lugar de las manipulaciones in vitro. Sin embargo, a tales ácidos nucleicos, una vez producidos de manera recombinante, aunque después se repliquen de manera no recombinante, se les sigue considerando recombinantes para los fines de la invención. Una "proteína recombinante" es una proteína producida utilizando técnicas recombinantes, a saber, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha descrito anteriormente. Una proteína recombinante se diferencia de una proteína de origen natural en al menos una o más características.

[0024] En cuanto a los aminoácidos, una modificación "no conservadora" significa una modificación en la que el residuo de tipo salvaje y el residuo mutante difieren significativamente en una o más propiedades físicas, incluidas la hidrofobicidad, la carga, el tamaño y la forma. Por ejemplo, las modificaciones de un residuo polar en un residuo no polar o viceversa, modificaciones de residuos cargados positivamente en residuos cargados negativamente o viceversa, y modificaciones de residuos de gran tamaño en residuos pequeños o viceversa, son modificaciones no conservadoras. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones que afectan de manera más significativa a: la estructura del esqueleto del polipéptido en la zona de la alteración, por ejemplo, la estructura alfa-helicoidal o lámina beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar objetivo; o la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones, que por lo general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de los polipéptidos son aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, de serina o treonina, es sustituido por (o mediante) un residuo hidrófobo, por ejemplo, de leucila, isoleucila, fenilalanina, valina o alanina; (b) cisteína o prolina es sustituida por (o mediante) otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina, o histidina, es sustituido por (o mediante) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamina o aspartina; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, es sustituido por (o mediante) uno que tiene una cadena lateral, por ejemplo, de glicina.

[0025] Las modificaciones conservadoras son, en general, las que se muestran a continuación, si bien, tal como se sabe en el estado de la técnica, hay otras sustituciones que pueden considerarse conservadoras.

Ala: Ser  
 Arg: Lys  
 Asn: Gln, His  
 Asp: Glu  
 Cys: Ser  
 Gln: Asn  
 Glu: Asp  
 Gly: Pro  
 His: Asn, Gln  
 Ile: Leu, Val  
 Leu: Ile, Val  
 Lys: Arg, Gln, Glu  
 Met: Leu, Ile  
 Phe: Met, Leu, Tyr  
 Ser: Thr  
 Thr: Ser  
 Trp: Tyr  
 Tyr: Trp, Phe  
 Val: Ile, Leu

[0026] El término "negativo dominante", en el contexto del mecanismo de acción de las proteínas o fenotipo del gen, se refiere a una proteína mutante o variante, o al gen que codifica la proteína mutante o variante, que evita sustancialmente que una proteína correspondiente que tiene una función de tipo salvaje realice la función de tipo salvaje.

[0027] La frase "antagonista de un CKI de tipo salvaje", tal como se utiliza en este documento, significa que un polipéptido CKI mutante reduce significativamente (inhibe) la capacidad de un polipéptido CKI de tipo salvaje de inhibir la actividad quinasa de los complejos CDK/ciclina en comparación con la inhibición de la actividad quinasa por parte del polipéptido CKI de tipo salvaje en ausencia del antagonista.

[0028] Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca según una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de

codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está colocado de modo que facilite la traducción.

[0029] El término "planta" incluye plantas en su totalidad, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, flores, raíces, y análogos), semillas y células de plantas (incluidas las células de cultivos de tejidos) y progenies de las mismas. Las clases de plantas que pueden utilizarse en los métodos de la invención son generalmente tan amplias como las clases de plantas superiores susceptibles de técnicas de transformación, incluyendo las gimnospermas y angiospermas, tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, además de ciertas plantas inferiores como las algas. Incluye plantas de una variedad de niveles de ploidía, incluyendo los poliploides, diploides y haploides. Ejemplos de angiospermas monocotiledóneas incluyen, por ejemplo, espárrago, maíz de campo silvestre y dulce, cebada, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar, cebolla, mijo, centeno y avena y otros cereales. Ejemplos de angiospermas dicotiledóneas incluyen, entre otros, tomate, tabaco, algodón, colza (Canola), camelina, habas, soja, pimientos, lechugas y análogos. Ejemplos de especies leñosas incluyen chopo, pino, cedro, roble, abeto, y análogos.

[0030] Una "secuencia heteróloga" es una que se origina a partir de una especie diferente, o, si es de la misma especie, ha sido modificada sustancialmente de su forma original. Por ejemplo, un promotor heterólogo unido operativamente a un gen estructural es de una especie diferente a aquella de la que se derivó el gen estructural, o si se derivó de la misma especie, ha sido modificado sustancialmente de su forma original.

[0031] El término "vector" se refiere a un fragmento de ADN, normalmente de cadena doble, que se ha podido insertar en un fragmento de ADN extraño. El vector o replicón puede ser, por ejemplo, de origen plásmido o viral. Los vectores contienen secuencias de polinucleótidos de "replicón" que facilitan la replicación autónoma del vector en una célula huésped. El término "replicón", en el contexto de esta divulgación, también incluye regiones de secuencias de polinucleótidos dirigidas a, o que de cualquier otro modo facilitan, la recombinación de secuencias de vectores en un cromosoma huésped. Además, aunque el ADN extraño puede insertarse inicialmente en, por ejemplo, un vector viral de ADN, la transformación del ADN del vector viral en una célula huésped puede resultar en la conversión del ADN viral en una molécula del vector del ARN viral. El ADN extraño se define como un ADN heterólogo, que es un ADN que no se encuentra presente en la célula huésped de forma natural, que replica la molécula del vector, codifica un marcador o seleccionable o clasificable o un transgén. El vector se utiliza para transportar el ADN extraño o heterólogo a una célula huésped adecuada. Una vez en la célula huésped, el vector se puede replicar de forma independiente del o coincidente con el ADN cromosomal del huésped, y pueden generarse varias copias del vector y su ADN insertado. Alternativamente, el vector puede dirigir la inserción del ADN extraño o heterólogo a un cromosoma huésped. Además, el vector también puede contener los elementos necesarios que permiten la transcripción del ADN insertado en una molécula de mRNA o causar de cualquier otra manera la replicación del ADN insertado en múltiples copias de ARN. Algunos vectores de expresión contienen adicionalmente elementos de la secuencia adyacentes al ADN insertado que permiten la traducción del mRNA en la molécula de la proteína. De este modo, se pueden sintetizar rápidamente muchas moléculas de mRNA y de polipéptidos codificados por el ADN insertado.

[0032] El término "vector transgénico" se refiere a un vector que contiene un segmento de ADN insertado, el "transgén," que se transcribe en mRNA o replica como ARN dentro de una célula huésped. El término "transgén" no solo se refiere a esa porción de ADN insertado que se convierte en ARN, sino también a aquellas porciones del vector que son necesarias para la transcripción o replicación del ARN. Además, un transgén no tiene por qué comprender necesariamente una secuencia de polinucleótidos que contenga marcos abiertos de lectura capaces de producir una proteína.

[0033] Los términos "célula huésped transformada", "transformada" y "transformación" se refieren a la introducción de ADN en una célula. A la célula se le denomina "célula huésped" y puede ser una célula procariota o eucariota. Las células huésped procariotas típicas incluyen varias cepas de E. coli. Las células huésped eucariotas típicas son células de plantas (por ejemplo, células de canola, soja, arroz o maíz y análogos), células de levaduras, células de insectos o células de animales. El ADN introducido normalmente tiene forma de vector que contiene un fragmento de ADN insertado. La secuencia de ADN introducida puede ser de la misma especie que la célula huésped o de una especie diferente a la célula huésped, o puede ser una secuencia de ADN híbrida, que contiene una parte de ADN extraño y una parte de ADN derivada de la especie huésped.

[0034] En el contexto de los polipéptidos y ácidos nucleicos CKI, la "correspondencia" con otra secuencia (por ejemplo, regiones, fragmentos, posiciones de los nucleótidos o aminoácidos, o análogos) se basa en la convención de numeración conforme al número de posición de los nucleótidos o aminoácidos, y en la alineación posterior de las secuencias de modo que se maximice el número de nucleótidos o aminoácidos que coinciden en cada posición, es decir, de una manera que se maximice el porcentaje de identidad de la secuencia. Dado que no todas las posiciones con una "región correspondiente" dada necesitan ser idénticas, a las posiciones no coincidentes dentro de una región correspondiente se les puede considerar "posiciones correspondientes". Según esto, tal como se utiliza en este documento, la referencia a una "posición del aminoácido correspondiente a una posición del aminoácido X" de

un polipéptido CKI específico representa una referencia a un conjunto de posiciones equivalentes en otros polipéptidos CKI reconocidos y homólogos y familias estructurales.

[0035] En una realización típica de la presente invención relativa a la superfamilia de las KRP de los polipéptidos y ácidos nucleicos CKI, la "correspondencia" de posiciones de los aminoácidos o nucleótidos normalmente se determina respecto a los aminoácidos que se encuentran dentro de la región de unión a la CDK, o nucleótidos que codifican la región de unión a la CDK. En general, en comparación con otras regiones de polipéptidos de las KRP, las regiones de unión a la CDK de los CKI de las KRP comparten una identidad o similitud de secuencia considerable. Así, una técnica adecuada para determinar la región de unión a la CDK de un polipéptido CKI de la KRP es identificar una región de aminoácidos que comparta una identidad o similitud de secuencia considerable con una región de unión a la CDK conocida de un segundo CKI de la KRP (por ejemplo, en las posiciones de los aminoácidos 145-168 aproximadamente de la Krp1 de *Brassica napus* (Bn Krp1)). (Véase, por ejemplo, la Figura 1, en la que se muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de varios miembros de la familia de los CKI con BnKrp1). Una vez determinada una secuencia correspondiente a una región de unión a la CDK mediante la alineación de las secuencias, pueden determinarse en consecuencia las posiciones de los aminoácidos o nucleótidos correspondientes.

[0036] Tal como se utiliza en este documento, el "porcentaje de identidad de la secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (a saber, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias, para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia.

[0037] Los términos "idénticas" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de nucleótidos o de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, un 60 % de identidad, opcionalmente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad en una región específica), cuando se comparan o alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o una región designada, medido mediante uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante una alineación manual y una inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si son idénticas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55 %. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe en una región del polipéptido que tiene una longitud de al menos 6 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 15 residuos de aminoácidos, una longitud de al menos 25 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 35 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 50 residuos de aminoácidos aproximadamente o una longitud de al menos 100 o más aminoácidos aproximadamente, o en una región del ácido nucleico que codifica dicha región del polipéptido. En algunos aspectos preferentes de la presente invención, una región designada para su comparación es una región de unión a la CDK de un polipéptido CKI, una región del polipéptido que comprende una porción de dicha región de unión a la CDK o una región del polipéptido que comprende tal región de unión a la CDK.

[0038] Los términos "similitud" o "porcentaje de similitud," en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje determinado de residuos de aminoácidos que son iguales o similares según queda definido por una sustitución de aminoácidos conservadora (por ejemplo, un 60% de similitud, opcionalmente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95% similar en una región específica), cuando se comparan o alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o una región designada, medido mediante uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante una alineación manual y una inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí si son similares en al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o al menos un 55%. Opcionalmente, esta similitud existe en una región que tiene una longitud de al menos 6 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 15 residuos de aminoácidos, una longitud de al menos 25 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 35 residuos de aminoácidos aproximadamente, una longitud de al menos 50 residuos de aminoácidos aproximadamente o una longitud de al menos 100.

[0039] En ciertos aspectos preferentes de la presente invención, para la determinación de la identidad o de la similitud entre las secuencias, una región designada para su comparación es la región de unión a la CDK de un polipéptido CKI, una región del polipéptido que comprende una porción de dicha región de unión a la CDK o una región del polipéptido que comprende dicha región de unión a la CDK.

[0040] En la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las

secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa algorítmico de secuencias. Pueden utilizarse los parámetros por defecto del programa o pueden designarse parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades o similitudes de las secuencias para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

[0041] Una "ventana de comparación, tal como se utiliza en este documento, incluye la referencia a un segmento en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos contiguas en las que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia que tiene el mismo número de posiciones contiguas tras la alineación óptima de las dos secuencias. Respecto a la comparación de polipéptidos CKI conforme a la presente invención, una ventana de comparación tiene normalmente de 6 aproximadamente a 200 aproximadamente o más aminoácidos contiguos, normalmente de 6 aproximadamente a 50 aproximadamente, de 6 aproximadamente a 25 aproximadamente, de 15 aproximadamente a 100 aproximadamente, de 15 aproximadamente a 50 aproximadamente, de 15 aproximadamente a 30 aproximadamente, de 20 aproximadamente a 50 aproximadamente o de 25 aproximadamente a 50 aproximadamente aminoácidos contiguos. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1970), con el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443,1970), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de1995)).

[0042] Un ejemplo de un algoritmo que resulta útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por parejas para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de la secuencia. También traza un árbol o dendograma en el que se muestran las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (*J. Mol. Evol.* 35:351-360, 1987). El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (*CABIOS* 5:151-153, 1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de ellas con una longitud máxima de 5000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por parejas de las dos secuencias más parecidas, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo se alinea entonces con la siguiente secuencia más relacionada o clúster de secuencias alineadas. Dos clústeres de secuencias se alinean mediante una sencilla 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 funciona designando las coordenadas de secuencias específicas y sus aminoácidos o nucleótidos para las regiones de comparación de las secuencias y designando los parámetros del programa. Con PILEUP se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de la relación de identidad entre las secuencias utilizando los parámetros siguientes: peso del hueco por defecto (3,00), peso de longitud del hueco por defecto (0,10) y los huecos finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de software de análisis de secuencias GCG (por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux et al., *Nucl. Acids Res.* 12:387-395, 1984)).

[0043] Otros ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad y de similitud entre las secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (*Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977), y Altschul et al. (*J. Mol. Biol.* 215:403-410,1990), respectivamente. El software para realizar los análisis BLAST está disponible a nivel público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen algún valor umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al valor umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., supra). Estos aciertos iniciales en palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabras en cada dirección se paran cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X desde su máximo valor conseguido; la puntuación de alineación acumulativa llega a cero o a un valor menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de las dos cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3 y una expectativa (E) de 10, y los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62

(véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de las dos cadenas.

[0044] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5887, 1993). Una media de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia al azar entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de 0,2 aproximadamente, típicamente menor de 0,01, más típicamente todavía menor de 0,001 aproximadamente.

[0045] También pueden identificarse homólogos y ortólogos de genes utilizando el recurso HomoloGene del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Un homólogo u ortólogo de un primer gen puede codificar un producto génico que tiene una función igual o similar a la del producto génico codificado por el primer gen. Otra indicación de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son ortólogos es que el gen heterólogo puede complementar (por ejemplo, rescatar) un alelo nulo del gen endógeno en un sistema de expresión de células eucariotas.

### Breve descripción de los dibujos

[0046] La Figura 1 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de miembros de la familia de las KRP de Arabidopsis con miembros de la familia de las KRP de Brassica. Las secuencias de las KRP de Arabidopsis se obtuvieron de la base de datos pública: AtKrp1 (Genbank # U94772) (SEC ID N°.:2); AtKrp2 (Genbank#CAB76424) (SEC ID N°.:3); AtKrp3 (Genbank # CAC41617) (SEC ID N°.:4); AtKrp4 (Genbank # CAC41618) (SEC ID N°.:5); AtKrp5 (Genbank # CAC41619) (SEC ID N°.:6); AtKrp6 (Genbank # CAC41620) (SEC ID N°.:7); y AtKrp7 (Genbank # CAC41621) (SEC ID N°.:8). Las secuencias de las KRP de Brassica (BnKrp1 (SEC ID N°.:68), BnKrp3 (SEC ID N°.:69), BnKrp4 (SEC ID N°.:70), BnKrp5 (SEC ID N°.:71), Y BnKrp6 (SEC ID N°.:72)) se obtuvieron como se describe más adelante en el Ejemplo 1. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el p27 (SEC ID N°.:73).

[0047] La Figura 2 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de ciclinas de maíz (SEC ID N°.:9), Canola, soja (SEC ID N°.:11), chopo (SEC ID N°.:12), tabaco (SEC ID N°.:13), trigo, arroz (SEC ID N°.:15) y patata (SEC ID N°.:16) y los dominios de unión a la CDK, que ilustra el alto grado de identidad de las secuencias dentro del dominio de unión a la CDK.

[0048] La Figura 3 muestra secuencias de ácidos nucleicos de BnKrp1 mutantes cuyos codones se han optimizado para su expresión en maíz, que codifican bien la BnKrp1 F151A;153A (SEC ID N°.:74) o bien la BnKrp1 Y149A; F151A;F153A (SEC ID N°.:75).

### Descripción detallada de la invención

[0049] La presente invención comprende composiciones y métodos conforme a las reivindicaciones para modular la división celular en plantas. En particular, se proporcionan polipéptidos que antagonizan la función de la proteína CKI de tipo salvaje a través de un mecanismo negativo dominante, así como polinucleótidos, células huésped y plantas transgénicas relacionados, y métodos para el uso de los mismos. Pueden utilizarse una amplia variedad de vectores transgénicos, que contienen un polinucleótido que codifica un polipéptido CKI variante negativo dominante, para la puesta en práctica de la presente invención. Cuando los transgenes CKI de la presente invención se introducen en plantas y se expresan, se modula la división celular de las plantas. La modulación de la división celular puede ocurrir en toda la planta o de manera específica en un tejido u órgano dependiendo del tipo de secuencia promotora unida operativamente al transgén CKI variante. En particular, las composiciones y los métodos aquí proporcionados pueden utilizarse para acelerar la progresión de las células de plantas a través del ciclo celular, con un aumento concomitante de la proliferación celular. La utilización de las composiciones y métodos de esta manera permite, por ejemplo, la generación de un aumento en el rendimiento de los cultivos y/o tamaño de las semillas de una amplia variedad de plantas. Un aumento del rendimiento de los cultivos puede incluir, por ejemplo, mayor tejido en las hojas, mayor cantidad de frutos, mayor producción de flores, mayor masa radicular, y análogos.

[0050] En realizaciones particulares de la invención, el polipéptido CKI variante es un miembro de la familia de las KRP. Este aspecto de la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la región de unión a la CDK de los miembros de la familia de las KRP es la principal responsable del inhibidor de los complejos de ciclina-CDK. Así, si se toma como objetivo la región de unión a la CDK de los miembros de la familia de las KRP (en contraposición a la región de unión a la ciclina), pueden generarse proteínas mutantes que son antagonistas negativas dominantes especialmente eficaces de la función del CKI de tipo salvaje.

Polipéptidos mutantes CKI, ácidos nucleicos y vectores

5 [0051] Los polipéptidos CKI de la presente invención son proteínas mutantes o variantes que pueden distinguirse de los CKI de origen natural o de tipo salvaje. Los polipéptidos CKI variantes comprenden al menos una modificación, relativa a un polipéptido CKI de referencia (por ejemplo, una proteína CKI de tipo salvaje), en la región de unión a la CDK o a la ciclina de la proteína. Las modificaciones típicas incluyen sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje correspondiente. Las modificaciones especialmente adecuadas son las sustituciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, el polipéptido CKI variante comprende al menos una modificación no conservadora (por ejemplo, una sustitución).

10 [0052] Los polipéptidos mutantes CKI de la presente invención son proteínas negativas dominantes. El enfoque negativo dominante es especialmente adecuado en el caso de los polipéptidos CKI que tienen dos regiones del polipéptido involucradas de manera independiente en la unión a la CDK y a la ciclina. El enfoque general para crear los mutantes negativos dominantes de la presente invención incluye la modificación de una de las regiones de unión a la CDK y a la ciclina individuales para así modificar la unión a la CDK o a la ciclina "de tipo salvaje". Esta región de unión a la CDK o a la ciclina modificada puede resultar en una unión equivalente, reducida o eliminada a la ciclina o CDK en comparación con el polipéptido de tipo salvaje. En cualquier caso, la mutación reduciría o eliminaría la actividad inhibidora de la quinasa de los CKI. Para designar un polipéptido CKI negativo dominante capaz de interferir en la función de tipo salvaje, el polipéptido mutante debe (1) unirse sustancialmente a complejos de ciclina/CDK; (2) no inhibir sustancialmente el complejo ciclina-CDK ni siquiera a altas concentraciones; y (3) competir con un polipéptido CKI de tipo salvaje por unirse al complejo ciclina-CDK. In vivo, los polipéptidos mutantes CKI que satisfacen todos estos requisitos resultan en una actividad quinasa elevada del complejo ciclina/CDK en la célula, que a su vez lleva a una mayor proliferación celular y a un mayor índice mitótico que en última instancia lleva a plantas con un mayor rendimiento, semillas mayores y/u otras características asociadas a una actividad quinasa elevada del complejo ciclina/CDK en una o más regiones de la planta.

25 [0053] En el caso particular de los polipéptidos de la KRP, la modificación se dirige a la región de unión a la CDK, que es la principal responsable de la inhibición de la quinasa del complejo ciclina/CDK en esta familia de polipéptidos CKI.

30 [0054] Las modificaciones especialmente adecuadas incluyen sustituciones de aminoácidos, inserciones o deleciones. Por ejemplo, pueden generarse sustituciones de aminoácidos como modificaciones en la región de unión a la CDK o a la ciclina que reducen o eliminan la unión. De forma parecida, pueden generarse sustituciones de aminoácidos como modificaciones en la región de unión a la CDK o a la ciclina que reducen o eliminan la actividad inhibidora del CKI. En divulgaciones típicas, se realiza al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora, inserción o deleción en la región de unión a la CDK o a la ciclina para alterar o modificar la unión del polipéptido CKI a una proteína CDK o ciclina.

40 [0055] Los mutantes de polipéptidos CKI sustitucionales son aquellos en los que se ha eliminado al menos un residuo de aminoácido en una secuencia de una proteína CKI de referencia y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición. Las sustituciones pueden ser sencillas, cuando solo se sustituye un aminoácido de la molécula, o pueden ser múltiples, cuando se sustituyen dos o más aminoácidos de la misma molécula. Pueden obtenerse cambios sustanciales en la actividad de las moléculas de las proteínas CKI de la presente invención sustituyendo un aminoácido por otro cuya cadena lateral sea significativamente diferente en cuanto a carga y/o estructura de la del aminoácido nativo, un aminoácido con una carga opuesta a la del aminoácido nativo, o un aminoácido con la hidrofiliidad opuesta a la del aminoácido nativo, y análogos. Se espera que estos tipos de sustituciones afecten la estructura del esqueleto del polipéptido y/o la carga o hidrofobicidad de la molécula en el área de sustitución. En ciertas realizaciones de ejemplo de la presente invención, un mutante CKI sustitucional incluye la sustitución de un residuo que no sea de alanina por alanina. En otras variaciones, el CKI sustitucional incluye la sustitución de un residuo de aminoácido con, por ejemplo, un aminoácido de carga opuesta, un residuo de aminoácido con una cadena lateral mayor, un aminoácido con la hidrofiliidad opuesta, un aminoácido pequeño no polar (por ejemplo, Cys, Thr, Ser, Ala o Gly) o un aminoácido polar (por ejemplo, Pro, Glu, Asp, Asn o Gln).

55 [0056] Los mutantes de polipéptidos CKI insercionales son aquellos que tienen uno o más aminoácidos insertados justo al lado de un aminoácido en una posición particular en la molécula de la proteína CKI de referencia. Justo al lado de un aminoácido significa conectado bien al grupo funcional [alfa]-carboxi o [alfa]-amino. La inserción puede ser uno o más aminoácidos. La inserción puede consistir, por ejemplo, en uno o dos aminoácidos conservativos. Los aminoácidos con una carga y/o estructura similar a las de los aminoácidos adyacentes al lugar de inserción se definen como conservativos. Alternativamente, el CKI mutante incluye la inserción de un aminoácido con una carga y/o estructura sustancialmente diferentes de las de los aminoácidos adyacentes al lugar de inserción.

60 [0057] Los mutantes de polipéptidos CKI delecionales son aquellos en los que de las moléculas de las proteínas CKI de referencia se han eliminado uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, los mutantes delecionales tendrán uno, dos o más aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula de la proteína CKI. Los mutantes delecionales pueden incluir, por ejemplo, mutantes que tienen un truncamiento del término amino o carboxi.

[0058] Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier miembro reconocido de la familia de las proteínas CKI que incluyen regiones individuales involucradas en la unión de proteínas CDK y ciclina para inhibir la función de la CDK. En una realización, las proteínas CKI mutantes son mutaciones o variantes de proteínas que pertenecen a la familia de las KRP de los CKI. Tal como se ha indicado anteriormente, la región de unión a la CDK de los miembros de la familia de las KRP es la principal responsable de la inhibición de la quinasa. Según esto, la región de unión a la CDK es preferentemente el objetivo para la modificación del diseño de los polipéptidos CKI de las KRP variantes. La región de unión a la CDK de las proteínas KRP corresponde generalmente a los aminoácidos 145-168 de la Krp1 de *Brassica napus* (BnKrp1) (SEC ID N°.:17). En ciertas realizaciones, la modificación de la región de unión a la CDK de un miembro de la familia de las KRP comprende la modificación de al menos dos posiciones de aminoácidos o más dentro de la región correspondiente a las posiciones 145-168 de la BnKrp1. (La región correspondiente de la Krp1 de *Arabidopsis thaliana* comprende los aminoácidos 167-190). Las posiciones de los aminoácidos especialmente adecuadas para la modificación incluyen aquellas cuyas posiciones que corresponden a los aminoácidos 145, 148, 149, 151, 153, 163, 164, 165 y/o 167 de la Krp1 de *Brassica napus* (BnKrp1). Los residuos de aminoácidos correspondientes en otros polipéptidos CKI pueden determinarse fácilmente mediante la alineación de secuencias utilizando métodos conocidos y como se describe con mayor detalle en este documento.

[0059] En cada caso, los aminoácidos arriba mencionados se conservan en el p27 de los mamíferos y todos entran en contacto con la CDK en la estructura cristalina del p27 complejado con Ciclina A y CDK2. En una realización, la modificación de la región de unión a la CDK de las KRP comprende la modificación de los aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 151 y 153 de la BnKrp1 (por ejemplo, una sustitución de aminoácidos, tal como, por ejemplo, en alanina o un aminoácido de carga opuesta, en cada uno de estos lugares). En otras variaciones de ejemplo, además de la modificación de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 151 y 153 de la BnKrp1, la modificación de la región de unión a la CDK de las KRP también incluye una o más modificaciones en la posición o posiciones correspondientes al aminoácido o aminoácidos 149, 164 y/o 165 de la BnKrp1 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido adicional en una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKrp1; o dos sustituciones de aminoácidos adicionales en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 164 y 165 de la BnKrp1). Dicha modificación o modificaciones al polipéptido CKI de KRP modifican la afinidad de unión a una proteína CDK, al tiempo que conservan sustancialmente la capacidad de la proteína variante de unirse a una proteína ciclina.

[0060] La modificación de la región de unión a la CDK de la Krp de particular interés incluye, aunque sin limitación, modificaciones correspondientes a cualquiera de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

BnKrp1 F145A;Y149A

BnKrp1 F145A;Y149A;F151A

BnKrp1 F145A;Y149A;F151A;F153A

BnKrp1 Y149A;F151A

BnKrp1 Y149A;F153A

BnKrp1 F151A;F153A

BnKrp1 F151A;F153A;Y149A

BnKrp1 F151A;F15A;E164A

BnKrp1 F151A;F153A;W165A

BnKrp1 F151A;F153A;E164A;W165A

BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A

BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;W165A

BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;B164A;W165A

En ciertas realizaciones, el polipéptido CKI modificado según lo antedicho es BnKrp1. En otras variaciones, el CKI modificado según lo antedicho no es BnKrp1 (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*), con los aminoácidos sustituidos correspondientes a aquellos anteriormente mencionados.

[0061] Otras modificaciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones, deleciones) que afectan a la unión a la CDK o cíclica, incluidas modificaciones adicionales en los miembros de la familia de las KRP, pueden identificarse utilizando una variedad de técnicas, incluidos métodos de alineación estructural, métodos de alineación de secuencias, y análogos. Las proteínas mutantes o variantes pueden generarse, por ejemplo, utilizando un sistema PDA(TM) previamente descrito en las Patentes Estadounidenses n°. 6.188.965; 6.296.312; y 6.403.312; barrido de alanina (véase la Patente Estadounidense n°. 5.506.107), transposiciones genéticas (WO 01/25277), mutagénesis por saturación del sitio, campo medio, homología de secuencia, u otros métodos conocidos por aquellos versados en la técnica que guían la selección de los sitios y tipos de mutación puntual, tal como se describe con mayor detalle más abajo.

[0062] Las variantes de polipéptidos CKI de la presente invención pueden construirse mutando las secuencias de ADN que codifican el CKI de tipo salvaje correspondiente, u otro CKI del que se deriva la variante como, por ejemplo, utilizando técnicas que normalmente se denominan mutagénesis dirigida al sitio. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas CKI se pueden mutar mediante una variedad de técnicas de reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. (Véase, por ejemplo, PCR Strategies (M. A. Innis, D. H. Gelfand, y J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) Capítulo 14); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990). Además, pueden utilizarse métodos de mutagénesis química y/o por radiación bien conocidos en la técnica para inducir mutaciones en las regiones de codificación de las proteínas de los miembros de la familia de las KRP. Puede realizarse un cribado para localizar aquellas plantas que pueden comprender una secuencia de nucleótidos deseada que codifica una Krp mutante o variante de la presente invención. Las plantas pueden cribarse según los cambios en la secuencia de aminoácidos del CKI, cambios en la actividad quinasa o los cambios previstos en el fenotipo seguido de un análisis de la secuencia.

[0063] A modo de ejemplo no limitativo, puede utilizarse el sistema de dos cebadores incluido en el kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio del Transformador de Clontech, para introducir los mutantes dirigidos al sitio en un gen que codifica una proteína CKI. Tras la desnaturalización del plásmido diana en este sistema, se hibridan simultáneamente dos cebadores con el plásmido; uno de estos cebadores contiene la mutación dirigida al sitio deseada, el otro contiene una mutación en otro punto del plásmido que resulta en la eliminación de un sitio de restricción. A continuación, se lleva a cabo la síntesis de la segunda cadena, ligando íntimamente estas dos mutaciones, y los plásmidos resultantes se transforman en una cepa mutS de E. coli. El ADN plasmídico se aísla de la bacteria transformada, se corta con la enzima de restricción pertinente (linealizando así los plásmidos no mutados) y después se transforma nuevamente en E. coli. Este sistema permite la generación de mutaciones directamente en un plásmido de expresión, sin necesidad de subclonar o generar fagémidos de cadena sencilla. El ligamiento íntimo de las dos mutaciones y la posterior linealización de los plásmidos no mutados resulta en una eficiencia de mutación elevada y permite un cribado mínimo. Tras la síntesis del cebador del sitio de restricción inicial, este método requiere la utilización de solo un nuevo tipo de cebador por cada sitio de mutación. En lugar de preparar cada mutante posicional por separado, puede sintetizarse un conjunto de cebadores oligonucleótidos "degenerados de diseño" con el fin de introducir todas las mutaciones deseadas en un sitio dado simultáneamente. Los transformantes se pueden cribar mediante la secuenciación del ADN plasmídico a través de la región mutagenizada con objeto de identificar y clasificar los clones mutantes. A continuación, puede cortarse cada ADN mutante y analizarse mediante electroforesis, tal como, por ejemplo, en un gel de incremento de la detección de mutaciones (J. T. Baker) para confirmar que no se ha producido ninguna otra alteración en la secuencia (mediante comparación del desplazamiento de bandas con el control no mutagenizado). Alternativamente, puede secuenciarse la región de ADN completa para confirmar que no se han producido sucesos mutacionales adicionales fuera de la región diana.

[0064] Los dúplex mutantes verificados en vectores de sobreexpresión pET (u otros) pueden utilizarse para transformar E. coli tales como la cepa E. coli BL21 (DE3) pLysS, para una producción de alto nivel de la proteína mutante y la purificación mediante protocolos estándar. Puede utilizarse el método de mapeo por bombardeo rápido de átomos-espectrometría de masas (FAB-MS) para comprobar rápidamente la fidelidad de la expresión de los mutantes. Esta técnica permite la secuenciación de segmentos en toda la proteína completa y proporciona la confianza necesaria en la asignación de secuencias. En un experimento de mapeo de este tipo, la proteína se digiere con una proteasa (la elección dependerá de la región específica que debe modificarse, ya que este segmento resulta de interés primordial y el mapa restante debería ser idéntico al mapa de la proteína no mutagenizada). El conjunto de fragmentos de corte se fracciona mediante, por ejemplo, HPLC Microbore (fase inversa o intercambio iónico, dependiendo nuevamente de la región específica que debe modificarse), para proporcionar varios péptidos en cada fracción, y se determinan los pesos moleculares de los péptidos mediante métodos estándar, tales como FAB-MS. La masa determinada de cada fragmento se compara entonces con los pesos moleculares de los péptidos esperados de la digestión de la secuencia predicha y se determina rápidamente el grado de corrección de la secuencia. Debido a que este enfoque de mutagénesis en la modificación de las proteínas es dirigido, no debería resultar necesaria la secuenciación del péptido alterado si los datos de la MS concuerdan con las predicciones. En caso necesario para verificar un residuo modificado, puede utilizarse CAD en tándem/MS/MS para secuenciar los péptidos de la mezcla en cuestión, o el péptido diana puede purificarse para la degradación Edman sustractiva o la digestión con carboxipeptidasa Y, dependiendo de la localización de la modificación.

[0065] Durante el diseño de una mutagénesis dirigida a un sitio particular, por lo general no mejor es hacer primero una sustitución no conservadora y determinar (a) si la actividad de unión a la CDK o a la ciclina objetivo se ha visto perjudicada y (b) si cualquier actividad no objetivo (por ejemplo, unión a la ciclina si la región de unión a la CDK es el objetivo) se ha visto como consecuencia altamente perjudicada. Si de este modo se demuestra que el residuo es importante para una actividad biológica no objetivo, pueden realizarse entonces sustituciones conservadoras.

[0066] También pueden utilizarse otras técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio con las secuencias de nucleótidos CKI. Por ejemplo, puede utilizarse la digestión de ADN con endonucleasa de restricción seguido de ligación para generar variantes de delección de CKI, tal como se describe de manera general en la sección 15.3 de Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Ed., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY). Puede utilizarse una estrategia similar para construir variantes de inserción, tal como se describe en la sección 15.3 de Sambrook et al., supra. Más recientemente, Zhu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8768-8773, 1999) han ideado un método para dirigir mutaciones a genes de plantas in vivo utilizando oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN.

[0067] Los polipéptidos mutantes con más de un aminoácido sustituido pueden generarse de una de entre varias maneras. Si los aminoácidos se encuentran ubicados unos cerca de otros en la cadena del polipéptido, se pueden mutar simultáneamente utilizando un oligonucleótido que codifique todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos se encuentran ubicados a una cierta distancia uno de otros (separados por más de diez aminoácidos, por ejemplo) resulta más difícil generar un solo oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En lugar de ello, puede utilizarse uno de entre dos métodos alternativos. En el primer método, se genera un oligonucleótido separado para cada uno de los aminoácidos que tienen que ser sustituidos. A continuación, los oligonucleótidos se hibridan con el ADN plantilla de cadena sencilla simultáneamente, y la segunda cadena de ADN que se sintetiza a partir de la plantilla codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Un método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es como se describe para los mutantes únicos: se utiliza el ADN de los CKI de tipo salvaje para la plantilla, un oligonucleótido que codifica la o las primeras sustituciones de aminoácidos deseadas se hibrida con esta plantilla y, a continuación, se genera la molécula de ADN heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como la plantilla. De esta manera, esta plantilla ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la o las sustituciones de aminoácidos deseadas se hibrida entonces con esta plantilla y la cadena de ADN resultante codifica ahora mutaciones tanto de la primera como de la segunda rondas de mutagénesis. Este ADN resultante puede utilizarse como plantilla en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente.

[0068] Una técnica especialmente adecuada para guiar la identificación de modificaciones adecuadas incluye la alineación de proteínas CKI mediante la alineación de secuencias. Hay una serie de métodos de alineación de secuencias que ya se han mencionado arriba que pueden utilizarse. Los programas de alineación basados en secuencias incluyen, por ejemplo, búsquedas Smith-Waterman, Needleman-Wunsch, Smith-Waterman de afinidad doble, búsqueda de marcos, búsqueda de perfiles Gribkov/GCG, barrido de perfiles Gribkov/GCG, búsqueda de marcos de perfiles, perfiles generalizados Bucher, modelos ocultos de Markov, Marco H, Doble Marco, Blast, Psi-Blast, Clustal y GeneWise. (Véase, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997).

[0069] Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos CKI relacionados pueden alinearse, por ejemplo, en una alineación de secuencias múltiples (MSA). (Véase, por ejemplo, la Figura 1). La MSA también puede utilizarse para extender la información estructural conocida para uno o más polipéptidos CKI a polipéptidos CKI adicionales (normalmente a polipéptidos CKI que comparten una identidad de la secuencia sustancial) que puede que aún no hayan sido identificados. Dado el alto grado de homología estructural entre diferentes polipéptidos CKI, la MSA puede utilizarse como indicador fiable de los efectos de las modificaciones en distintas posiciones dentro de la alineación. Según esto, en el caso de los miembros de la familia de las KRP, por ejemplo, la secuencia de CKI y la numeración mostrada en la Figura 1 pueden utilizarse como un punto de referencia de la MSA para cualquier otra secuencia de proteínas de los miembros de la familia de las KRP. Tal como se ha indicado anteriormente, las posiciones de los aminoácidos especialmente adecuadas para la modificación incluyen aquellas correspondientes a los aminoácidos 145, 148, 149, 151, 153, 163, 164, 165 y/o 165 de la Krp1 de *Brassica napus* (BnKrp1). Mediante el uso de la alineación mostrada en la Figura 1, y/o la utilización de programas de alineación conocidos en la técnica como los descritos en este documento, puede utilizarse como punto de referencia el sistema de numeración del programa de alineación y se pueden correlacionar las posiciones pertinentes del polipéptido CKI con las posiciones equivalentes en otros miembros reconocidos de CKI u homólogos estructurales y familias. Pueden utilizarse métodos similares para la alineación de la(s) secuencia(s) de aminoácidos del péptido CKI que todavía tienen que secuenciarse.

[0070] En algunos casos, los aminoácidos presentes en el polipéptido CKI que interactúan con una proteína CDK o ciclina se pueden identificar directamente a partir de una estructura tridimensional de un complejo CKI/CDK o CKI/ciclina. Puede derivarse información equivalente mediante un análisis del complejo CKI/CDK o CKI/ciclina de un polipéptido CKI relacionado. De este modo, las alineaciones estructurales pueden utilizarse para generar los polipéptidos CKI variantes de la invención. Existen una amplia variedad de programas de alineamiento estructural conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, VAST en el sitio Web del NCBI; SSAP (Orengo y Taylor, *Methods Enzymol.* 266:617-635, 1996); SARF2 (Alexandrov, *Protein Eng.* 9:727-732, 1996) CE (Shinydyalov y Bourne, *Protein Eng.* 11:739-747, 1998); (Orengo et al., *Structure* 5:1093-108, 1997; Dali (Holm et al., *Nucl. Acid Res.* 26:316-9, 1998).

[0071] Según esto, pueden seleccionarse modificaciones útiles en las interfaces CKI/CDK o CKI/ciclina utilizando algoritmos de designación o modelación de proteínas tales como la tecnología PDA(TM) (véanse las Patentes Estadounidenses n.º. 6.188.965; 6.269.312; y 6.403.312). Los algoritmos de esta clase generalmente utilizan funciones de puntuación a nivel atómico o a nivel de aminoácidos para evaluar la compatibilidad de las secuencias de aminoácidos con la estructura terciaria y cuaternaria general de una proteína. Así, pueden utilizarse algoritmos de esta clase para seleccionar modificaciones de unión a la CDK o a la ciclina y/o disrupciones que no alteran sustancialmente la capacidad de las proteínas CKI variantes de plegarse correctamente e interactuar con dianas de origen natural correspondientes a regiones no modificadas de la proteína. Estas tecnologías normalmente utilizan

información estructural de alta resolución de la proteína diana como entrada. En una realización, como entrada se utiliza una estructura determinada de manera experimental de la proteína CKI apropiada. En realizaciones alternativas, puede utilizarse una MSA para guiar la construcción de modelos de homología a nivel atómico para los miembros CKI en base al subgrupo de la familia cuyas estructuras tridimensionales se han determinado utilizando métodos cristalográficos o relacionados. En otra realización más, el modelo estructural de la interfaz p27/ciclina de mamíferos puede utilizarse para predecir el residuo de aminoácido de contacto para el CKI de plantas.

[0072] También pueden identificarse polipéptidos mutantes CKI, por ejemplo, que tienen una actividad de unión a una proteína CDK o a una ciclina reducida mediante una amplia variedad de métodos distintos, incluidos, por ejemplo, la evolución dirigida (por ejemplo, PCR propensa a errores, transposiciones de ADN, y análogos), mutagénesis por saturación de un solo sitio y mutagénesis por barrido de alanina. En el caso de los CKI de las KRP, por ejemplo, el uso de estos y/u otros métodos puede permitir la identificación de modificaciones adicionales que reducen la actividad de unión a la CDK que quedan fuera de la región de unión a la CDK descrita en este documento.

[0073] Además, pueden utilizarse cálculos de la dinámica molecular para cribar secuencias de manera computacional a base de calcular individualmente las puntuaciones de las secuencias mutantes y compilar una lista. Además, pueden utilizarse los potenciales entre pares de residuos para puntuar las secuencias (Miyazawa et al., *Macromolecules* 18: 534-552, 1985, incorporado aquí a modo de referencia) durante el cribado computacional.

[0074] Alternativamente, pueden hacerse librerías de proteínas CKI variantes para ensayos. Por ejemplo, puede utilizarse una librería de secuencias de aminoácidos CKI variantes para designar ácidos nucleicos que codifican las secuencias de CKI variantes y que después se pueden clonar en células huésped, expresar y analizar. La elección de los codones, de los vectores de expresión adecuados y de las células huésped adecuadas variará normalmente dependiendo de una serie de factores, y se puede optimizar fácilmente según resulte necesario.

[0075] En un método especialmente adecuado para el cribado de librerías de mutantes para el ensayo de la actividad de la actividad antagonista negativa dominante y/u otras actividades deseadas como las señaladas en el presente documento, se realizan múltiples reacciones PCR con oligonucleótidos mezclados. Los oligonucleótidos superpuestos son sintetizados que se corresponden con el gen de longitud completa. Estos oligonucleótidos pueden representar todos los aminoácidos diferentes en cada posición o subgrupo variante. Estos oligonucleótidos pueden mezclarse en proporciones iguales y pueden realizarse múltiples reacciones PCR para crear secuencias de longitud completa que contienen las combinaciones de mutaciones definidas por la librería. Además, esto puede hacerse utilizando métodos de PCR propensos a errores.

[0076] Típicamente, cada oligonucleótido superpuesto solo comprende una posición a variar. Alternativamente, las posiciones variantes están demasiado cerca unas de otras como para permitir esto y se utilizan múltiples variantes por oligonucleótido para permitir la recombinación completa de todas las posibilidades (a saber, cada oligonucleótido puede contener el codón para que se mute una sola posición o para que se mute más de una posición). Las múltiples posiciones que se están mutando se encuentran preferentemente cerca en la secuencia para evitar que la longitud del oligonucleótido no sea práctica. Para mutar múltiples posiciones de un oligonucleótido, pueden incluirse o excluirse combinaciones de mutaciones particulares de la librería incluyendo o excluyendo el oligonucleótido que codifica esa combinación. Por ejemplo, tal como se ha dicho en este documento, puede haber correlaciones entre regiones variables; es decir, cuando la posición X es un residuo determinado, la posición Y debe (o no debe) ser un residuo particular. A estos grupos de posiciones variables a veces se les denomina "clúster" en este documento. Cuando los clústeres se componen de residuos cercanos entre sí, y que por lo tanto pueden residir en un cebador oligonucleótido, los clústeres pueden colocarse en las "buenas" correlaciones, y eliminar las malas combinaciones que pueden reducir la efectividad de la librería. No obstante, si los residuos del clúster están separados en la secuencia y, por lo tanto residirán en oligonucleótidos diferentes para la síntesis, puede ser deseable bien colocar los residuos en la "buena" correlación, o eliminarlos como residuos variables en su totalidad. Alternativamente, la librería se puede generar en varios pasos, de modo que las mutaciones de los clústeres solo aparecen juntas. Este procedimiento, a saber, el procedimiento de identificar clústeres de mutaciones y bien colocarlos en los mismos oligonucleótidos o eliminarlos de la librería o la generación de la librería en varios pasos preservando los clústeres, puede enriquecer considerablemente la librería con la proteína plegada correctamente. La identificación de los clústeres puede llevarse a cabo de varias maneras, por ejemplo, utilizando métodos de reconocimiento de patrones conocidos, comparaciones de la frecuencia de ocurrencia de las mutaciones o mediante el uso de análisis de energía de las secuencias a generar experimentalmente (por ejemplo, si la energía de interacción es alta, las posiciones están correlacionadas). Estas correlaciones pueden ser correlaciones posicionales (por ejemplo, las posiciones variables 1 y 2 siempre cambian juntas o nunca cambian juntas o correlaciones de secuencias (por ejemplo, si hay un residuo A en la posición 1, siempre hay un residuo B en la posición 2). (Véase *Pattern Discovery in Biomolecular Data: Tools, Techniques, and Applications*; (Jason T. L. Wang, Bruce A. Shapiro, Dennis Shasha eds., New York, Oxford University, 1999); *Introduction to Mathematical Techniques in Pattern Recognition* (New York, Wiley-Interscience, 1972); *Applications of Pattern Recognition* (K. S. Fu ed., Boca Raton, FL, CRC Press, 1982); *Genetic Algorithms for Pattern Recognition* (Sankar K. Pal y Paul P. Wang eds., Boca Raton, FL, CRC Press, 1996); *Pandya, Pattern Recognition with Neural Networks in C++* (Boca Raton, FL, CRC Press, 1996); *Handbook of Pattern Recognition & Computer Vision* (C. H. Chen, L. F. Pau y P. S. P. Wang. eds., 2ª ed. Singapore; River Edge,

N.J., World Scientific, c1999); Friedman, Introduction to Pattern Recognition: Statistical, Structural Neural, and Fuzzy Logic Approaches (River Edge, N.J., World Scientific, 1999 , Título de la serie: Series in machine perception and artificial intelligence; vol. 32). Además, también pueden utilizarse programas usados para la búsqueda de motivos de consenso.

5 [0077] Pueden utilizarse oligonucleótidos con inserciones o deleciones de codones para crear una librería que exprese proteínas de diferentes longitudes. En particular, el cribado computacional de las secuencias para las inserciones o deleciones puede resultar en librerías secundarias que definen proteínas de diferentes longitudes, que pueden ser expresadas por una librería de oligonucleótidos mezclados de diferentes longitudes.

10 [0078] En otra realización, los polipéptidos mutantes CKI de la invención se crean transponiendo una familia (por ejemplo, un grupo de mutantes); es decir, algún grupo de las secuencias superiores (en caso de que se utilice una lista ordenada por rangos) se puede transponer, bien con o bien sin PCR propensas a errores. "Transposición" en este contexto significa una recombinación de secuencias relacionadas, generalmente de manera aleatoria. Puede incluir "transposición" tal como se define e ilustra en las Patentes Estadounidenses n.º. 5.830.721; 5.811.238; 15 5.605.793; 5.837.458 y en el PCT US/19256. Este grupo de secuencias también puede ser un grupo artificial; por ejemplo, de una tabla de probabilidad (generada, por ejemplo, utilizando un campo medio autoconsistente (SCMF)) o un grupo Monte Carlo. De forma similar, la "familia" puede ser las 10 secuencias superiores y las 10 secuencias inferiores, las 100 secuencias superiores, y análogos. También puede hacerse utilizando PCR propensas a errores.

20 [0079] Así, puede realizarse una transposición in silico utilizando los métodos computacionales descritos en este documento (por ejemplo, a partir de dos librerías o de dos secuencias, pueden generarse y evaluarse recombinaciones aleatorias de las secuencias).

25 [0080] Puede realizarse una PCR propensa a errores para generar una librería de polipéptidos CKI variantes. Véanse las Patentes Estadounidenses n.º. 5.605.793, 5.811.238 y 5.830.721. Esto puede realizarse en la secuencia óptima o en los miembros superiores de la librería, o algún otro grupo o familia artificial. Según este método, se puede sintetizar el gen para la secuencia óptima encontrado en el cribado computacional de la librería primaria. A continuación se realiza una PCR propensa a errores en el gen de la secuencia óptima en presencia de oligonucleótidos que codifican las mutaciones en las posiciones variantes de la librería (oligonucleótidos de sesgo). La adición de los oligonucleótidos creará un sesgo que favorece la incorporación de las mutaciones en la librería. Alternativamente, solo pueden utilizarse oligonucleótidos para ciertas mutaciones para sesgar la librería.

35 [0081] La transposición de genes puede realizarse mediante una PCR propensa a errores en el gen para la secuencia óptima, en presencia de oligonucleótidos de sesgo, para crear una librería de secuencias de ADN que refleja la proporción de las mutaciones encontradas en la librería de CKI. La selección de los oligonucleótidos de sesgo puede realizarse de distintas maneras; pueden seleccionarse en base a su frecuencia, por ejemplo, pueden utilizarse oligonucleótidos que codifican posiciones de alta frecuencia mutacional; alternativamente, pueden utilizarse los oligonucleótidos que contienen las posiciones más variables, de modo que se aumenta la diversidad; si la librería secundaria se ha categorizado, pueden utilizarse algunas de las posiciones de puntuación superiores para generar oligonucleótidos de sesgo; pueden elegirse posiciones aleatorias; pueden elegirse unos pocos con la mayor puntuación y unos pocos con la puntuación menor; y los análogos. Lo importante es generar nuevas secuencias en base a las posiciones y secuencias variables preferentes.

45 [0082] En otra variación, puede utilizarse una PCR utilizando un gen de tipo salvaje u otro gen. En esta realización, se utiliza un gen de partida (por ejemplo, el gen de tipo salvaje, el gen que codifica la secuencia global optimizada, o una secuencia consenso obtenida, por ejemplo, alineando secuencias homólogas de diferentes organismos). En esta realización, se utilizan oligonucleótidos correspondientes a las posiciones variantes y contienen diferentes aminoácidos de la librería. La PCR se realiza utilizando cebadores de PCR en los terminales. Esto proporciona dos beneficios. En primer lugar, esto requiere normalmente menos oligonucleótidos y puede resultar en menos errores. En segundo lugar, tiene ventajas experimentales en cuanto a que si se utiliza el gen de tipo salvaje, no tiene que ser sintetizado.

55 [0083] Los polipéptidos mutantes CKI pueden ser de cualquier número de organismos, siendo los polipéptidos CKI procedentes de plantas los preferidos especialmente. Las plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, la clase de plantas superiores susceptibles de técnicas de transformación, incluidas las plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, además de ciertas plantas inferiores como las algas. Incluye plantas de una variedad de niveles de ploidía, incluyendo poliploides, diploides y haploides. En realizaciones específicas, la planta es Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max), maíz, arroz, trigo, alfalfa, algodón, chopo, y análogos.

60 [0084] Tal como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos mutantes CKI de la invención son antagonistas negativos dominantes de polipéptidos CKI de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el polipéptido CKI mutante interactúa físicamente con solo una o sus dos proteínas ciclina o CDK correspondientes (a saber, la proteína CDK o ciclina endógena de origen natural de las especies de las que se derivó el CKI mutante) de modo que un complejo

CDK/ciclina que comprende el CKI mutante queda protegido contra la inhibición de la quinasa de los complejos CDK/ciclina por parte de la proteína CKI de tipo salvaje.

[0085] En una realización alternativa, pero que no se excluyen mutuamente, el polipéptido CKI mutante interactúa físicamente con solo una o con las dos proteínas CDK o ciclina heterólogas (a saber, una proteína CDK o ciclina de origen natural de una especie diferente de las especies de las que se derivó el mutante CKI), de modo que un complejo de la proteína CDK/ciclina heteróloga que comprende el CKI mutante queda protegida contra la inhibición de la quinasa del complejo CDK/ciclina por una proteína CKI de tipo salvaje correspondiente a las proteínas CDK y ciclina presentes dentro del complejo (a saber, por una proteína CKI de tipo salvaje endógena a las proteínas CDK y ciclina).

[0086] En algunas realizaciones, los polipéptidos mutantes CKI de la invención son antagonistas altamente específicos para la proteína CKI de tipo salvaje correspondiente. En realizaciones alternativas, los polipéptidos mutantes CKI de la invención son antagonistas específicos para más de un polipéptido CKI de tipo salvaje. Por ejemplo, un polipéptido CKI de Arabidopsis mutante puede ser un antagonista específico de solo un polipéptido CKI de Arabidopsis de tipo salvaje, o específico a los polipéptidos CKI de Arabidopsis de tipo salvaje, Brassica napus, soja (Glycine max), maíz, arroz, algodón y/o chopo. Por ejemplo, un polipéptido CKI de Brassica mutante puede ser un antagonista específico de solo un polipéptido CKI de Brassica de tipo salvaje, o específico a los polipéptidos CKI de Brassica napus de tipo salvaje, soja (Glycine max), maíz, trigo, alfalfa, algodón y/o chopo.

[0087] Los polipéptidos mutantes CKI presentan una actividad biológica sustancialmente reducida en comparación con los polipéptidos CKI de tipo salvaje, incluyendo, por ejemplo, una unión modificada a una de entre una proteína CDK o ciclina y una inhibición reducida de los complejos quinasa CDK/ciclina. Tal actividad biológica reducida puede ensayarse y validarse mediante ensayos in vivo y/o in vitro. Los ensayos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ensayos de la actividad quinasa de los complejos CDK/ciclina, ensayos de unión a la CDK o a la ciclina, y ensayos de proliferación celular. Una reducción sustancial de la actividad biológica en comparación con los polipéptidos CKI de tipo salvaje significa que la actividad biológica del polipéptido CKI variante es inferior al 80 % o inferior al 70 %, normalmente inferior al 60 % o inferior al 50 %, con mayor frecuencia inferior al 40 % o inferior al 30 %, y preferentemente inferior al 20 % o inferior al 10 % que la de un polipéptido CKI de tipo salvaje correspondiente.

[0088] En algunas realizaciones, el polipéptido CKI mutante incluye una modificación, en comparación con un polipéptido CKI de tipo salvaje, además de las señaladas en este documento (a saber, las proteínas CKI mutantes pueden contener modificaciones adicionales en comparación con una proteína CKI de tipo salvaje correspondiente distintas de las utilizadas para generar proteínas negativas dominantes). Entre los ejemplos cabe incluir, aunque no de manera exclusiva, sustituciones de aminoácidos introducidas para permitir una expresión soluble en E. coli y sustituciones de aminoácidos introducidas para optimizar el comportamiento de la solución. Además, tal como se ha señalado en el presente documento, cualquiera de las mutaciones descritas en este documento se pueden combinar de cualquier manera para formar polipéptidos variantes CKI adicionales. Además, los polipéptidos mutantes CKI pueden producirse de tal manera que sean más largos que la proteína de tipo salvaje correspondiente, por ejemplo, mediante la adición de etiquetas de epítomos o de purificación, la adición de otras secuencias de fusión, y análogos, o pueden ser más cortos.

[0089] Los polipéptidos mutantes CKI también pueden ser identificados como que son codificados por ácidos nucleicos CKI mutantes. En el caso del ácido nucleico, la identidad de secuencia total de la secuencia de ácido nucleico es comparable a la identidad de secuencia de aminoácidos pero tiene en cuenta la degeneración del código genético y el sesgo de codones de diferentes organismos. Según esto, la identidad de la secuencia de ácido nucleico puede ser o menor o mayor que la de la secuencia de proteína, siendo normal una identidad de secuencia menor.

[0090] Tal como entenderán aquellos versados en la técnica, debido a la degeneración del código genético, puede crearse un número extremadamente elevado de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican los polipéptidos mutantes CKI de la presente invención. Así, una vez identificada una secuencia de aminoácidos particular, puede crearse cualquier número de ácidos nucleicos capaces de codificar la proteína mutante con solo modificar la secuencia de uno o más codones de manera que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido CKI mutante.

[0091] Los polipéptidos y ácidos nucleicos CKI mutantes de la presente invención son preferentemente recombinantes (a menos que se hayan creado de manera sintética). Tal como se ha indicado anteriormente, los mutantes típicamente se preparan mediante una mutagénesis de sitio específico de los nucleótidos presentes en el ADN que codifican una proteína CKI correspondiente, utilizando una mutagénesis por cassette o por PCR u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir un ADN que codifica el mutante y, después, expresar el ADN en el cultivo de células recombinantes. Los mutantes de la secuencia de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la mutación, una característica que los aparta de la variación alélica o entre especies que se produce de forma natural de la secuencia de aminoácidos de la proteína CKI mutante. Tal como se ha indicado

anteriormente, en este sentido las variantes normalmente presentan una unión similar bien a una proteína CDK o a una ciclina y, por lo tanto, , en comparación con una proteína CKI de tipo salvaje correspondiente, el mutante presenta una reducción sustancial de su actividad inhibidora, aunque también pueden seleccionarse variantes que tengan unas características variantes adicionales.

5 [0092] Aunque el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos es predeterminada, la mutación en sí misma no tiene que ser predeterminada. Por ejemplo, con objeto de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las proteínas CKI variantes expresadas pueden ser seleccionadas para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para preparar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados de un ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis con el cebador M13 o mutagénesis por PCR. El cribado de los mutantes se realiza mediante ensayos de las actividades de la proteína CKI mutante para que tengan unas características óptimas.

10 [0093] En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son de residuos individuales. En otras realizaciones, se sustituyen múltiples residuos de aminoácidos (por ejemplo, pueden sustituirse 2, 3, 4 o más aminoácidos). Las inserciones son normalmente del orden de 1 aproximadamente a 20 aminoácidos aproximadamente, si bien pueden tolerarse inserciones considerablemente mayores. Las deleciones oscilan de 1 aproximadamente a 20 residuos aproximadamente, o de 1 aproximadamente a 30 residuos aproximadamente, si bien en algunos casos las deleciones pueden ser mucho mayores. En ciertas realizaciones, los polipéptidos mutantes CKI son quimeras derivadas de dos o más proteínas CKI de tipo salvaje, con al menos una modificación en la región de unión a la CDK o a la ciclina tal como se ha señalado en este documento.

15 [0094] Las sustituciones, deleciones, inserciones, o cualquier combinación de las mismas, se utilizan para llegar a un mutante final. Por lo general, la modificación o modificaciones se realizan respecto a relativamente pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. No obstante, en algunas circunstancias pueden tolerarse cambios mayores.

20 [0095] Con la utilización de un ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido CKI mutante, puede crearse una variedad de vectores. En la puesta en práctica de la invención, puede utilizarse cualquier vector que contenga secuencias de replicón y de control derivadas de una especie compatible con la célula huésped. Los vectores pueden ser bien vectores extracromosómicos autorreplicantes o bien vectores que se integran en un genoma huésped. En general, los vectores de expresión incluyen regiones de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción unidas operativamente al ácido nucleico que codifica el polipéptido CKI mutante. El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación enlazada operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Las regiones de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción serán por lo general apropiadas para la célula huésped utilizada para expresar el polipéptido.

25 [0096] En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos CKI se modifican para aumentar la expresión génica en una célula huésped utilizando la optimización de codones, que consiste en reemplazar una secuencia de codones por un codón de traducción (correspondiente al mismo aminoácido) que se utiliza altamente en las especies de células en las que se va a expresar la molécula de ADN. En la Figura 3 se muestran ejemplos de secuencias de codificación mutantes de BnKrp1 (BnKrp1 F151A; F153A y Y149A; F151A; F153A) que han sido optimizadas para su expresión en maíz. Los procedimientos de optimización de codones son en general bien conocidos en la técnica y pueden ser utilizados por aquellos versados en la técnica para obtener otras secuencias de Krp1 mutantes de codones optimizados conforme a la presente invención.

30 [0097] En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, por ejemplo, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y parada de la transcripción, secuencias de inicio y parada de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. En realizaciones típicas, las secuencias reguladoras incluyen un promotor y secuencias de inicio y parada de la transcripción. Los vectores también incluyen normalmente una región poliligadora que contiene varios sitios de restricción para la inserción de ADN extraño. La construcción de vectores adecuados que contienen ADN que codifica secuencias de replicación, secuencias reguladoras, genes de selección fenotípica y el ADN CKI variante de interés se prepara utilizando procedimientos estándares de ADN recombinante. Los plásmidos, vectores virales y fragmentos de ADN aislados se cortan, ajustan y ligan entre sí en un orden específico para generar los vectores deseados, tal como es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis, supra, y Sambrook et al., supra).

35 [0098] Las secuencias promotoras codifican tanto promotores constitutivos como inducibles. Los promotores pueden ser bien promotores de origen natural o bien promotores híbridos. Los promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor, también son conocidos en la técnica, y son útiles en la presente invención. En una

realización típica, los promotores son promotores fuertes, lo que permite una alta expresión en células, sobre todo en células de plantas. Los promotores especialmente adecuados para su uso conforme a la presente invención se describen de forma más detallada más adelante.

5 [0099] Además, el vector de expresión puede comprender elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite mantenerse en dos organismos, por ejemplo, en células de plantas o de insectos para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y amplificación. Además, para los vectores de expresión de integración, el vector de expresión contiene al menos una secuencia  
10 homóloga al genoma de la célula huésped y, preferentemente, dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. El vector de integración se puede dirigir a un locus específico en la célula huésped seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Las construcciones para los vectores de integración son bien conocidas en la técnica.

15 [0100] En ciertas realizaciones, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán según la célula huésped utilizada. Entre los genes de selección adecuados cabe incluir, por ejemplo, genes que codifican la resistencia a la ampicilina y/o a la tetraciclina, lo que permite que las células transformadas con estos vectores crezcan en presencia de estos antibióticos.

20 [0101] En un aspecto de la presente invención, se introduce un ácido nucleico CKI mutante en una célula, bien por sí solo o bien en combinación con un vector. Por "introducido en" o los equivalentes gramaticales del presente documento se entiende que los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la integración, amplificación y/o expresión posteriores del ácido nucleico. El método de introducción viene dictado en gran medida  
25 por el tipo de célula diana. Entre los métodos de ejemplo cabe incluir la precipitación con CaPO<sub>4</sub>, la fusión de liposomas, lipofectin-(R), la electroporación, la infección viral, y análogos. En la técnica se conocen métodos especialmente adecuados para la introducción en células de plantas y también se describen más adelante (véase la Sección II, "Plantas transgénicas"). Tales métodos incluyen, por ejemplo, el bombardeo de células con microproyectiles cargados de ADN. Los ácidos nucleicos CKI mutantes se pueden integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped, o puede existir bien de manera transitoria o bien de manera estable en el citoplasma  
30 (por ejemplo, mediante el uso de plásmidos tradicionales, utilizando secuencias reguladoras, marcadores de selección estándar, y análogos.

[0102] Como células huésped para los pasos de clonación iniciales de la presente invención pueden utilizarse procariotas. Resultan especialmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la  
35 producción de plantillas de ADN de cadena sencilla utilizados para la mutagénesis dirigida al sitio, para el cribado de muchos mutantes simultáneamente y para la secuenciación de ADN de los mutantes generados. Entre las células huésped procariotas cabe incluir E. coli K12 cepa 94 (ATCC nº. 31.446), E. coli cepa W3110 (ATCC nº. 27.325) E. coli X1776 (ATCC nº. 31.537) y E. coli B; no obstante, pueden utilizarse otras muchas cepas de E. coli, tales como HB101, JM101, NM522, NM538, NM539, y otras muchas especies y géneros de procariotas, incluidos bacilos tales como Bacillus subtilis, otras enterobacteriáceas tales como Salmonella typhimurium o Serratia marcesans, y varias especies de Pseudomonas como huéspedes. Las células huésped procariotas y otras células huésped con paredes  
40 celulares rígidas se transforman normalmente utilizando el método del cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al., supra. Alternativamente, puede utilizarse la electroporación para la transformación de estas células. Las técnicas de transformación de procariotas se describen en, por ejemplo, Dower, en Genetic Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan et al., Meth. Enzymol., 204:63, 1991. Entre los plásmidos normalmente utilizados para la transformación de E. coli cabe incluir pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 y Bluescript M13, la totalidad de los cuales se describe en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook et al., supra. Sin embargo, también hay disponibles otros muchos vectores adecuados.

50 [0103] Los polipéptidos mutantes CKI de la presente invención normalmente se producen cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el polipéptido CKI mutante, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión del polipéptido CKI mutante. Para la modulación de la división celular, la proteína SKI se expresa en su forma intracelular normal. Para aplicaciones de la presente invención que incluyen la cosecha o aislamiento de un polipéptido, el mutante del CKI puede expresarse a  
55 modo de una proteína intracelular o, alternativamente, en una forma que sea secretada de la célula huésped. Muchas proteínas eucariotas normalmente secretadas de la célula contienen una secuencia de señales de secreción endógena como parte de la secuencia de aminoácidos. Así, las proteínas que normalmente se encuentran en el citoplasma pueden ser dirigidas para su secreción enlazando una secuencia de señales a la proteína. Esto se consigue fácilmente ligando un ADN que codifica una secuencia de señales al extremo 5' del ADN que codifica la proteína, y expresando después esta proteína de fusión en una célula huésped adecuada. El ADN que codifica la secuencia de señales puede obtenerse como un fragmento de restricción a partir de cualquier gen que codifica una proteína con una secuencia de señales. Así, aquí pueden utilizarse secuencias de señales de procariotas, levaduras y eucariotas, dependiendo del tipo de célula huésped utilizada para poner en práctica la invención. Las secuencias de ADN y de aminoácidos que codifican la porción de la secuencia de señales de varios genes eucariotas incluidos,  
60 por ejemplo, la hormona del crecimiento humana, proinsulina y proalbúmina son conocidas (véase Stryer,

Biochemistry (W.H. Freeman and Company, New York, NY, 1988, p.769), y pueden utilizarse como secuencias de señales en células huésped eucariotas apropiadas. Pueden utilizarse secuencias de señales de levaduras como, por ejemplo, fosfatasa ácida (Arima et al., Nuc. Acids Res. 11:1657, 1983), [alfa]-factor, fosfatasa alcalina e invertasa para dirigir la sección de las células huésped de levaduras. Pueden utilizarse secuencias de señales de procariontes de genes que codifican, por ejemplo, LamB u OmpF (Wong et al., Gene 68:193, 1988), MalE, PhoA, o beta-lactamasa, además de otros genes, para dirigir las proteínas expresadas en células procariontes en el medio de cultivo.

[0104] Las condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido CKI mutante variarán en función del vector de expresión y de la célula huésped elegidos y aquellos versados en la técnica podrán determinarlas fácilmente mediante una experimentación rutinaria. Por ejemplo, para poder utilizar promotores constitutivos en el vector de expresión habrá que optimizar el crecimiento y la proliferación de la célula huésped, mientras que para poder utilizar un promotor inducible se necesitarán condiciones de crecimiento apropiadas para la inducción. Además, en algunas realizaciones, el momento de la cosecha es importante. Por ejemplo, los sistemas de baculovirus utilizados en la expresión de células de insectos son virus líticos y, por lo tanto, la selección del momento de la cosecha puede ser importante para el rendimiento del producto.

[0105] Los promotores que se utilizan con mayor frecuencia en vectores procariontes incluyen los sistemas promotores de p-lactamasa (penicilinas) y lactosa (Chang et al., Nature 375:615, 1978; Itakura et al., Science 198:1056, 1977; Goeddel et al., Nature 281:544, 1979) y un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; Solicitud de Patente Europea EPO nº. 36.776), y los sistemas de la fosfatasa alcalina. Aunque estos son los más utilizados, se han utilizado otros promotores microbianos, y los detalles relativos a sus secuencias de nucleótidos se han publicado, lo que permite a un experto en la materia ligarlos funcionalmente en vectores de plásmidos (véase Siebenlist et al., Cell 20:269,1980).

[0106] Un ejemplo ilustrativo de un sistema promotor receptivo que puede utilizarse en la práctica de esta invención es el sistema de la glutatión-S-transferasa (GST) en el maíz. Las GST son una familia de enzimas que pueden desintoxicar una serie de compuestos electrofílicos hidrófobos que a menudo se utilizan como herbicidas pre-emergentes (Weigand et al., Plant Molecular Biology 7:235-243, 1986). Los estudios han demostrado que las GST están directamente relacionadas con esta mayor tolerancia a los herbicidas. Esta acción es mediada principalmente a través de un producto de transcripción de ARNm de 1,1 kb específico. Resumiendo, el maíz tiene un gen quiescente de origen natural ya presente que puede responder a estímulos externos y que puede ser inducido para producir un producto génico. Este gen ya ha sido previamente identificado y clonado. Así, en una realización de esta invención, el promotor es eliminado del gen receptivo a la GST y se une a una secuencia que codifica CKI mutantes. Si el gen CKI mutante se deriva de una fuente de ADN genómico resulta necesario eliminar entonces el promotor nativo durante la construcción del gen quimérico. Este gen de ingeniería es la combinación de un promotor receptivo a un estímulo químico externo y un gen responsable del éxito en la producción de una proteína CKI mutante.

[0107] Un promotor inducible es un promotor capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en respuesta a un inductor. En ausencia de un inductor, las secuencias de ADN o genes no se transcribirán. Normalmente, el factor proteína que se une específicamente a un promotor inducible para activar la transcripción, está presente en una forma inactiva que el inductor convierte después directa o indirectamente en la forma activa. El inductor puede ser un agente químico tal como una proteína, metabolito, un regulador del crecimiento, herbicida o un compuesto fenólico o un estrés fisiológico impuesto directamente mediante calor, frío, sales o elementos tóxicos o indirectamente mediante la acción de un patógeno o agente patológico tal como un virus. La célula de una planta que contiene un promotor inducible se puede exponer a un inductor aplicando externamente el inductor a la célula o planta, como por pulverización, riego, calor o métodos similares. En caso de que fuera conveniente activar la expresión del gen diana a un tiempo particular durante el desarrollo de la planta, el inductor también podría aplicarse así en ese momento.

[0108] Entre los ejemplos de tales promotores inducibles cabe incluir los promotores de choques térmicos, como el promotor de choques térmicos inducible de 70 KD de *Drosophila melanogaster* (Freeling et al., Ann. Rev. of Genetics 19:297-323); un promotor inducible frío, como el promotor inducible frío de *B. napus* (White et al., Plant Physiol. 106, 1994); y el promotor de la alcohol deshidrogenasa que es inducido mediante etanol (Nagao et al., Surveys of Plant Molecular and Cell Biology Vol. 3, p 384-438 (B.J. Mifflin ed., Oxford University Press, Oxford, 1986).

[0109] Un promotor constitutivo es un promotor capaz de activar directa o indirectamente la transcripción de una o más secuencias de ADN o genes en todos los tejidos de una planta transgénica. Normalmente se utiliza un promotor constitutivo como el promotor 35 S de CaMC (Odell, Nature 313:810-812, 1985). Otros ejemplos de promotores constitutivos útiles en plantas incluyen el promotor de la actina del arroz (Elroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990), histona HE del maíz (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231:276-285, 1992) y análogos.

[0110] Los transgenes CKI de la presente invención se pueden expresar utilizando un promotor como el promotor de BCEA (embriones de *B. campestris*) que ha demostrado dirigir altos niveles de expresión en la fase inicial del

desarrollo de semillas (a saber, se transcribe antes que el promotor de la napina). Este es un período anterior a la acumulación de productos de almacenamiento pero en el que tiene lugar una biosíntesis rápida de los pigmentos en las semillas de Brassica (derivado de Johnson-Flanagan et al., J. Plant Physiol. 136:180, 1989; Johnson-Flanagan et al., Physiol. Plant 81:301, 1991). Los promotores de proteínas de almacenamiento de semillas también han demostrado dirigir un alto nivel de expresión de una manera específica a las semillas (Voelker et al., Plant Cell 1:95, 1989; Altenbach et al., Plant Mol. Biol. 13:513, 1989; Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6181, 1991; Russell et al., Transgenic Res. 6:157-68, 1997). El promotor de la napina ha demostrado dirigir la expresión de genes de oleosina en Brassicas transgénicas, de modo que la oleosina se acumule en un 1 % aproximadamente de la proteína total de las semillas (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6181, 1991). Al elegir un promotor, puede que resulte conveniente utilizar un promotor específico de tejidos o de desarrollo regulado que permita la supresión o sobreexpresión en ciertos tejidos sin afectar la expresión en otros tejidos. "Promotores específicos del tejido" se refiere a regiones de codificación que dirigen la expresión génica en tejidos específicos principalmente tales como los de, por ejemplo, raíces, hojas, tallos, pistilos, anteras, pétalos, tegumento, núcleos de semillas o capas epidérmicas. Pueden integrarse estimuladores, potenciadores o activadores de transcripciones en los promotores específicos del tejidos para crear un promotor con un alto nivel de actividad que retenga la especificidad de los tejidos. Por ejemplo, los promotores utilizados en la sobreexpresión serán preferentemente específicos del tejido. La sobreexpresión en el tejido incorrecto tal como las hojas, al intentar sobreexpresar en áreas de almacenamiento de semillas, podría resultar perjudicial. Los promotores especialmente adecuados son aquellos que permiten, por ejemplo, una expresión específica a las semillas, específica a las raíces, específica a las hojas, específica a los frutos, y análogos. Esto puede resultar especialmente útil ya que las semillas, raíces, hojas y frutos son de especial interés. Ya hay disponibles algunos promotores específicos para diferentes tipos de tejidos o se pueden aislar mediante técnicas bien establecidas (véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses n.º.: 5.792.925; 5.783.393; 5.859.336; 5.866.793; 5.898.096 y 5.929.302) y lo que se describe a continuación. En la Tabla 1 se listan otros promotores específicos de los embriones que pueden ser utilizados para la práctica de la presente invención.

Tabla 1. Promotores específicos de los embriones

Promotor	Embrión	Endosperma	Temporización	Referencia
oleosina de <i>Arabidopsis</i>	fuerte, uniforme	ninguno	trazas en el corazón, mayores en la etapa temprana que en la tardía del cotiledón	Al et al., Plant Mol. Biol. 25:193-205, 1994
USP de <i>Vicia faba</i>	fuerte, uniforme	ninguno	no conocido en la etapa temprana, fuerte en cot. tardíos	Baumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225:459-467, 1991.
Legúmina de <i>Vicia faba</i>	fuerte, preferencial en cotiledones	capa aleurona (tardío)	no conocido en la etapa temprana, fuerte en cot. tardíos	Baumlein et al., supra 1991.
Napina de <i>Brassica</i>		?	tardío	Kohno-Murase, Plant Mol. Biol. 26:1115-1124, 1994
Albúmina S1 de <i>Arabidopsis</i>	solo en el eje	ninguno	etapa de temprana a tardía del cotiledón	Guerche et al., Plant-Cell 2:469-478, 1990
Albúmina S2	en ejes y cotiledones	ninguno	etapa de temprana a tardía del cotiledón	Guerche et al., supra, 1990.

[0111] En realizaciones particulares de la presente invención, un promotor específico de las semillas que es especialmente activo durante el desarrollo de la planta embrionaria de una semilla inmadura resulta de interés. La expresión de un mutante negativo dominante de la presente invención en una etapa temprana del desarrollo de las semillas puede ser conveniente para aumentar las divisiones celulares tempranas en el desarrollo de semillas. Más divisiones celulares en esta etapa puede llevar a embriones mayores. La composición de los embriones contiene aproximadamente un 33 % de aceite, por lo tanto un embrión mayor llevará a aumentos en el contenido de aceite. Un promotor adecuado para la expresión de la invención actual en embriones y menor o ninguna expresión en otros tejidos de plantas resulta interesante para aumentar el contenido de aceite de las semillas. De especial interés son aquellas secuencias de promotores que inician la expresión en el desarrollo embrionario específico de la fase temprana. Un promotor específico de la fase temprana es un promotor que inicia la expresión de una proteína antes del día 7 tras la polinización (bastón) en *Arabidopsis* o una etapa equivalente en otras especies de plantas. Ejemplos de secuencias de promotores de especial interés incluyen un promotor para el gen de la permeasa de aminoácidos (AAP 1) (por ejemplo, el promotor AAP1 de *Arabidopsis thaliana*), un promotor para el gen de la oleato 12-hidroxilasa:desaturasa (por ejemplo, el promotor designado LFAH12 de *Lesquerella fendleri*), un promotor para el

gen de la albúmina 2S2 (por ejemplo, el promotor 2S2 de *Arabidopsis thaliana*), un promotor del gen de la elongasa de ácidos grasos (FAE1) (por ejemplo, el promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana*), y el promotor del gen de los cotolidones frondosos (LEC2) (por ejemplo, el promotor LEC2 de *Arabidopsis thaliana*). Los promotores AAP1, LFAH12, 2S2 y FAE1 están inactivos en la etapa más temprana del desarrollo embrionario. Pasan a ser activos transcripcionalmente en las etapas cada vez más tardías del desarrollo empezando por AAP1 y seguido de LFAH12, 2S2, y por último FAE. Los cuatro promotores permanecen entonces activos a lo largo de las etapas más tardías del desarrollo embrionario. El promotor LEC2 tiene un perfil de expresión inversa. Está activo muy temprano durante el desarrollo embrionario y, después, su actividad se va reduciendo gradualmente a lo largo de las etapas más tardías. Otros promotores específicos de los embriones de interés incluyen los promotores de los genes siguientes: promotores de palos de semillas (Pinvopich et al., *Nature* 424:85-88, 2003), Fbp7 y Fbp11 (Palo de semillas de petunias) (Colombo et al., *Plant Cell*, 9:703-715, 1997), Banyuls (Devic, *Plant J.*, 19:387-398, 1999), ABI3 (Ng et al., *Plant. Mol. Biol.* 54:25-38, 2004), agl-15, Agl18 (Lehti-Shiu et al., *Plant Mol. Biol.* 58:89-107, 2005), Phe1 (Kohler, *Genes Develop.* 17:1540-1553, 2003), emb175 (Cushing et al., *Planta*. 221:424-436, 2005), L11 (Kwong et al., *Plant Cell* 15:5-18, 2003), Lec1 (Lotan, *Cell* 93:1195-1205, 1998), Fusca3 (Kroj et al., *Development* 130:6065-6073, 2003), TT12 (Debeaujon et al., *Plant Cell* 13:853-871, 2001), TT16 (Nesi et al., *Plant Cell* 14:2463-2479, 2002), A-RZF (Zou y Taylor, *Gene* 196:291-295, 1997), TTG1 (Walker et al., *Plant Cell* 11:1337-1350, 1999), TT1 (Sagasser et al., *Genes Dev.* 16:138-149, 2002), TT8 (Nesi et al., *Plant Cell* 12:1863-1878, 2000) y Gea-8 (zanahoria) (Lin et al., *J. Exp. Botany* 50:1139-1147, 1999). Los promotores específicos de los embriones de monocotiledóneas incluyen Globulina, Knox (arroz) (Postma-Haarsma, *Plant Mol. Biol.* 39:257-271, 1999), Oleosina (Plant, *Plant Mol. Biol.* 25:193-205, 1994), Keddie, *Plant Mol. Biol.* 24:327-340, 1994), Peroxirredoxina (Per1) (Haslekas et al., *Plant Mol. Biol.* 36:833-845, 1998), Haslekas et al., *Plant Mol. Biol.* 53:313-326, 2003), HvGAMYB (Diaz et al., *Plant J.* 29:453-464, 2002) y SAD1 (Isabel-LaMoneda et al., *Plant J.* 33:329-340, 1999) de la cebada, y promotores de las proteínas ricas en prolina de los híbridos de maíz Zca (Jose-Estanyol et al., *Plant Cell* 4:413-423, 1992; Jose-Estanyol et al., *Gene* 356:146-152, 2005).

[0112] Los promotores de proteínas de almacenamiento de semillas también son de especial interés ya que las proteínas de almacenamiento de semillas representan hasta el 90 % de la proteína total de las semillas en muchas plantas. Las proteínas de almacenamiento de semillas se regulan estrictamente, y se expresan de manera casi exclusiva en semillas de una manera altamente específica a los tejidos y específica a las etapas (Higgins et al., *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:191-221, 1984; Goldberg et al., *Cell* 56:149-160, 1989). Además, pueden expresarse diferentes proteínas de almacenamiento de semillas en diferentes etapas del desarrollo de semillas. La expresión de genes específicos de las semillas se ha estudiado con mucho detalle (véanse las reseñas de Goldberg et al., *supra*, y de Higgins et al., *supra*). Ejemplos de promotores específicos de las semillas incluyen LFAH12 de *Arabidopsis* y otras plantas, y las regiones reguladoras 5' de un gen de oleosina de *Arabidopsis* tal como se describe en las Patente Estadounidense 5.977.436 de Thomas et al., que cuando se une operativamente bien a la secuencia de codificación de un gen heterólogo o a la secuencia complementaria a un gen de una planta nativa, dirige la expresión del gen heterólogo o de la secuencia complementaria en la semilla de una planta.

[0113] Entre los promotores de las proteínas de almacenamiento de semillas adecuados para plantas dicotiledóneas cabe incluir, por ejemplo, promotores de la  $\beta$ -faseolina, lectina y fitohemaglutinina de las judías (Sengupta Gopalan, et al., *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3320-3324, 1985; Hoffman et al., *Plant Mol. Biol.* 11:717-729, 1988; Voelker et al., *EMBO J.* 6:3571-3577, 1987); promotores de la napina (Canola) de la colza (Radke et al., *Theor. Appl. Genet.* 75:685-694, 1988); promotores de la glicinina y conglucina de la colza (Chen et al., *EMBO J.* 7:297-302, 1988; Nielson et al., *Plant Cell* 1:313-328, 1989; Harada et al., *Plant Cell* 1:415-425, 1989; Beachy et al., *EMBO J.* 4:3047-3053, 1985); promotores de la lectina de la soja (Okamuro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8240-8244, 1986); promotores del inhibidor de tripsina Kunitz de la soja (Perez-Grau et al., *Plant Cell* 1:1095-1109, 1989; Jofuku et al., *Plant Cell* 1: 1079-1093, 1989); promotores de la patatina de la patata (Rocha Sosa et al., *EMBO J.* 8:23-29, 1989); promotores de la convicilina, vicilina y legúmina de los guisantes (Rerie et al., *Mol. Gen. Genet.* 259:145-157, 1991; Newbigin et al., *Planta* 180:461-470, 1990; Higgins et al., *Plant Mol. Biol.* 11:683-695, 1988; Shirsat et al., *Mol. Gen. Genetics* 215:3 26-331, 1989); y promotores de la esporamina de las batatas (Hattori et al., *Plant Mol. Biol.* 14:595-604, 1990).

[0114] Para las plantas monocotiledóneas, entre los promotores de las proteínas de almacenamiento de semillas útiles en la práctica de la invención cabe incluir, por ejemplo, promotores de la zeína del maíz (Schemthaler et al., *EMBO J.* 7:1249-1255, 1988; Hoffman et al., *EMBO J.* 6:3213-3221, 1987 (maize 15 kD zein)); promotores de la oleosina de 18 kD del maíz (Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6181-6185, 1991); promotores cerosos; promotores reducidos 1; promotores de la globulina 1; promotores reducidos 2; promotores de la glutelina del arroz; promotores de la hordeína de la cebada (Marris et al., *Plant Mol. Biol.* 10:359-366, 1988); RP5 (Su et al., *J. Plant Physiol.* 158:247-254, 2001); promotores de los maíces EBE1 y 2 (Magnard et al., *Plant Mol. Biol.* 53:821-836, 2003) y promotores de la glutenina y gliadina del trigo (Patente Estadounidense n°. 5.650.558; Colot et al., *EMBO J.* 6:3559-3564, 1987).

[0115] También adecuados para la práctica de la presente invención son los promotores de genes para la isocitrato liasa y malato sintasa de *B. napus* (Comai et al., *Plant Cell* 1:293-300, 1989); delta-9 desaturasa de cártamo (Thompson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2578-2582, 1991) y ricino (Shanklin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

88:2510-2514, 1991); proteína portadora de acilo (ACP) de Arabidopsis (Post-Beittermiller et al., Nucl. Acids Res. 17:1777, 1989), *B. napus* (Safford et al., Eur. J. Biochem. 174:287-295, 1988) y *B. campestris* (Rose et al., Nucl. Acids Res. 15:7197, 1987); la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintetasa de la cebada (Siggaard-Andersen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4114-4118, 1991); y la oleosina del *Zea mays* (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6181-6185, 1991), de la soja (Genbank Accession No. X60773) y de *B. napus* (Lee et al., Plant Physiol. 96:1395-1397, 1991).

[0116] Otros promotores útiles en la práctica de la invención son conocidos por aquellos versados en la técnica. Además, pueden utilizarse métodos conocidos para aislar promotores adicionales adecuados para su uso conforme a la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse técnicas de cribado diferencial para aislar promotores expresados en momentos específicos (del desarrollo), tales como durante el desarrollo de los frutos.

[0117] Los promotores de genes específicos de la semilla, unidos operativamente a secuencias de codificación heterólogas en construcciones de genes quiméricos también mantienen su patrón de expresión temporal y espacial en las plantas transgénicas. Tales ejemplos incluyen el uso de promotores de los genes de proteínas de almacenamiento de semillas de Arabidopsis thaliana 28 para expresar péptidos de encefalinas en semillas de Arabidopsis y *B. napus* (Vandekerckhove et al., Bio/Technology 7:929-932, 1989), promotores de la lectina y [beta]-faseolina de judías para expresar luciferasas (Riggs et al., Plant Sci. 63:47-57, 1989), y promotores de la glutenina del trigo para expresar cloranfenicol acetiltransferasa (Colot et al., supra).

[0118] Para conseguir el nivel correcto de expresión de los fragmentos de ácido nucleico de la invención puede que sea necesario el uso de diferentes genes quiméricos que utilizan diferentes promotores. Dichos genes quiméricos se pueden transferir en plantas huésped bien juntos en un solo vector de expresión o secuencialmente utilizando más de un vector.

[0119] Además, muchas veces se necesitan potenciadores o resultan útiles para aumentar la expresión del gen de la invención. Es necesario que estos elementos estén unidos operativamente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores estén en buenas condiciones de uso. Los potenciadores o elementos tipo potenciadores pueden ser tanto el fragmento de ácido nucleico nativo como el quimérico. Esto incluiría potenciadores virales tales como los presentes en el promotor 35S (Odell et al., Plant Mol. Biol. 10:263-272, 1988), potenciadores de los géneros opina (Fromm et al., Plant Cell 1:977-984, 1989), o potenciadores de cualquier otra fuente que resulta en un aumento de la transcripción cuando se colocan en un promotor unido operativamente al fragmento de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, una construcción puede incluir el promotor 35S del CaMV con un doble potenciador transcripcional enlazado a la secuencia líder no traducida 5' del Virus del Mosaico del Tabaco (TEV). La secuencia líder del TEV actúa como potenciador de la traducción para aumentar la cantidad de proteína generada.

[0120] Los elementos promotores adecuados, tales como los descritos en este documento, pueden fusionarse a las secuencias de ácidos nucleicos CKI mutantes y a un terminador adecuado (región de poliadenilación) conforme a un procedimiento bien establecido.

#### Plantas transgénicas

[0121] En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan plantas transgénicas que comprenden un transgén CKI mutante. Pueden obtenerse plantas transgénicas que expresan un polipéptido CKI mutante mediante, por ejemplo, la transferencia de un vector transgénico (por ejemplo, un vector plásmido o viral) que codifica el polipéptido mutante en una planta. Típicamente, cuando el vector es un plásmido, el vector incluye también un gen marcador seleccionable, por ejemplo, el gen neomicina fosfotransferasa II (nptII) que codifica la resistencia a la kanamicina. El método más corriente de transformación de plantas se realiza clonando un transgén diana en un vector de transformación de plantas que después se transforma en *Agrobacterium tumifaciens* que contiene un plásmido Ti asistente tal como se describe en Hoeckema et al. (Nature 303:179-181, 1983). Las células de *Agrobacterium* que contienen el vector transgénico se incuban con trozos de hojas de la planta a transformar tal como lo describe An et al. (Plant Physiology 81:301-305, 1986). (Véase también Hooykaas, Plant Mol. Biol. 13:327-336, 1989). La transformación de las células huésped de la planta cultivada normalmente se consigue a través de *Agrobacterium tumifaciens*, tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos de células huésped que no tienen barreras rígidas en la membrana celular normalmente se transforman utilizando el método del fosfato de calcio tal como lo describió por primera vez Graham et al. (Virology 52:546, 1978) y se modifican según lo descrito en las secciones 16.32-16.37 de Sambrook et al., supra. No obstante, también pueden utilizarse otros métodos para la introducción de ARN en células tales como Polybrene (Kawai et al., Mol. Cell. Biol. 4:1172, 1984), fusión del protoplasto (Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163, 1980), electroporación (Neumann et al., 1982 EMBO J. 1:841, 1982), y microinyección directa en los núcleos (Capecchi, Cell 22:479, 1980). Los callos de las plantas transformadas se pueden seleccionar con el marcador seleccionable dejando crecer las células en un medio que contenga, por ejemplo, kanamicina y cantidades apropiadas de una fitohormona como ácido naftalenacético y benciladenina para la inducción de los callos y brotes. Las células de las plantas se pueden regenerar entonces y las

plantas resultantes pueden ser transferidas a la tierra utilizando técnicas bien conocidas por aquellos versados en la técnica.

[0122] Además de los métodos arriba descritos, se conocen un gran número de métodos en la técnica para la transferencia de ADN clonado en una amplia variedad de especies de plantas, incluyendo gimnospermas, angiospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas (véase, por ejemplo, *Methods in Plant Molecular Biology* (Glick and Thompson eds., CRC Press, Boca Ration, FL, 1993); Vasil, *Plant Mol. Biol.* 25:925-937, 1994; y Komari et al., *Current Opinions Plant Biol.* 1:161-165, 1998 (exámenes generales); Loopstra et al., *Plant Mol. Biol.* 15:1-9, 1990; y Brasileiro et al., *Plant Mol. Biol.* 17:441-452, 1991 (transformación de árboles); Eimert et al., *Plant Mol. Biol.* 19:485-490, 1992 (transformación de Brassica); Hiei et al., *Plant J.* 6:271-282, 1994; Hiei et al., *Plant Mol. Biol.* 35:205-218, 1997; Chan et al., *Plant Mol. Biol.* 22:491-506, 1993; Patentes Estadounidenses n.º. 5.516.668 y 5.824.857 (transformación de arroz); y las Patentes Estadounidenses n.º. 5.955.362 (transformación de trigo); 5.969.213 (transformación de monocotiledóneas); 5.780.798 (transformación de maíz); 5.959.179 y 5.914.451 (transformación de soja). Ejemplos representativos incluyen la absorción de ADN facilitada por la electroporación por parte de protoplastos (Rhodes et al., *Science* 240:204-207, 1988; Bates, *Methods Mol. Biol.* 111:359-366, 1999; D'Halluin et al., *Methods Mol. Biol.* 111:367-373, 1999; Patente Estadounidense n.º 5.914.451); tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (Lyznik et al., *Plant Molecular Biology* 13:151-161, 1989; Datta et al., *Methods Mol. Biol.*, 111:335-334, 1999); y bombardeo de células con microproyectiles cargados de ADN (Klein et al., *Plant Physiol.* 91:440-444, 1989; Boynton et al., *Science* 240:1534-1538, 1988; Register et al., *Plant Mol. Biol.* 25:951-961, 1994; Barcelo et al., *Plant J.* 5:583-592, 1994; Vasil et al., *Methods Mol Biol.* 111:349-358, 1999; Christou, *Plant Mol. Biol.* 35:197-203, 1997; Finer et al., *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 240:59-80, 1999). Adicionalmente, las estrategias y técnicas de transformación de plantas se analizan en Birch, *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol.* 48:297, 1997; Forester et al., *Exp. Agric.* 3 3:15-3 3, 1997. Con solo unas pequeñas variaciones, estas tecnologías son aplicables a una amplia variedad de especies de plantas.

[0123] En el caso de la transformación de las monocotiledóneas, normalmente se utiliza el método de bombardeo de partículas. No obstante, algunas monocotiledóneas como el maíz también pueden ser transformadas utilizando métodos de transformación con *Agrobacterium* tal como se describe en la Patente Estadounidense 5.591.616 de Hiei et al. En otro método para efectuar la transformación de monocotiledóneas, por ejemplo, maíz, las células de los cultivos embrionarios en suspensión se mezclan con una suspensión de fibras (5 % p/v, vibras de SC-9 Silar) y ADN plasmídico (1 µg/ul) que después se coloca en sentido vertical en una copa para múltiples muestras sobre un agitador vórtex Vortex Genie II (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) o en sentido horizontal en el soporte de un mezclador de amalgamas dentales Mixomat (Degussa Canada Ltd., Burlington, Ontario, Canada). A continuación se lleva a cabo la transformación mezclando a toda velocidad durante 60 segundos (por ejemplo, con un Vortex Genie II) o agitando a una velocidad fija durante 1 segundo (Mixomat). Este proceso resulta en la producción de poblaciones de células en las cuales pueden seleccionarse transformantes estables. Las plantas se regeneran a partir de los callos transformados de manera estable y puede verse que estas plantas y su progenie son transgénicas mediante análisis de hibridación Southern. Las ventajas principales del enfoque son su simplicidad y bajo coste. A diferencia del bombardeo de partículas, no se necesitan equipos ni fuentes de suministro caras. El uso de vibras para la transformación de células de plantas, particularmente maíz, se describe, por ejemplo en la Patente Estadounidense 5.464.765 de Coffee et al.

[0124] En la Patente Estadounidense 5.968.830 de Dan et al., se describen métodos para la transformación y regeneración de soja. En la Patente Estadounidense 5.969.215 de Hall et al., se describen técnicas de transformación para la producción de plantas *Beta vulgaris* transformadas, tales como la remolacha azucarera.

[0125] Cada una de las técnicas de transformación antedichas tiene sus ventajas y sus desventajas. En cada una de las técnicas, el ADN de un plásmido se modifica genéticamente de modo que no solo contenga el gen de interés, sino genes marcadores seleccionables y cribables. Un gen marcador seleccionable se utiliza para seleccionar solo aquellas células que tienen copias integradas del plásmido (la construcción es tal que el gen de interés y los genes seleccionables y cribables son transferidos como una sola unidad). El gen cribable proporciona otra verificación para el éxito del cultivo de solo aquellas células que portan los genes de interés.

[0126] La transformación tradicional con *Agrobacterium* con marcadores seleccionables de resistencia a los antibióticos resulta problemática por la oposición pública que opina que dichas plantas suponen un riesgo indebido de difundir la tolerancia a los antibióticos a los animales y humanos. Dichos marcadores antibióticos pueden eliminarse de las plantas mediante una transformación de las plantas utilizando técnicas de *Agrobacterium* similares a las descritas en la Patente Estadounidense 5.731.179 de Komari et al. Los problemas de resistencia a los antibióticos también pueden evitarse de manera eficaz con el uso de secuencias de codificación de barras o cuadros, tales como las descritas en la Patente Estadounidense n.º. 5.712.135. Estos ADN marcadores preferentes codifican unas segundas proteínas o polipéptidos que inhiben o neutralizan la acción de la fosfotricina de los herbicidas inhibidores de la glutamina sintetasa (glufosinato) y la sal de glufosinato de amonio (Basta, Ignite).

[0127] El plásmido que contiene uno o más de estos genes se introduce bien en los protoplastos o bien en las células del callo mediante cualquiera de las técnicas anteriormente mencionadas. Si el gen marcador es un gen

seleccionable, solo aquellas células que han incorporado el paquete de ADN sobreviven bajo la selección con el agente fitotóxico apropiado. Una vez identificadas y propagadas las células apropiadas, las plantas se regeneran. La progenie de las plantas transformadas debe ser analizada para garantizar que el paquete de ADN se ha integrado con éxito en el genoma de la planta.

5 [0128] Son muchos los factores que influyen en el éxito de la transformación. El diseño y la construcción de la construcción genética exógena y sus elementos reguladores influyen en la integración de la secuencia exógena en el ADN cromosomal del núcleo de la planta y la capacidad de que el transgén sea expresado por la célula. Un método adecuado para la introducción de la construcción genética exógena en el núcleo de las células de la planta de manera no letal es fundamental. Y lo más importante, el tipo de célula en el que se introduce la construcción debe, si lo que se van a recuperar son plantas enteras, ser de un tipo que sea susceptible de regeneración, dado un protocolo de regeneración apropiado.

#### 15 Métodos de uso

[0129] Según otro aspecto de la presente invención, la división celular en la célula de una planta se modula, por ejemplo, aumenta. Las células de plantas susceptibles de modulación, tal como un aumento de la división celular utilizando los métodos descritos en este documento, son células de plantas que expresan un polipéptido CKI de tipo salvaje que tiene regiones de unión a la ciclina y a la CDK independientes. Por lo general, los métodos consisten en expresar dentro de la célula de la planta un polipéptido CKI mutante tal como se describe en este documento, y dejar que el polipéptido CKI mutante inhiba la actividad biológica del CKI de tipo salvaje dentro de la célula de la planta. El polipéptido CKI mutante se expresa a partir de un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína mutante. Además, en algunas realizaciones, el método también consiste en introducir en la célula de la planta el ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido CKI mutante. Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los polipéptidos mutantes CKI, incluyendo la construcción de dichas moléculas recombinantes y su introducción en células de plantas, se han descrito en líneas generales supra, y se ilustran aún más en los Ejemplos, Infra. La modulación de la división celular puede llevarse a cabo en la célula de una planta bien in vivo, tal como se ha descrito aquí arriba respecto a las plantas transgénicas. Alternativamente, el método puede realizarse en la célula de una planta in vitro.

30 [0130] Tal como se ha descrito anteriormente, el polipéptido CKI mutante incluye una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido CKI de referencia. Respecto al método para la modulación de la división celular, el polipéptido CKI de referencia puede ser bien el polipéptido CKI de la planta de tipo salvaje expresado dentro de la célula de la planta en la que se va a llevar a cabo la modulación de la división celular (típicamente el CKI de tipo salvaje endógeno). Alternativamente, dado que el uso de una proteína CKI mutante tal como se describe en este documento puede dar cabida a una actividad antagonista negativa dominante contra homólogos estructurales o miembros de la familia de los CKI de tipo salvaje de los que se deriva el mutante, el polipéptido CKI de referencia puede ser un polipéptido CKI de tipo salvaje heterólogo al polipéptido CKI de tipo salvaje expresado con la célula de la planta y que es capaz de proporcionar una función de tipo salvaje sustancialmente equivalente. Así, en algunos casos, una proteína CKI mutante, no derivada de la proteína CKI endógena, se expresa dentro de la célula de una planta para inhibir la función CKI de tipo salvaje endógena (por ejemplo, puede utilizarse un polipéptido CKI mutante derivado de una proteína KRP de tipo salvaje de Arabidopsis thaliana para inhibir la función de la KRP de tipo salvaje en células de plantas no heterólogas tales como, por ejemplo, células de Brassica napus, soja (Glycine max), maíz y análogos). También pueden utilizarse otros polipéptidos mutantes CKI heterólogos derivados de otras plantas, tal como Brassica napus, y análogos.

45 [0131] Además, en ciertas realizaciones del método, se inhiben simultáneamente una pluralidad de CKI relacionados dentro de la célula de una planta utilizando un CKI mutante de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, todos los CKI endógenos de una familia (por ejemplo, miembros de la familia de las KRP) se inhiben simultáneamente. Tal como se ha indicado anteriormente, una proteína CKI mutante como la descrita en este documento da cabida a la actividad antagonista negativa dominante dentro de homólogos estructurales o de miembros de la familia del CKI de tipo salvaje de los que se deriva la variante, permitiendo así tal inhibición simultánea de múltiples homólogos o miembros de la familia. Así, en realizaciones típicas, una pluralidad de (y preferentemente todos los) CKI que tienen una identidad de secuencia o similitud sustanciales dentro de la región de unión a la CDK o a la ciclina objetivo se inhiben dentro de la célula de una planta. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, dado que los miembros de la familia de las KRP comparten una identidad de secuencia sustancial dentro de la región de unión a la CDK, que es la principal responsable de la inhibición de la actividad quinasa del complejo ciclina-CDK, una pluralidad de, y preferentemente todos, los miembros endógenos de la familia de las KRP presentes dentro de la célula de una planta quedan inhibidos mediante la expresión de un CKI de la KRP mutante para así modular la división celular.

60 [0132] Tal como se ha descrito anteriormente, la división celular dentro de la célula de una planta se modula a base de bloquear de manera efectiva las proteínas CKI endógenas de las actividades de inhibición del complejo ciclina/CDK. Tal modulación incluye la aceleración de la progresión a través del ciclo celular y, en última instancia, una mayor proliferación celular. Según esto, con la utilización de los métodos descritos en este documento in vivo

(por ejemplo, plantas transgénicas, véase supra), puede conseguirse un aumento en el rendimiento de los cultivos y/o del tamaño de las semillas, un aumento del vigor de las plantas, un aumento de la masa radicular, un aumento del tamaño de los frutos, y similares.

5 [0133] El aumento del rendimiento de los cultivos puede manifestarse de varias formas dependiendo del tejido específico de la planta y de la especie de la planta en la que se ha modulado el ciclo celular de la planta mediante el bloqueo de las proteínas CKI endógenas para que no inhiban las actividades del complejo ciclina/CDK.

10 [0134] En cultivos de semillas tales como maíz, arroz, trigo, cebada, soja, canola, el aumento del rendimiento puede manifestarse como un aumento del número total de semillas, un aumento del tamaño de las semillas, o ambos, un aumento del número de semillas y del tamaño de las semillas. En una realización, puede obtenerse un aumento del rendimiento en variedades transgénicas de cualquiera de los cultivos de semillas mediante la expresión transgénica que codifica una proteína CKI mutante que provoca un aumento de la división celular y un aumento del número total de semillas, semillas más grandes, o ambos, un aumento del número de semillas y del tamaño de las semillas. En una realización, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla a través de un promotor constitutivo. En otra realización ilustrativa, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla a través de un promotor específico de la semilla que dirige el efecto de la proteína CKI mutante a la semilla que es el componente agrónomicamente importante de un cultivo de semillas.

20 [0135] En el caso de los cultivos de semillas oleaginosas tales como soja, canola, camelina, lino, maíz, cártamo o girasol, y análogos, de los que el producto deseado es el aceite, un aumento del rendimiento se manifiesta como una mayor extracción de aceite por planta. El aceite se deriva del embrión en la semilla. En una realización, puede obtenerse un aumento del rendimiento en aceite en variedades transgénicas de cualquiera de los cultivos de semillas oleaginosas mediante la expresión de un transgén que codifica una proteína CKI mutante que provoca un aumento de la división celular que lleva a un aumento del número total de semillas, un aumento del tamaño del embrión, o ambos, un aumento del número de semillas y del tamaño del embrión. El aumento del número total de semillas por planta resulta en un aumento de la extracción de aceite total por planta. El aumento del tamaño del embrión resulta en un mayor contenido de aceite por semilla y un aumento de la extracción de aceite total por planta. En una realización preferente, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla a través de un promotor específico del embrión que provoca un aumento de la división celular en la fase de desarrollo temprano del embrión que se traduce en un embrión más grande, un aumento de la cantidad de aceite por semilla y un aumento correspondiente en la extracción de aceite total por planta.

35 [0136] La producción de biomasa sin semillas es el componente de rendimiento principal de cultivos tales como alfalfa, lechuga, tabaco, eucalipto y chopo. Un aumento del rendimiento en tales cultivos se manifestará a través de un aumento del crecimiento general de la planta que resulta en una mayor acumulación de biomasa. En una realización, puede obtenerse un aumento de la biomasa en variedades transgénicas de cualquiera de los cultivos de biomasa mediante la expresión de un transgén que codifica una proteína CKI mutante que provoca un aumento de la división celular que lleva a un aumento del crecimiento y de la biomasa. En una realización, la expresión del transgén de la proteína CKI transgénica se controla mediante un promotor que proporciona una expresión constitutiva de la proteína CKI mutante que codifica el transgén en la mayoría o en todos los tejidos de la planta. En una realización preferente, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla a través de un promotor específico del tejido que dirige la expresión del transgén al componente agrónomicamente importante de la planta tal como la hoja en la lechuga o el tabaco o el tronco en el eucalipto o el chopo para aumentar la acumulación de biomasa en el tejido diana.

50 [0137] El azúcar o la celulosa son el componente productivo principal de los cultivos destinados a la producción de etanol incluyendo la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el maíz y el pasto varilla. En una realización, puede obtenerse una mayor cantidad de azúcar en variedades transgénicas de cualquiera de los cultivos para la producción de azúcar tales como la caña de azúcar o la remolacha azucarera mediante la expresión de un transgén que codifica una proteína CKI mutante que provoca un aumento de la división celular, un mayor crecimiento del tejido que acumula el azúcar de la planta y un aumento del contenido total de azúcar por planta. En una realización, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante en los cultivos para la producción de azúcar se controla mediante un promotor que proporciona una expresión constitutiva del transgén que codifica la proteína CKI mutante en la mayoría o en todos los tejidos de la planta. En una realización preferente, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla a través de un promotor específico del tejido que dirige la expresión del transgén al tejido de la planta que acumula el azúcar tal como la caña en el caso de la caña de azúcar o la raíz en el caso de la remolacha azucarera aumentando así la proliferación celular y el crecimiento del tejido de almacenamiento y acumulación del azúcar de la planta que lleva a un aumento del contenido total de azúcar. En otra realización, puede obtenerse una mayor cantidad de celulosa en variedades transgénicas de cualquiera de los cultivos que producen celulosa tal como maíz o pasto varilla mediante la expresión de un transgén que codifica una proteína CKI mutante que provoca un aumento de la división celular y una síntesis de la pared celular aumentando así el contenido de celulosa que es un componente de la pared celular. En una realización, la expresión del transgén de la proteína CKI mutante se controla mediante un promotor que proporciona una expresión constitutiva del transgén que codifica la proteína CKI mutante en la mayoría o en todos los tejidos de la planta. El aumento general consecuente en la

proliferación celular resulta en una mayor deposición de la pared celular y, por lo tanto, un aumento del contenido total de celulosa de la planta.

## Ejemplos

5

[0138] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, y no para limitar, la invención reivindicada.

### Ejemplo 1. Producción/purificación de un complejo ciclina:CDK activo y la producción/purificación de moléculas de Krp

10

Células de insecto y medios

15

[0139] El sistema de expresión baculovirus es un sistema eucariota versátil para la expresión de genes heterólogos. Este sistema proporciona un plegamiento correcto de las proteínas, la formación de un enlace disulfuro y otras modificaciones post-traducción importantes. Todos los métodos se tomaron del sistema de vectores de expresión de Baculovirus. Manual de procedimientos y medios. (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA. 6th ed.). Se cultivaron células de insecto Sf9 a 27°C en un medio para células de insecto TNM-FH (BD Biosciences) para los estudios reportados. Conviene destacar que existen medios alternativos bien conocidos por aquellos versados en la materia y que también resultan útiles. De igual modo, otras líneas celulares de insecto alternativas como las células Sf21 y la High Five TM también valdrán para la producción de virus y la producción de proteínas.

20

Western Blot e inmunoprecipitaciones.

25

[0140] La proteína recombinante expresada en células de insecto se controló mediante Western blot. Se hirvieron extractos de proteínas (35 µg) en presencia de un tampón Laemmli, se sometió a electroforesis en gel SDS-PAGE al 10 % o 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF utilizando un aparato de transferencia sumergida (BioRad). Tras la transferencia, la membrana se bloqueó en TBS-T (25 mM Tris pH 7,5; 75 mM NaCl; 0,05 % Tween) que contenía un 5 % de leche en polvo desnatada. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:1000 durante toda la noche en un tampón de bloqueo TBS-T. Los blots se lavaron tres veces durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidada de rábano picante (HRP) a una dilución de 1:10,000 en un tampón de bloqueo TBS-T. Los blots se incubaron en un anticuerpo secundario durante 1 hora y, a continuación, se lavaron tres veces en TBS-T, 15 minutos cada uno. A continuación los blots se procesaron según lo descrito en el protocolo del sistema ECL (Amersham Biosciences). Los anticuerpos normalmente utilizados fueron: anticuerpo monoclonal M2 anti-flag (Sigma), anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal anti-HA (Babco), anticuerpo anti-PSTAIR (Sigma-Aldrich), anticuerpo monoclonal o policlonal anti-myc (A-14) (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IG-HRP anti-ratón y IG-HRP anti-conejo (GE Healthcare).

30

35

40

[0141] Se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de forma rutinaria para controlar la formación del complejo entre AtciclinaD2;1, AtCDKA y moléculas de krp. Se diluyeron extractos de proteínas (14 µg) en 0,5 ml de un tampón de unión (100 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7,0, 150 mM NaCl, 1% Triton 100 más inhibidores de proteasa). La mezcla proteína/anticuerpo se agitó suavemente a 4 °C durante dos horas aproximadamente y, a continuación, se añadió el anticuerpo apropiado. (2 µg de anticuerpo M2 anti-flag; 5 µl de anticuerpo anti-HA; 5 µl de anticuerpo policlonal anti-myc). Se añadió proteína A sefarosa para obtener un volumen del lecho de 10 µl. Los inmunoprecipitados se mezclaron suavemente durante 1 hora a 4 °C y, a continuación, se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón de unión. Los complejos proteicos unidos a las perlas de Proteína-A sefarosa se hirvieron en presencia de un tampón Laemmli. Los complejos proteicos se volvieron a disolver en geles SDS-PAGE bien al 10 % o al 12 % y después se transfirieron a la membrana de PVDF. Las membranas se mancharon tal como se ha descrito anteriormente.

45

50

Construcción del vector Baculovirus

55

[0142] Las secuencias de cADN de la ciclina de Arabidopsis D2;1 (AtciclinaD2;1) y del CDKA de Arabidopsis (AtCDKA) se etiquetaron con epítomos y se clonaron en un vector de transferencia Baculovirus (BD Biosciences). También pueden utilizarse otros sistemas de vectores de transferencia conocidos por los expertos. La AtciclinaD2;1 se etiquetó con el epítomo FLAG (Sigma-Aldrich) en el extremo N-terminal añadiendo la secuencia de aminoácidos Met Asp Tyr Lys Ala Phe Asp Asn Leu (MDYKAFDNL) (SEC 1D N°.:18) mediante una PCR y, a continuación, se clonaron en el vector de transferencia pAchLT (BD Biosciences). También pueden utilizarse otros sistemas de vectores de transferencia Baculovirus como Baculodirect (Invitrogen) para este fin. La secuencia de aminoácidos del epítomo de hemaglutinina (HA) Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala (YPYDVPDYA; SEC ID N°.:19) se colocó en el mismo marco que el extremo 5' del AtCDKA mediante PCR y, a continuación, se clonó en el vector de transferencia pVL1393 (AB Vector, CA). La ciclina y la CDK se etiquetaron con epítomos para permitir su identificación por Western blot y para experimentos de inmunoprecipitación. La ciclina y/o la CDK también pueden utilizarse si no están etiquetadas. También pueden utilizarse otros sistemas de vectores de transferencia compatibles.

60

## Producción de virus recombinantes

[0143] El genoma del Baculovirus utilizado es el Baculogold Bright Baculovirus (BD Biosciences). También pueden utilizarse otros genomas del Baculovirus alternativos. La versión etiquetada de la AtciclinaD2;1 se introdujo en una región no esencial del genoma viral del baculovirus usando la recombinación homóloga. La recombinación homóloga ocurrió cuando el vector de transferencia que contiene la ciclina D2;1 fue co-transfectado con el ADN del Baculogold Bright Baculovirus de BD linealizado en células de insecto Sf9. Las células Sf9 se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células sobre una placa de laboratorio de 60 mm y se co-transfectaron transitoriamente con  $2 \mu\text{g}$  de un vector de transferencia de ciclina D2;1 (pAcHLT-ciclinaD2;1) más  $0,5 \mu\text{g}$  de ADN linealizado del Baculogold Bright Baculovirus de BD utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 conforme al protocolo del fabricante (Roche Diagnostics). Tras 4 horas de transacción, la solución de Fugene/ADN se retiró y sustituyó por 3 ml del medio TNM-FH. Cuatro (4) días después se recogió el sobrenadante y posteriormente se utilizó para infectar más células para la amplificación del virus. Esta amplificación se repitió hasta que el título del virus fue de  $10^9$  partículas de virus/ml por lo menos. El virus se amplificó infectando células Sf9 a una multiplicidad de infección (moi)  $< 1$ . El título del virus se controló por microscopía de luz y de fluorescencia.

[0144] La versión etiquetada con HA de la AtCDKA1 se introdujo en una región no esencial del genoma viral del baculovirus por recombinación homóloga. La recombinación homóloga ocurrió cuando el vector de transferencia que contiene ciclina D2;1 fue co-transfectado con el ADN linealizado del Baculogold Bright Baculovirus de BD en células de insecto Sf9. Las células Sf9 se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células sobre una placa de laboratorio de 60 mm y se co-transfectaron transitoriamente con  $2 \mu\text{g}$  del vector de transferencia de la AtCDKA (pVL1393-AtCDKA) más  $0,5 \mu\text{g}$  de ADN linealizado del Baculogold Bright Baculovirus de BD utilizando un reactivo de transfección Fugene 6 conforme al protocolo del fabricante (Roche Diagnostics). Tras 4 horas de transfección, la solución de Fugene/ADN se retiró y se sustituyó por 3 ml del medio TNM-FH. Cuatro (4) días después se recogió el sobrenadante y posteriormente se utilizó para infectar más células para la amplificación del virus. Esta amplificación se repitió hasta que el título del virus fue de  $10^9$  partículas de virus/ml por lo menos. El virus se amplificó infectando células ST9 a una multiplicidad de infección (MOI)  $< 1$ . El título del virus se controló por microscopía de luz y de fluorescencia.

## Producción de proteínas recombinantes en células de insecto

[0145] Producción de una proteína AtciclinaD2;1 etiquetada AtcyclinD2; se obtuvo infectando células Sf9 de *S. frugiperda* con el baculovirus de la AtciclinaD2;1. Para ello, se cultivaron células Sf9 en suspensión a una densidad de  $2 \times 10^6/\text{ml}$  y se infectaron con baculovirus recombinante a una MOI  $> 5$  (si bien otras MOI mayores o ligeramente mayores también funcionarán) durante 4-5 días y después se recolectaron. Las células se recolectaron y centrifugaron a 3000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . El sedimento celular se lavó con un medio nuevo y después se centrifugó a 3000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . El sedimento se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  o se lisó inmediatamente. La solución tampón de lisis consistió en 20 mM de HEPES a un pH 7,5, 20 mM de NaCl, 1 mM de BDTA, un 20 % de glicerol, 20 mM de  $\text{MgCl}_2$  más inhibidores de la proteasa (Complete Mini, sin BDTA, Boehringer Mannheim), 1 pastilla por cada 10 ml de solución tampón de lisis. El lisado celular se sonicó 2 veces en hielo durante 15 segundos. A continuación, el lisado proteico se centrifugó a 40.000 rpm en un rotor Beckman TLA 100.2 durante 2 horas. El sobrenadante que contiene la AtciclinaD2;1 etiquetada se alicuotó y congeló a  $-20^\circ\text{C}$ . La expresión se controló mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal M2 anti-Flag (Sigma-Aldrich).

[0146] La producción de AtCDKA etiquetada se realizó infectando células Sf9 de *S. frugiperda* con baculovirus de la AtCDKA y se procesó de la misma manera a la descrita anteriormente. La expresión se controló mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-RA (Babco). La expresión también puede controlarse por Western blot utilizando un anticuerpo anti-PSTAIR (Sigma-Aldrich).

[0147] Se preparó un complejo quinasa activo de AtciclinaD2;1/AtCDKA co-infectando células Sf9 de *S. frugiperda* con baculovirus de la AtciclinaD2;1 (MOI  $> 5$ ) más AtCDKA (MOI  $> 5$ ). El complejo activo se purificó según lo descrito anteriormente. La expresión de la proteína se controló por Western blot de extractos de células de insecto utilizando el anticuerpo M2 anti-Flag M2 o anticuerpo anti-HA. La interacción entre la AtciclinaD2;1 y la AtCDKA se controló por co-inmunoprecipitación tal como se describe infra.

## Ensayo de quinasa

[0148] Se desarrolló un ensayo in vitro para examinar la capacidad de varias moléculas de KRP/ICK de inhibir complejos de ciclina/CDK.

[0149] La actividad quinasa en extractos de proteínas de células de insecto infectadas con baculovirus individuales o una co-infección con los dos baculovirus se controló con un ensayo de quinasa estándar. La histona H1 (HHI) fue el sustrato principal utilizado si bien también podría haberse utilizado una proteína del retinoblastoma del tabaco

recombinante (Nt Rb) como sustrato (véase Koroleva et al., Plant Cell 16, 2346-79, 2004). Los ensayos de quinasa se realizaron de la siguiente manera: se añadieron 7 µg de un extracto de proteínas de células de insecto a un cóctel tampón de quinasa (KAB: 50 µM de Tris, pH 8,0, 10 µM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µM de ATP más 0,5 µ de Ci/ml <sup>32</sup>PγATP y 2 µg de HHI) hasta llegar a un volumen final de 30 µ. Las reacciones se incubaron a 27 °C durante 30 minutos. La reacción de la quinasa se detuvo al llegar a un volumen igual (30 µl) al de 2 tampones Laemmli. La incorporación del [<sup>32</sup>P] fosfato se controló por autorradiografía y/o con un Generador de Imágenes de Dinámica Molecular de Fósforo seguido de SDS-PAGE en geles al 12 %. También pueden utilizarse condiciones tampón alternativas para la realización de los ensayos de quinasa CDK. (Véase, por ejemplo, Wang y Fowke, Nature 386:451-452, 1997; Azzi et al., Eur. J. Biochem. 203:353-360,1992; Firpo et al., Mol. Cell. Biol. 14:4889-4901,1994).

[0150] Resultados: El extracto de proteínas de las células de insecto infectadas solo con AtciclinaD2;1 o solo con AtCDKA no mostró ninguna actividad quinasa cuando se utilizó HHI como sustrato. Las células de insecto co-infectadas con el virus AtaycLinD2;1 y con el virus AtCDKA contenían una fuerte actividad quinasa. Las quinasas activas tipo CDK (tipo cdc2) se pueden purificar también a partir de extractos de tejidos de proteínas de plantas o de extractos de células cultivadas de tejidos de plantas utilizando perlas de agarosa p13suc1 (véase Wang y Fowke, Nature 386:451-452, 1997; Azzi et al., Eur. J. Biochem. 203:353-360, 1992) y utilizar en un ensayo similar al arriba descrito y en experimentos de competición como los que se describen más abajo en los Ejemplos del 2 al 8.

Clonación de cADN de Krp en un vector de expresión bacteriano.

#### Clonación de AtKrp1

[0151] El cADN de AtKrp1 se clonó a partir del cADN de Arabidopsis mediante PCR utilizando los oligonucleótidos siguientes:

(inicio) 5' ATGGTGAGAAAATATAGAAAAGCT-3' (SEC ID N°.:20);

(final) 5'-TCACTCTAACTTTACCCATTCGTA-3' (SEC ID N°.:21).

El fragmento de la PCR resultante se subclonó en un vector pCRII-TOPO (Invitrogen). La AtKrp1 n°. 3S9 del vector resultante se secuenció para verificar la secuencia correcta con el n°. de GenBank U94772.

#### RACE de la clonación de la región 5' de la Krp1 de Brassica napus

[0152] Se utilizó el programa Blastn del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica para encontrar secuencias de Brassica homólogas a la SCD de la AtKRP1. La búsqueda identificó dos EST candidatos, el CD820320 y el CD829052, que resultó que eran secuencias idénticas. El CD820320 se obtuvo a través del blastx de Jorja para verificar que la secuencia de nucleótidos traducida del EST coincidía significativamente con la secuencia de la proteína AtKRP 1.

[0153] El CD829052 tiene 646 pb e incluye los 106 últimos aminoácidos de la secuencia de una KRP de Brassica oleracea y 321 pb de la 3'UTR. Se diseñó un cebador 5' RACE (GSP1brasskpl 5'RACE: 5'-CTCTGATAATTTAACCCACTCGTAGCGTCCTTCTAATGGCTTCTC -3'; SEC ID N°.:22) para recuperar una BnKRP1 de longitud completa. El cebador RACE contenía los 45 últimos nucleótidos de la secuencia de codificación del CD820320.

[0154] Se hizo un cADN listo para 5'RACE a partir de la hoja DH12075 de Brassica napus DH12075 utilizando el Kit de Amplificación de cADN SMART RACE (Clontech). La 5' RACE se realizó en este cADN conforme a las instrucciones del kit, excepto que se utilizó una enzima pfu y un tampón (Stratagene) en lugar de Klenotaq. Las condiciones para la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min., seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 5 seg., a 68 °C durante 10 seg., a 72 °C durante 3 min. El producto de la PCR resultante fue una banda muy débil de 600 pb aproximadamente. A continuación, se reamplificaron 2,5 µl de este producto de la PCR bajo las condiciones para la PCR antedichas. El producto de la PCR resultante se clonó en un vector TOPO Blunt (Invitrogen) y se transformó en células oro alfa. Se recuperó el ADN plasmídico de dos transformantes y los insertos secuenciados con cebadores M13 directos e inversos. La secuencia de un inserto candidato era idéntica al CD820320 y se le designó Bn KRP1-II (la RACE no proporcionó ninguna secuencia nueva adicional). La secuencia del otro inserto candidato, designado Bn KRP1-I, era un 94 % idéntica a la de la BnKRP1-II en el nivel de nucleótidos de la región de codificación, y un 86 % idéntica en el nivel de aminoácidos de los 106 últimos residuos. La RACE recuperó la secuencia de codificación completa de la BnKRP1-I con 108 pb adicionales de la 5'UTR en el vector TOPO Blunt (pTG313). A continuación se muestra la secuencia de codificación de la BnKrp1 (SEC ID N°.:23):



entonces por 0,5 M de Urea, 100 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl y 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol más 5 mM de benzamidina y se continuó durante 12 horas más. La proteína recombinante se recolectó y cuantificó mediante ensayo de Bradford y se guardó a 4 °C.

## 5 Mutagénesis de Krp.

[0158] Las versiones de tipo salvaje de los miembros de la familia de las AtKRP y de los miembros de la familia de las BNKRP4 se subclonaron en el vector básico PCRII-TOPO (Invitrogen) para fines de secuenciación y mutagénesis.

10 [0159] El mismo fragmento de la PCR de cADN de tipo salvaje de la AtKRP1 que contenía el sitio 5'-BamHI modificado y el sitio 3' XhoI (véase "Clonación de cADN de Krp en vector de expresión bacteriano", supra) se subclonó en un vector pCRII-TOPO (Invitrogen) para la mutagénesis. El vector Topo-AtKrp n°. 385B resultante contenía el cADN de tipo salvaje de la AtKRP1 y se verificó que la secuencia fuera correcta por secuenciación automática estándar. El mismo fragmento de ADN de tipo salvaje de la BnKRP1 de arriba se subclonó en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) para la mutagénesis. El vector Topo-BnKrp n°. 539 resultante contenía el cADN de tipo salvaje de la BnKRP1 y se verificó que la secuencia fuera correcta usando un análisis de secuenciación automática estándar.

20 [0160] La mutagénesis dirigida al sitio se realizó conforme al protocolo del kit para mutagénesis dirigida al sitio QuikChange de Stratagene.

[0161] Para construir la BnKrp1 n°. 462 con múltiples sustituciones de aminoácidos en la región de unión a la ciclina putativa (E129A, E130A, I131A, D132A) se utilizaron el BnKrp1DbleMut#1 de sentido (GAGA GCAACCACCAACGGCAGTGGCTGCTGCTGCTTTTTTCGTG; SEC ID N°.28) y el BnKrp1DbleMut#1b anti-sentido (CACGAAAAAAGCAGCAGCAGCCACTGCCGTTGGTGGT TGCTCC; SEC ID N°.29) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas. A continuación, el producto mutante se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC para obtener finalmente la BnKrp1 n°. 462.

30 [0162] Para construir la BnKrp1 n°. 512 con dos sustituciones de aminoácidos en los residuos altamente conservados de la región de unión CDK (F151A, F153A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1DbleMut#2 de sentido (CCTTCTAATGGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCT TGAA; SEC ID N°.30) y el oligonucleótido BuKrp1DbleMut#2b anti-sentido (TTCAAOAAG AAGTATAACGCTGATGCTGAAAAGGAGAAGCCAT TAGAAGG; SEC ID N°.31) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC. Las mismas sustituciones de aminoácidos se introdujeron en AtKRP1 utilizando un AtKrp1-Topo n°. 385B como plantilla y los oligonucleótidos siguientes: QC ICK1 scd F173A, F175A-codifica" 5'-TTCAAGAAGAAGTA CAATGCCGATGCCGAGAAGGAGAAGCCATTA-3'; (SEC ID N°.32) y "QC ICK1 scd F173A, F175A-no cod" 5'-TTATGGCTTCTCCTTCTGGGCATCGGCATTGTACTTCTTC TTGAA-3' (SEC ID N°.33).

45 [0163] Para construir la BnKrp1 n°. 463 con sustituciones de aminoácidos de la región de unión a la ciclina putativa y residuos altamente conservados en la región de unión a la CDK (E129A, E130A, I131A, D132A,+ F151A,F153A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1DbleMut#2 de sentido (CCTTCTAAT GGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEC ID N°.30) y el oligonucleótido BnKrp1DbleMut#2b anti-sentido (TTCAAGAAGAAGTATAACGCTGATGCTG AAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEC ID N°.32) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange con BnKrp n°. 462 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

55 [0164] Para construir la BnKrp1 n°. 586 con la sustitución de un solo aminoácido en la región de unión a la CDK (K148A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1p1K148A de sentido (GATAATTTCAAGAAG GCGTATAACTTTGATTTTC; SEC ID N°.34) y el oligonucleótido BnKrp1K148A anti-sentido (GAAATCAAAGTTATACGCCTTCTTGAATTATC; SEC ID N°.35) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

60 [0165] Para construir la BnKrp1 n°. 587 con la sustitución de un solo aminoácido en la región de unión a la CDK (Y149A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1Y149A de sentido (AATTTCAAGAAGAAG GCTAACTTTGATTTTCGAA; SEC ID N°.36) y el oligonucleótido BnKrp1Y149A anti-sentido (TTCGAAATCAAAGTTAGCCTTCTTCTTGAATT; SEC ID N°.37) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

5 [0166] Para construir la BnKrp1 n°. 588 con la sustitución de un solo aminoácido en la región de unión a la CDK (N150A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1N150A de sentido (TTCAAGAAGAAGTAT GCCTTTGATTTGAAAAG; SEC ID N°.38) y el oligonucleótido BnKrp1N150A anti-sentido (CTTTTCGAAATCAAAGGCATACTTCTTCTTGAA; SEC ID N°.39) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

10 [0167] Para construir la BnKrp1 n°. 572 con la sustitución de un solo aminoácido en la región de unión a la CDK (F151A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1F151A de sentido (AGAAGAAGTATAACGCTGATTTTCGGAAAGGA; SEC ID N°.40) y el oligonucleótido BnKrp1F151A anti-sentido (TCCTTTTCGAAATCAGCGTTATACTTCTTCT; SEC ID N°.41) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

15 [0168] Para construir la BnKrp1 n°. 573 con la sustitución de un solo aminoácido en la región de unión a la CDK (F153A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1F153A de sentido (AGTATAACTTTGATGCCGAAAAGGAGAAGCC; SEC ID N°.42) y el oligonucleótido BnKrp1F153A anti-sentido (GGCTTCTCCTTTTCGGCATCAAAGTTATACT; SEC ID N°.43) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

20 [0169] Para construir la BnKrp1 n°. 553 con sustituciones de dos aminoácidos en la región de unión a la CDK (KL157A; P158A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1KP->AA de sentido (GATTTTCGAAAAGGA GGCGGCATTAGAAGGACGCT; SEC ID N°.44) y el oligonucleótido BnKrp1KP->AA anti-sentido (AGCGTCCTTCTAATOCGCCCTCCTTTTCGAAATC; SEC ID N°.45) para una mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

25 [0170] Para construir la BnKrp1 n°. 554 con sustituciones de dos aminoácidos en la región de unión a la CDK (R162A; Y163A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1RY->AA de sentido (GCCATTAGAAGGA GCCGCCGAGTGGGTAAATT; SEC ID N°.46) y el oligonucleótido BnKrp1RY->AA anti-sentido (AATTTAACCCACTCGGCGGCTCCTTCTAATGGC; SEC ID N°.47) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

30 [0171] Para construir la BnKrp1 n°. 555 con sustituciones de dos aminoácidos en la región de unión a la CDK (E164A; W165A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1EW->AA de sentido (AGAAGGACGCTAC GCGGCGGTAAATTATCAGA; SEC ID N°.48) y el oligonucleótido BnKrp1EW->AA anti-sentido (TCTGATAATTTAACCGCCGCTAGCGTCCTTCT; SEC ID N°.49) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

35 [0172] Para construir la BnKrp1 n°. 556 con sustituciones de dos aminoácidos en la región de unión a la CDK (K167A; L168A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1KL->AA de sentido (CGCTACGAGTGGGT TGCAGCATCAGAGTGAGAGC; SEC ID N°.50) y el oligonucleótido BnKrp1KL->AA anti-sentido (GCTCTCACTCTGATGCTGCAACCCACTCGTAGCG; SEC ID N°.49) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 539 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

40 [0173] Para construir la BnKrp1 n°. 574 con sustituciones de múltiples aminoácidos en la región de unión a la CDK (F151A; F153A; E164A; W165A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1F151A, F153A (CCTTCTAATGGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEC ID N°.52) y el oligonucleótido F151A, F153A anti-sentido (TTCAAGAAGAAGTATAACOCTGATG CTGAAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEC ID N°.53) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con la BnKrp1 n°. 555 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

45 [0174] Para construir la BnKrp1 n°. 598 con sustituciones de múltiples aminoácidos en la región de unión a la CDK (Y149A; F151A; F153A) se utilizaron el oligonucleótido BnKrp1Y149A de sentido (AATTTGAAGAAGAAGGCTAACCTCTGATGCTGAA; SEC ID N°.54) y el oligonucleótido BnKrp1Y149A anti-sentido (TTCAGCATCAGCGTTAGCCTTCTTCTTGAAATT; SEC ID N°.55) para la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, con el TopoBnKrp n°. 512 como plantilla. El producto de la mutagénesis se secuenció para verificar la presencia de mutaciones deseadas y, a continuación, se subclonó en el sitio BamHI/XhoI del pET16b-5MYC.

- 5 [0175] Para construir la BnKrp1 n° 547, se utilizaron los dos oligonucleótidos siguientes para amplificar el cADN de la BnKrp1 al que le faltaban los dos últimos aminoácidos del extremo C-terminal, a saber, Ser y Glu que añaden un sitio 5'BamHI/NdeI y un sitio de restricción XhoI en el extremo 3' de la BnKrp1 (5' BamHI/NdeI de la BnKrp1:c ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEC ID N°.:26) y 3' BnKrp1SE>parada XhoI: CTCGAGTCAAGCAGCTAATTTAACCCACTCGTA (SEC ID N°.:56). El fragmento de la PCR se amplificó de pTG al n°. 313 (Topoll BnKrp1) y se subclonó en los sitios BamHI y XhoI del pET16b-5myc y se secuenció. El vector BnKrp n° 547 resultante contenía el cADN de tipo salvaje de la BnKrp1 en el marco con las etiquetas 6XHis y myc.
- 10 [0176] Para construir la BnKrp1 n° 614, se utilizaron los dos oligonucleótidos siguientes para amplificar el cADN de la BnKrp1 que le faltaba todo el dominio de unión a la CDK. 5'BnKrp1 BamHI/NdeI: ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEC ID N°.: 26) y la 3' BnKrp1[Delta]cdk: CTCGAGTCACTTCTTGAAATTATC (SEC ID N°: 57) que contiene un sitio XhoI. El fragmento de la PCR se amplificó de pTG al n°. 420 (Topoll BnKrp1) y se subclonó en Topoll (Invitrogen) y se secuenció. El fragmento BamHI/XhoI se subclonó entonces en pET16b-5myc. El vector BnKrp n°. 614 resultante contenía el cADN de la BnKrp1 al que le faltaba la secuencia de codificación de la región de unión a la CDK en el marco con las etiquetas 6XHis y myc.
- 15

### Ejemplo 2. Homología de aminoácidos entre el p27 de mamíferos <KIP1> y las KRP de plantas.

- 20 [0177] La familia CIP1/KIP1 de CKI utiliza dos regiones de contacto para unirse e inhibir el complejo quinasa. En base a este modo de unión e inhibición, si se alteran las capacidades de unión de una de estas dos regiones se podría obtener una proteína negativa dominante capaz de interactuar todavía con el complejo (a través del dominio intacto), no inhibir más la actividad quinasa e interferir en el CKI de tipo salvaje para que no inhiba un complejo ciclina/CDK activo. Por ejemplo, si la región de unión a la ciclina se hiciera no funcional, la proteína mutante todavía interactuaría a través de la región de unión a la CDK con el complejo quinasa a través del dominio de interacción. De manera similar, si la región de unión a la CDK se hiciera no funcional, la proteína mutante seguiría interactuando con el complejo quinasa a través de la región de unión a la ciclina.
- 25
- 30 [0178] La familia AtKrp de los CKI comparte homología por toda la proteína, estando la mayor homología en los últimos 40 a 45 aminoácidos del extremo C-terminal (véase Wang et al., Nature 386:451-452, 1997; Wang et al., Plant J. 15:501-510, 1998; Lui et al., Plant J. 21:379-385, 2000; De Veylder et al., Plant Cell 13:1653-1667, 2001; Jasinski et al., Plant Physiol. 130:1871-1882, 2002; Zhou et al., Plant Cell Rep. 20:967-975, 2002; Zhou et al., Plant J. 35:476-489, 2003). Sin embargo, solo los últimos 23 aminoácidos aproximadamente de la familia de las Krp muestra homología con el p27<sup>KIP1</sup> de los mamíferos (véase la Figura 1).
- 35
- 40 [0179] Se realizaron experimentos de unión in vitro para ayudar a dilucidar las interacciones de unión entre una KRP representativa, a saber la BnKRP1, y la AtciclinaD2;1 y la AtCDKA. Las interacciones de unión de otros miembros de la familia de las KRP también pueden dilucidarse mediante los mismos experimentos de unión in vitro descritos abajo. Los experimentos de unión in vitro utilizando versiones mutantes de la BnKrp1 que contienen sustituciones de aminoácidos de aminoácidos altamente conservados en la región de unión a la CDK revelaron que solo esta región era necesaria para la unión a la CDK, mientras que la unión a la Atciclina permanecía aún intacta. Y lo que es más importante, un dominio de unión a la CDK intacto es absolutamente necesario para la inhibición del complejo AtciclinaD2/CDKA. Los aminoácidos que se encuentran inmediatamente antes de la región de unión a la CDK, en una región que los presentes inventores proponen que es la región de unión a la ciclina, se conservan entre los miembros de la familia de las KRP (véase la Figura 1) pero no en el p27<sup>KIP1</sup>. La mutación de varios residuos conservados dentro de este dominio de unión a la ciclina propuesto deroga la interacción con la AtciclinaD2;1, mientras que la interacción con la AtCDKA permanece intacta. Es interesante que este mutante putativo de la región de unión a la ciclina siga inhibiendo el complejo quinasa AtciclinaD2/CDKA pero, aún así, no de manera tan eficaz como la KRP1 de tipo salvaje. La concentración inhibitoria que reduce la actividad quinasa en un 50 % (IC<sub>50</sub>) fue de 0,035 µg para la KRP1 de tipo salvaje (BnKrp n°. 461) mientras que la IC<sub>50</sub> del mutante de unión a la ciclina (BnKrp n°. 462) fue de 1,25 µg.
- 45
- 50 [0180] Observaciones similares se apreciaron con la contraparte del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos (véase Vlach et al., EMBO J. 16:5334-44,1997). La IC<sub>50</sub> del mutante de unión a la ciclina del p27<sup>KIP1</sup> aumentó en comparación con el p27<sup>KIP1</sup> de tipo salvaje. Por contra, sin embargo, altas concentraciones del mutante de unión a la CDK del p27<sup>KIP1</sup> todavía eran capaces de inhibir el complejo quinasa. Esto quizás pueda explicarse por la presencia de la hélice 310 en el p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos que se encuentra ausente en las Krp de las plantas (véase una explicación en el ejemplo 3).
- 55
- 60 [0181] Estos datos indican que en las KRP hay dos regiones que son similares a la contraparte del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos que es la responsable de la interacción con el complejo quinasa activo. Es interesante que el mutante del dominio de ciclina todavía pudiera inhibir el complejo quinasa, lo que sugiere que la región de unión a la CDK era la principal responsable de la inhibición quinasa del complejo ciclina/CDK. De manera similar, la región de unión a la ciclina del p27<sup>KIP1</sup> jugó un papel adicional en la inhibición de los complejos de CDK activos. Aún así, estos resultados

ilustran que a diferencia del p27<sup>KIP1</sup>, la región de unión a la CDK de la KRP1 juega un papel más significativo en la inhibición de la quinasa.

5 [0182] Por lo tanto, el enfoque en la alta homología entre la familia de las KRP y el p27<sup>KIP1</sup> en los residuos de la región de unión a la CDK se alterará para crear, en última instancia, una molécula de BnKRP1 dominante negativa que todavía puede unirse al complejo, interferir en la BnKRP1 de tipo salvaje para que no inhiba el complejo quinasa y aún así no inhiba el propio complejo.

10 Ejemplo 3. Estructura de la proteína p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos en un complejo con ciclina/CDK utilizado para identificar aminoácidos clave que entran en contacto con la CDK que se conservan en las KRP de las plantas.

15 [0183] Para facilitar el diseño de las moléculas de las Krp dominantes negativas que en última instancia interferirán en la función de las KRP de tipo salvaje se utilizó la estructura anteriormente publicada del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos en un complejo con el complejo quinasa ciclina A-CDK2 (véase Russo et al., Nature 382:325-331, 1996). La información estructural junto con la información sobre la alineación se combinó para identificar los aminoácidos clave que cuando se cambiaron por alanina o por otros residuos de aminoácidos resultaron en una proteína con características negativas dominantes. Estas características dominantes son las siguientes: 1) la Krp mutante se une a complejos de ciclina/CDK, 2) la proteína mutante no inhibe sustancialmente la formación del complejo ciclina/CDK incluso a altas concentraciones y 3) la proteína mutante debería competir sustancialmente con la molécula de la KRP de tipo salvaje por unirse a los complejos ciclina/CDK. In vivo, las Krp mutantes que cumplen estas características resultarán en una actividad quinasa del complejo ciclina/CDK elevada en la célula que, en última instancia, llevará a un aumento de la proliferación celular y a un mayor índice mitótico.

25 [0184] La actividad quinasa del complejo ciclina A/CDK2 de mamíferos se puede suprimir por completo mediante la unión del p27<sup>KIP1</sup>. El mecanismo por el cual el p27<sup>KIP1</sup> inhibe el complejo quinasa de ciclina A/CDK2 ha demostrado ser un proceso complejo (véase Russo et al., supra). El p27<sup>KIP1</sup> hace uso de dos elementos para inhibir el complejo de quinasa activo. El primer componente para la inhibición incluye la hélice 310 del p27<sup>KIP1</sup> que aparentemente no se conserva en ninguna de las familias de KRP de los CKI. La hélice 310 se introduce por sí misma en la hendidura catalítica de la quinasa para emular el sustrato de ATP. La ocupación de esta región hendida por parte de la hélice 310 bloquea de manera efectiva la unión del ATP y la actividad quinasa. No obstante, incluso en ausencia de la hélice 310, el p27<sup>KIP1</sup> seguía siendo capaz de inhibir el complejo quinasa (véase Polyak et al., Cell 78:59-66, 1994).

35 [0185] La comparación entre la estructura cristalina del p27<sup>KIP1</sup> unida al complejo ciclina A/CDK2 y al complejo quinasa por sí solo ilustró que el lóbulo N-terminal de la CDK2 sufre cambios conformacionales al unirse al p27<sup>KIP1</sup> (véase Russo et al., supra). De hecho, algunas láminas β específicas que se encuentran dentro del lóbulo N-terminal de la quinasa que normalmente ayudan a coordinar el ATP en el sitio activo se pierden tras una unión al p27<sup>KIP1</sup>. La unión del p27<sup>KIP1</sup> induce un repliegado que afecta a los residuos de horquilla β, hebra β y a una hélice 310 del p27<sup>KIP1</sup> y a los aminoácidos de las láminas del lóbulo N-terminal de la CDK2 que se repliegan para formar un sándwich β intermolecular (véase id.). Este cambio de conformación es capaz por sí solo de inhibir significativamente la actividad quinasa del complejo ciclina A/CDK2. Los residuos que se encuentran dentro del p27<sup>KIP1</sup> que forman este sándwich β se conservan altamente en todos los miembros de la familia de los p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos y también se conservan bien en todos los miembros de la familia las KRP. Conforme a los resultados descritos en el Ejemplo 1, y a la falta de una hélice 310 conservada, la región de unión a la CDK conservada de los miembros de la familia de las KRP, presumiblemente une el complejo quinasa activo e inhibe la actividad quinasa a base de inducir cambios conformacionales en el lóbulo N-terminal de la quinasa AtCDKA. Sin embargo, no se puede descartar que otra región de la KRP emule realmente la unión al ATP por inserción en la hendidura catalítica tal como lo hace la hélice 310 en el p27<sup>KIP1</sup> de los mamíferos.

50 [0186] Los 23 últimos aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la familia de las KRP son los que muestran la mayor identidad de aminoácido al p27<sup>KIP1</sup> de los mamíferos (véase la Figura 1). Varios residuos conservados en la BnKRP1 que fueron cambiados sistemáticamente en base a la identidad de secuencia al p27<sup>KIP1</sup>, desempeñan un papel en la formación del sándwich β entre el CKI y el complejo quinasa. Cada mutante fue comparado con la BnKRP1 de tipo salvaje (BnKrp#461) en cuanto a su capacidad de inhibir el complejo quinasa. En algunos casos, también se observó la capacidad de la BnKrp1 de unirse a la AtciclinaD2;1 o a la AtCDKA. Los resultados de estos experimentos se resumen más adelante en la Tabla 2.

[0187] Las mutaciones se introdujeron tal como se describe en detalle en el Ejemplo 4, Polipéptidos mutantes CKI de KRP".

60 [0188] En el extremo más N-terminal de la región que se une a la CDK reside el motivo Lys Tyr Asn Phe Asp Phe (KYNFDF) (SEC ID N°.58). Este motivo se conserva altamente en los miembros de la familia de las KRP tanto de la especie Arabidopsis como de la Brassica napus. La mayoría de estos residuos se conserva en el p27<sup>KIP1</sup>. En el p27<sup>KIP1</sup> forman una porción de una curva de una horquilla β que en última instancia forma el sándwich β con la CDK2 en el complejo ciclina A-CDK2. Cada uno de los residuos conservados se cambiaron por alanina y se ensayó su

capacidad de inhibir el complejo quinasa (véase la Tabla 2). Muchas de las mutaciones por sustitución de aminoácidos no afectaron a la capacidad de inhibir el complejo quinasa in vitro. No obstante, la BnKrp1 n°. 587 y la BnKrp1 n°. 572, mostraron resultados interesantes. En cada caso, la inhibición de la quinasa se atenuó en comparación con la proteína de tipo salvaje lo que sugiere que esta región de la KRP1 desempeña un papel en la inhibición de la quinasa.

[0189] Las cadenas laterales de las dos fenilalaninas 62 y 64 presentes en el p27<sup>KIP1</sup> que entran en contacto con la CDK2, desempeñan un papel integral en la formación del sándwich  $\beta$  y se conservan en la KRP1. (Véase Figura 1). Dado que la actividad inhibitoria del F151A de la Krp1 (BnKrp1 n°. 572) se vio parcialmente comprometida, las dos fenilalaninas 151 y 153 se cambiaron por alanina. Este doble mutante, BnKrp1 n°. 512, ya no inhibía el complejo quinasa a pesar de su capacidad de seguir uniéndose al complejo quinasa a través de la ciclinaD2;1. Puede que aún haya alguna unión residual de este mutante a la porción CDK del complejo.

[0190] La tirosina 149 de la KRP1 no se conserva en el p27<sup>KIP1</sup>; sin embargo, se encuentra en la posición N-terminal de la horquilla  $\beta$  que entra en contacto con la CDK2 y forma parte del sándwich  $\beta$ . La tirosina 149 se conserva altamente en miembros de la familia de las KRP de Arabidopsis and Brassica. Cuando la tirosina 149 se cambió por alanina (BnKrp1 n° 587), la actividad inhibitoria se vio parcialmente comprometida, lo que sugiere que desempeña un papel importante en la unión y/o inhibición del CDKA. Por lo tanto, la mutación de esta posición (Y149A) puede combinarse con el doble mutante F151A; F153A de la Krp1. Se esperaba que este triple mutante retuviera su unión al complejo quinasa al tiempo que perdía la capacidad de inhibir la actividad quinasa.

[0191] La región del extremo C-terminal al motivo KYNFDF (SEC ID N°.:58) de la KRP1 también contiene varios aminoácidos que se conservan en el p27<sup>KIP1</sup>. (Véase Figura 1). Muchos de estos residuos se conservan en la hebra  $\beta$  del p27<sup>KIP1</sup> que forma una porción del sándwich  $\beta$ . Varios de estos aminoácidos conservados se cambiaron en pares por alanina (véase un resumen en la Tabla 2). En todos los casos menos en uno, la función inhibitoria no se vio significativamente perjudicada. La excepción fue el mutante de la Krp1 n°. 545 (E164A;W165A) que era un inhibidor mucho más débil que la KRP1 de tipo salvaje. El triptófano 165 extiende su cadena lateral hasta el interior del sándwich  $\beta$ . Las fenilalaninas 151, 153 y E164 y W165 se cambiaron todas por alanina (Krp1 n°. 574). Esta BnKrp1 mutante compuesta tampoco pudo inhibir el complejo quinasa, ni siquiera cuando se utilizó a altas concentraciones.

[0192] El truncamiento de toda la región de unión a la CDK de la KRP1 también fue incapaz de inhibir el complejo quinasa. Esto no causó sorpresa ya que se había eliminado toda la región responsable de unir la CDK. Sin embargo, creemos que es probable que dicho truncamiento resulte en una proteína inestable.

#### Ejemplo 4. Polipéptidos CKI de KRP mutantes.

[0193] Como mejora respecto a técnicas anteriores utilizadas para silenciar la expresión de genes a nivel ARN post-transcripcional, se ha conseguido la supresión de miembros de la familia de las KRP en plantas a nivel proteína utilizando una estrategia negativa dominante. El principio básico de la estrategia negativa dominante es modificar un gen para producir una proteína mutante que impide que las copias normales de la misma proteína realicen su función. En este caso, la proteína KRP normal forma un complejo de múltiples subunidades con el complejo ciclina/CDK para desactivar la actividad quinasa. Por lo tanto, la expresión de una versión mutante de la KRP1 de tipo salvaje, interferirá en las copias normales de la KRP1 de modo que no puedan inhibir la actividad quinasa del complejo ciclina/CDK. Además, dado el alto grado de homología entre los 7 miembros de la familia de las KRP Brassica, la Krp1mutante se comportará como negativa dominante hacia otros miembros de la familia o posiblemente todos los miembros de la familia. Finalmente, las regiones de unión a la ciclina y a la CDK de las KRP se conservan bien en otras especies de plantas. Por lo tanto, esta Krp1 negativa dominante protegerá a los complejos quinasa del complejo ciclina/CDK contra la inhibición por parte de KRP endógenas en otras plantas tales como, por ejemplo, maíz, trigo, Canola, soja, arroz, algodón, chopo y análogos.

[0194] Anteriormente, los mutantes negativos dominantes se utilizaban para ayudar a elucidar varias vías de transducción de señales. En concreto, en el caso de las Ras negativas dominantes, la GTPase es la proteína negativa dominante más utilizada a nivel general hasta la fecha y ha desempeñado un papel importante en la estrategia utilizada para estudiar otras GTPases (Feig y Cooper, Mol. Cell. Biol. 8:3235-3243, 1988). De forma parecida, las versiones negativas dominantes de las CDK se utilizaron para identificar funciones para las CDK en el control del ciclo celular (van den Heuvel y Harlow, Science 262:2050-2054, 1993).

[0195] La familia de CKI KIP/CIP difiere de la familia de inhibidores INK en cuanto al mecanismo que utilizan para inhibir el complejo quinasa. Mientras que la familia INK solo se une a la CDK, la familia CIP/KIP tiene dos regiones conservadas que se unen a la ciclina y a la CDK de forma independiente. El hecho de que la familia de CKI CIP1/KIP1 y la familia de las KRP de los CKI utilicen dos regiones de contacto para unirse al complejo las convierte en un candidato ideal para la estrategia negativa dominante. Esto es así porque la región de unión a la CDK puede

dirigirse a mutantes que abolen la interacción con la CDK al tiempo que mantienen intacta la región de la KRP1 que se une a la ciclina.

[0196] En la presente invención, se han clonado las moléculas de las KRP de la Canola, *Brassica napus* (Bn), KRP y berros de oreja de ratón *Arabidopsis thaliana* (At) y se ha confirmado su capacidad de inhibir la actividad del complejo ciclina/CDK. [0148] Se desarrolló un ensayo in vitro para examinar la capacidad de varias moléculas de KRP/ICK de inhibir complejos de ciclina/CDK. [0142] Las secuencias de cADN de la ciclina de *Arabidopsis D2;1* (AtciclinaD2;1) y del CDKA de *Arabidopsis* (AtCDKA) se etiquetaron con epítomos y se clonaron en un vector de transferencia Baculovirus (BD Biosciences). AtCiclinaD2;1 se etiquetó con el epítomo FLAG (Sigma-Aldrich) en el extremo N-terminal El epítomo de hemaglutinina (HA) se colocó en el mismo marco que el extremo 5' de la AtCDKA. La producción de la proteína AtciclinaD2;1 se obtuvo infectando células Sf9 de *S. frugiperda* con el baculovirus de la AtciclinaD2;1. La producción de AtCDYA se obtuvo infectando células Sf9 de *S. frugiperda* con el baculovirus de la CDKA. Se obtuvo un complejo activo de ciclina D2;1/CDKA coinfectando Sf9 de *S. frugiperda* Sf9 con el baculovirus de AtciclinaD2;1 más el de AtCDKA. La ciclina, la CDK y el complejo activo se purificaron y se ensayó la actividad quinasa. La actividad quinasa se verificó mediante un ensayo de quinasa estándar con Histona HI (HHI) como sustrato o mediante una NtRb recombinante (Nakagami et al., *Plant Cell* 14:1847-1857, 2002). Las células de insecto infectadas con ciclina D2;1 no produjeron ningún complejo activo. De forma similar, las células infectadas con CDKA no produjeron quinasa activa. Cuando las células se infectaron con ambas, la Atciclina D2;1 y la AtCDKA, la actividad quinasa pudo detectarse fácilmente. Los complejos activos de ciclina/CDK también pueden purificarse a partir de extractos de tejidos de proteínas de plantas o de extractos de células cultivadas de tejidos de plantas utilizando perlas de agarosa p13suc1 ((Wang et al., *Plant J.* 15:501-510, 1998).

[0197] Las Krp se diseñaron de modo que contuvieran una etiqueta de epítomo de poli-histidina N-terminal (etiqueta HIS) subclonando el cADN de la Krp en el mismo marco que la secuencia de codificación de la etiqueta HIS en el vector pET16b (Novagen). La expresión de la proteína Krp de tipo salvaje y mutante se indujo en bacterias y posteriormente se purificó como una proteína de fusión de la etiqueta HIS utilizando Ni-agarosa.

[0198] Todas las Krp de *Brassica napus* (Bn) de tipo salvaje ensayadas (BnKRP1, BnKRP4, BnKRP5) resultaron extremadamente efectivas a la hora de inhibir el complejo de ciclina D2;1/CDKA. En todos los casos, la inhibición también era sensible a la dosis. Otras muchas AtKrps (AtKRP1, AtKRP2) de *Arabidopsis* también resultaron ser inhibidores efectivos.

[0199] La familia CIP1/KIP1 de CKI utiliza dos regiones de contacto para unirse e inhibir el complejo quinasa. En base a este modo de unión e inhibición, la alteración de las capacidades de unión de una de estas dos regiones podría resultar potencialmente en una proteína mutante con características negativas dominantes. Por ejemplo, si a la región de unión a la ciclina se le hiciera no funcional, la proteína mutante todavía interactuaría a través de la región de unión a la CDK con el complejo quinasa a través del dominio intacto. De manera similar, si a la región de unión a la CDK se le hiciera no funcional, la proteína mutante seguiría interactuando con el complejo quinasa a través de la región de unión a la ciclina.

[0200] Los miembros de la familia de las ICK/KRP tienen una identidad de aminoácido limitada a la familia del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos. La identidad está limitada a los últimos 24 a 30 aminoácidos del extremo C-terminal. De hecho, la ubicación del dominio de unión a la ciclina/CDK del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína mientras que la región homóloga en las Krp de plantas se encuentra en la última porción del extremo C-terminal de la proteína. (Véase la Figura 1, en la que se muestra la alineación del p27<sup>KIP1</sup> y distintos miembros de la familia de las KRP). La región de unión a la ciclina dentro del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos no se conserva en las KRP de las plantas. Aún así, la región inmediatamente antes de la región de unión a la CDK putativa se conserva en todas las KRP de plantas. Esta región conservada aunque no homóloga al p27<sup>KIP1</sup> podría ser la responsable de la interacción con la ciclina. Las sustituciones de aminoácidos de varios residuos en esta región de unión a la ciclina propuesta de la BnKRP1 (aminoácidos 125-138) abolen la unión a la ciclina pero no afecta a la unión a la CDK. Estos datos sugieren que existen dos regiones en las KRP similares a la contraparte del p27<sup>KIP1</sup> de mamíferos que median la interacción con el complejo quinasa activo. Es interesante que la mutación de la región de unión a la ciclina no aboliera completamente la inhibición del complejo quinasa, lo que sugiere que la región de unión a la CDK es la principal responsable de la inhibición quinasa de la ciclina/CDK.

[0201] Dado el alto grado de homología entre las regiones de unión a la CDK de los CKI de plantas y mamíferos, se utilizó la estructura cristalina del p27<sup>KIP1</sup> unida al complejo ciclina A/CDK2 para ayudar a identificar los residuos de contacto del p27<sup>KIP1</sup> que se unen a la ciclina y a la CDK (Russo et al., *Nature* 382:325-331, 1996). Los residuos de contacto se compararon con varias secuencias de KRP para determinar si estaban conservados en la región con la mayor homología al p27<sup>KIP1</sup>. En el último extremo N-terminal de la región de unión a la CDK se encuentra el motivo LysTyrAsnPheAspPhe (KYNFDF) (SEC ID N°.:588). La mayoría de estos residuos se conserva en el p27. Forman una lámina  $\beta$  que entra en contacto con la CDK2 del complejo ciclina A-CDK2.

[0202] Cada uno de los residuos conservados se cambió por alanina y se ensayó su capacidad de inhibir el complejo quinasa. Es interesante que muchas de estas mutaciones por sustitución de un solo aminoácido no afectaran la capacidad de inhibir el complejo quinasa in vitro. No obstante, los mutantes Krp1 F151A y Krp1 Y149A sí redujeron la actividad de los CKI sin que ello afectara a la unión al complejo quinasa.

5 [0203] Dado que las cadenas laterales de las dos fenilalaninas 151 y 153 entran en contacto con el F151A de la CDK y de la Krp1, la actividad inhibidora se vio parcialmente comprometida y las dos fenilalaninas 151 y 153 fueron sustituidas por alanina. Este doble mutante de la BnKrp1 (F151A; F153A de la BnKrp1) ya no inhibe más el complejo quinasa a pesar de su capacidad de unirse al complejo quinasa a través de la ciclinaD2;1. No puede descartarse que es posible que aún quede alguna unión residual de este mutante a la porción CDK del complejo.

10 [0204] La tirosina 149 presente en la Krp1 no se conserva en el p27<sup>KIP1</sup>, si bien en el modelo estructural del p27 de mamíferos existe un residuo de aminoácido similar en la posición de la lámina β que entra en contacto con la CDK2. Cuando se cambió por alanina (Krp1Y149A), la actividad inhibidora se vio parcialmente comprometida, lo que sugiere que este residuo de aminoácido desempeña un papel importante en la unión y/o inhibición del CDKA. Así, la mutación de esta posición (Y149A) combinada con el doble mutante F151A; F153A de la Krp1 produjo una proteína variante que ya no inhibía el complejo quinasa. Se espera que este triple mutante (Y149A; F151A; F153A de la BnKrp1) todavía retenga la unión al complejo quinasa al tiempo que no pueda inhibir la actividad quinasa.

15 [0205] Como arriba, las sustituciones de Y149A y F151A con un solo aminoácido de manera individual redujeron la capacidad del polipéptido mutante de la BnKrp1 de inhibir el complejo quinasa. Se espera que el doble mutante Y149A; F151A de la BnKrp1 produzca una proteína mutante que ya no siga inhibiendo el complejo quinasa.

20 [0206] La región del extremo C-terminal al motivo KYNFDF (SEC ID N°.:58) de la KRP1 también contiene varios aminoácidos que se conservan en el p27<sup>KIP1</sup>. Estos aminoácidos conservados se cambiaron en pares por alanina. En todos los casos menos en uno, la función inhibidora no se vio significativamente perjudicada. La excepción fue el mutante E164A;W165A de la Krp1 que era un inhibidor mucho más débil que la KRP1 de tipo salvaje. En una proteína derivativa independiente, las fenilalaninas 151, 153 y E164 y W165 fueron todas sustituidas por alanina. Este múltiple mutante de la BnKrp1 tampoco pudo inhibir el complejo quinasa.

25 [0207] El truncamiento de toda la región de unión a la CDK de la KRP1 también fue incapaz de inhibir el complejo quinasa. Esto no fue sorprendente ya que se había eliminado toda la región responsable de unir la CDK.

30 [0208] Los resultados de la evaluación de la actividad biológica de varios mutantes de la BnKrp1 se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Actividad biológica de los mutantes de la BnKrp1

Número de construcción	Mutación de kip	Unión a la ciclina	Unión a la CDK	Inhibición de la actividad quinasa	¿Negativo dominante?'
461	BnKRPI de tipo salvaje	+++	+++	+++	N/A <sup>2</sup>
586	K14SA de la BnKrp1	ND <sup>3</sup>	ND	+r+	N/A
587	Y149A de la BnKrp1	ND	ND	++	-
588	N150A de la BnKrp1	ND	ND	+++	N/A
572	F151A de la BnKrp1	+++	+/-	++	-
por determinar	D152A de la BnKrp1	ND	ND	ND	N/A
573	F153A de la BnKrp1	ND	ND	+++	N/A
512	F151 A; F153A de la BnKrp1	+++	-	-4	++++
598	Y149A; F151A; F153A de la BnKrp1	ND	ND	**	+++++
553	K157A;PL5SA de la BnKrp1	ND	ND	+++	N/A
554	R162AY163A de la BnKrp1	ND	ND	++	-
555	E164AW165A de la BnKrp1	ND	ND	-4	++
574	F151A; F15A; E164A; W165A de la BnKrp1	++	~	-4	++
556	KL-AA de la BnKrp1	ND	ND	ND	ND
547	SE-parada de la BnKrp1	ND	ND	+++	N/A

<sup>1</sup> Protección del complejo quinasa contra la inhibición por parte de la BnKrp1 de tipo salvaje.

40

<sup>2</sup>N/A significa no aplicable.

<sup>3</sup> ND significa no determinado

<sup>4</sup> el candidato no inhibió la actividad quinasa ni siquiera cuando se utilizó en una cantidad hasta 10 veces mayor que la cantidad mínima de inhibidor de tipo salvaje necesaria para abolir la actividad quinasa.

5

[0209] Tal como se ha mencionado anteriormente, la alteración del dominio de unión a la ciclina resultó en una proteína Krp1 mutante que todavía mantiene alguna actividad inhibidora. No obstante, probablemente existen otros aminoácidos dentro de la región de unión a la ciclina putativa (aminoácidos 125-138) que pueden alterarse para crear una proteína mutante que cumple las características negativas dominantes opcionales. Además, aunque en todas las sustituciones de estos estudios particulares se utilizó alanina, se espera que la sustitución de los residuos de aminoácido identificados por otro residuo de aminoácido distinto de la alanina que difiera significativamente en una o más propiedades físicas (otras sustituciones no conservadoras) también proporcionará una proteína negativa dominante. En particular, se espera que la sustitución de un residuo de aminoácido particular por un aminoácido de carga opuesta o con un residuo de aminoácido con una característica de definición sustancialmente diferente, tal como un residuo hidrófilo con un residuo hidrófobo y viceversa, y análogos, proporcionará un candidato negativo dominante incluso mejor.

10

15

[0210] El candidato negativo dominante ideal no inhibirá la actividad quinasa ni siquiera cuando se utilice en una cantidad 10 veces mayor que la cantidad mínima de inhibidor de tipo salvaje necesaria para abolir la actividad quinasa. Varios mutantes satisficieron este requisito (véase la Tabla 2). La importancia de esta característica radica en el hecho de que cuando se expresa in vivo, los niveles de la proteína mutante pueden ser niveles en exceso en comparación con la proteína de tipo salvaje.

20

[0211] Las moléculas negativas dominantes de la BnKrp1 identificadas en este estudio protegen de manera efectiva al complejo ciclinaD2;1/CDKA contra la inhibición de la BnKRP1 de tipo salvaje. La misma molécula de la Krp1 derivativa negativa dominante también protege al complejo quinasa contra la inhibición por parte de las moléculas de otras especies tales como maíz, soja, arroz, algodón, chopo y alfalfa (véase el Ejemplo 7).

25

Ejemplo 5. Proteína BnKrp1 mutante que bloquea competitivamente la proteína CKI de tipo salvaje contra la inhibición del complejo quinasa.

30

[0212] Los candidatos negativos dominantes especialmente útiles no inhibirán la actividad quinasa ni siquiera cuando se utilicen en una cantidad 10 veces mayor que la cantidad mínima de inhibidor de tipo salvaje necesaria para abolir la actividad quinasa. Varios mutantes satisficieron este requisito (véase la Tabla 2, Figura 1 y Ejemplo 2). La importancia de esta característica radica en el hecho de que cuando se expresa in vivo, los niveles de la proteína mutante pueden ser niveles en exceso en comparación con la proteína de tipo salvaje y es importante que la proteína mutante no inhiba sustancialmente el complejo quinasa a prácticamente ninguna concentración.

35

[0213] Se ensayó la capacidad de varios candidatos negativos dominantes de proteger al complejo ciclinaD2;1/CDKA contra la BnKRP1 de tipo salvaje. Los experimentos de competición se realizaron de la manera siguiente. El complejo quinasa de ciclinaD2;1/CDKA activo (7 µg) se preincubó con mutantes candidatos negativos dominantes de la BnKrp1 (5 µg o 10 µg) durante 20 minutos en 1X tampón de quinasa. A continuación se ensayó la actividad quinasa del complejo en ausencia o después de la adición de una BnKrp1 de tipo salvaje (0,5 µg, 1,0 µg o 2 µg) utilizando HHI como sustrato. Las reacciones quinasa se resolvieron entonces mediante SDS PAGE tal como se describe en el Ejemplo 1, "Ensayo de quinasa". Los resultados se cuantificaron con un Generador de Imágenes de Fósforo (Dinámica molecular).

40

45

[0214] Los F151A; F153A de la BnKrp1 (BnKrp1 n°. 512) fueron capaces de proteger el complejo quinasa contra su inhibición por parte de la BnKRP1 de tipo salvaje. 5 µg de F151A; F153A de la BnKrp1 recuperaron hasta un 40 % de la actividad quinasa en presencia de 0,6 µg de KRP1 de tipo salvaje. Este efecto negativo dominante era sensible a la dosis. Se recuperó hasta un 60 % de la actividad quinasa cuando se utilizaron 10 µg de F151A; F153A de la BnKrp1.

50

[0215] El mutante BnKrp1 n°. 555 (E164A; W165A) es un candidato negativo prometedor ya que tampoco pudo inhibir la actividad quinasa cuando se utilizó en una cantidad de 10 µg por reacción. En experimentos competitivos, este mutante protegió al complejo quinasa activo contra la inhibición por parte de la KRP1 de tipo salvaje pero solo recuperó un 14 % de actividad cuando se utilizaron 5 µg y un 15 % cuando se utilizaron 10 µg. Las mutaciones de las BnKrp1 n°. 512 y BnKrp1 n° 555 se combinaron en una proteína mutante denominada BnKrp1 n°. 574 (F151A, F153A, E164A, W165A). Este mutante compuesto no pudo inhibir la actividad quinasa por sí mismo en cantidades de 5 µg y 10 µg. Este mutante compuesto fue capaz de proteger al complejo quinasa contra la inhibición por parte de la BnKRP1 de tipo salvaje pero solo pudo recuperar un 35 % de la actividad como máximo. La BnKrp1 mutante n°. 598 (Y149A; F151A; F153A) fue capaz de proteger al complejo quinasa contra la inhibición por parte de la BnKRP1 de tipo salvaje. 5 µg de F151A; F153A de la BnKrp1 recuperaron hasta un 55% de la actividad quinasa en presencia

55

60

de 0,6 µg de KRP1 de tipo salvaje. Este efecto negativo dominante era sensible a la dosis. Se recuperó hasta un 80% de la actividad quinasa cuando se utilizaron 10 µg de Y149A;F151A;F153A de la BnKrp1.

[0216] Estos datos sugieren que la región óptima a la que dirigir un negativo dominante es la región de la horquilla β. Sin embargo, no se puede alterar cualquier residuo. Muchas sustituciones con un solo aminoácido no consiguieron crear una Krp negativa dominante (véase el Ejemplo 3) pero, de hecho, cambiar demasiados residuos conservados también resultó en un mutante que satisface la mayoría de los requisitos. La AtKrp2 es la que está más relacionada con la BnKrp1 y la AtKrp1. La AtKrp2 mutante donde el motivo KYNFDF (SEC ID N°.:58) se cambió a KAAAAA (SEC ID N°.:59) tenía las prometedoras características de una molécula de la Krp negativa dominante. A altas concentraciones, este mutante de la BnKrp2 no pudo inhibir el complejo quinasa como se esperaba. Es interesante que este mutante no pudiera proteger a la quinasa contra la inhibición por parte de la BnKRP1 de tipo salvaje.

[0217] En resumen: Los F151A; F153A de la BnKrp1 bloquearon a la KRP de tipo salvaje para que no pudiera inhibir la quinasa, E164A de la Krp1; el W165A no era tan bueno a la hora de bloquear la KRP de tipo salvaje mientras que la BnKrp1 (Y149A;F151A;F153A) fue el mejor candidato negativo dominante en los ensayos de competición in vitro. La BnKrp1 de doble mutante (Y149A;F151A) también es probable que sea capaz de proteger al complejo quinasa contra la inhibición.

[0218] Tal como se ha mencionado anteriormente, la alteración del dominio de unión a la ciclina resultó en una proteína Krp1 mutante que retuvo alguna actividad inhibidora. No obstante, existe la posibilidad de que otros aminoácidos puedan ser alterados para crear una proteína mutante que cumpla todas las características negativas dominantes. Además, la alanina fue el aminoácido elegido para todas las sustituciones. En muchos de los mutantes presentados, la sustitución del residuo por un aminoácido no conservativo podría resultar en un candidato negativo dominante incluso mejor.

Ejemplo 6. Los F151A; F153A de la BnKrp1 y los Y149A; F151A; F153A de la BnKrp1 se comportan como negativos dominantes ante otros miembros de la familia de las KRP de Brassica napus.

[0219] Uno de los objetivos generales de la estrategia negativa dominante era introducir una mutación en un solo miembro de la familia de las KRP que se comporta como negativo dominante no solo hacia su contraparte de tipo salvaje sino también hacia todos los miembros de su familia. La alineación de la familia de las KRP de los CKI en Brassica napus y en Arabidopsis ilustra la alta identidad de secuencia que yace en el extremo C-terminal de la proteína. Se han presentado datos arriba que demuestran que la región conservada justo N-terminal al dominio de unión a la CDK es la responsable de unir ciclinas. Además, varios grupos han presentado datos de cribado de doble híbrido que ilustra que varias moléculas de KRP tienen una especificidad superpuesta para la unión a la ciclina.

[0220] La BnKRP4 difiere de la BnKRP1 en la horquilla β. Entre la BnKRP1 y la BnKRP4 se conserva la Phe 151, sin embargo el F153 de la BnKRP1 es una prolina en la BnKRP4. Esto no es necesariamente una sustitución de aminoácidos conservadora y sugiere que la BnKRP4 puede interactuar con el complejo ciclina/CDKA de manera diferente a la BnKRP1. Sin embargo, ya ha quedado demostrado que esta posición dentro del dominio de unión a la CDK no parece tener un papel significativo en la inhibición de ciclina/CDKA (mutante n°. 573 de la BnKrp1, véase el Ejemplo 1).

[0221] La BnKRP4 se clonó utilizando los dos oligonucleótidos siguientes para amplificar el cADN de la BnKRP4 a base de añadir un sitio 5' BamHI/NdeI y un sitio de restricción XhoI en el extremo 3' de la BnKrp4-1 (5' BamHI/NdeI de la BnKrp4 : GGATCCCATATGGGA AAATACATAAAG (SEC ID N°.:60) y 3' XhoI de la BnKrp4-1: CTCGAGCTAATCATCTACCTTCTT (SEC ID N°.:61). El fragmento de la PCR se amplificó del pTG al n°. 315 (TopoII BnKrp4-1) y se subclonó en los sitios BamHI y XhoI del pET16b-5myc y se secuenció. El vector BnKrp n° 605 resultante contenía el cADN de tipo salvaje de la BnKrp1 en el mismo marco que las etiquetas 6XHis y myc. La proteína se expresó y purificó según lo descrito en el Ejemplo 1.

[0222] La BnKrp4 es un potente inhibidor del complejo quinasa AtcyclinD2;1/CDKA con una CI<sub>50</sub> muy parecida a la de la BnKRP1 de tipo salvaje. Se realizaron experimentos de competición según lo descrito en el Ejemplo 4. En este caso, la BnKrp1 n°. 512 (F151A;F153A) y BnKrp1 n°. 598 (Y149A;F151A;F153A) fueron capaces las dos de proteger el complejo quinasa contra la inhibición por parte de una BnKRP4 de tipo salvaje. En base a esta observación, se espera que la BnKrp1 n°. 512 y la BnKrp1 n°. 598 se comporten como negativas dominantes con respecto a la mayoría, si no todos, los miembros de la familia de las BnKRP.

Ejemplo 7. F151A de la BnKrp1. El F153A y los Y149A; F151A; F153A de la BnKrp1 se comportan como negativos dominantes con respecto a las Krp de otras especies de plantas.

[0223] El objetivo general de la estrategia negativa dominante era introducir una o más mutaciones en un solo miembro de la familia de las KRP que no solo se comporta como negativo dominante con respecto a sus miembros de la familia de tipo salvaje sino también contra los miembros de la familia de las KRP a través de distintas especies

de plantas. Las plantas de cultivo de interés de la presente invención incluyen, entre otras, soja, canola, maíz, trigo, alfalfa, arroz, cultivos de hortalizas tales como tomate, e incluso árboles, tales como el chopo.

[0224] La secuencia de nucleótidos de la AtKRP1 (GenBank n°. U94772) se utilizó para realizar una búsqueda tBLASTn para las secuencias de KRP del maíz, soja, chopo, tabaco y arroz. Varios EST cortos mostraron una alta homología limitada a los dominios de unión a la ciclina/CDK. Varias de estas secuencias cortas se alinearon e ilustran la conservación de esta región a través de varias especies de plantas. (Véase Figura 2)

[0225] En el maíz, una entrada particular, n°. de acceso al Genbank AY986792 contenía un marco de lectura abierto de 573 pb, que codifica una proteína de longitud completa con alta densidad a varios miembros de la familia de las KRP de Bn. A esta proteína se le denominó ZmKRP4 pero no es necesariamente el homólogo del maíz de la BnKRP4 o la AtKRP4. Al igual que con la BnKRP4, la ZmKRP4 difiere de la BnKRP1 en la horquilla β. La Phe 151 se conserva entre la BnKRP1 y la BnKRP4 y la ZmKRP4. No obstante, el F153 de la BnKRP1 era una prolina tanto en BnKRP4 como en ZmKRP4. La ZmKRP4 se amplificó a partir del cADN obtenido del ARN total aislado de mazorcas maduras de maíz. La secuencia del oligonucleótido se sacó del n°. de acceso al Genbank AY986792. 5'BamHI/NdeI de la ZmKRP4: GGATCCCATATGGGCAAGTACATGCGC (SEC ID N°.62) y 3'BamHI de la ZmKRP4: GGATCCTCAGTCTAGCTTACCCA (SEC ID N°.63). El producto de la PCR se subclonó en el TOPOII (Invitrogen) y se secuenció. Para el producto proteico de la ZmKRP4, se clonó el fragmento BamHI de 573 pb en el sitio BamHI del vector pET16b-5Myc y la orientación del inserto se determinó por cartografía de la enzima de restricción. La proteína recombinante se produjo según lo descrito en el Ejemplo 4.

[0226] De forma similar en la soja, una entrada particular, n°. de acceso al Genbank AY439104 contenía un marco de lectura abierto de 499 pb, que codifica una proteína de longitud completa con alta densidad a varios miembros de la familia de las KRP de Bn. Esta proteína, denominada GmKRP2-2, es prácticamente idéntica a la BnKRP1 que se encuentra dentro de la horquilla β. La GmKRP2-2 se amplificó a partir del cADN obtenido del ARN total aislado de plántulas de soja jóvenes en desarrollo. Los oligonucleótidos fueron designados a partir de la secuencia del n°. de acceso al Genbank AY439104: GmKRP2-2 5'XhoI/NdeI: ctcgaggacatatggagatggctcaggttaaggca (SEC ID N°.64) y 3'XhoI de la GmKRP2-1: ctcgagtcaactgaaccactcgtatcgtcc (SEC ID N°.65). El producto de la PCR se subclonó en el TOPOII (Invitrogen) y se secuenció. Para la expresión de la proteína GmKRP2-2, se clonó el fragmento XhoI de 499 pb en el sitio XhoI del vector pET16b-5Myc y la orientación del inserto se determinó por cartografía de la enzima de restricción. La proteína recombinante se produjo según lo descrito en el Ejemplo 4.

[0227] Se ensayó la capacidad tanto de la ZmKRP4 como de la Gm Krp2-2 de inhibir un complejo quinasa de ciclinaD2;1/CDKA recombinante. La ZmKRP4 resultó ser un potente inhibidor del complejo quinasa con una  $CI_{50}$  muy parecida a la de la BnKRP1 de tipo salvaje, 0,035 µg. De forma similar, la GmKrp2-2 también resultó ser un potente inhibidor del complejo quinasa. Las dos BnKrp1 negativas dominantes (BnKrp1 n°. 512 y n°. 598) fueron capaces de bloquear la ZmKRP4 y la GmKrp2-2 para que no inhibieran el complejo quinasa. En cada caso, la protección fue comparable a la protección que el BnKrp1 n°. 512 proporcionó en cuanto a la inhibición de la BnKRP1. Este resultado ilustra el efecto de las especies cruzadas de la Krp negativa dominante de la presente invención.

[0228] Los experimentos también sugieren que el BnKrp n°. 5X2 y el BnKrp n°. 598 tendrán un efecto similar en otros miembros de la familia de las KRP de especies cruzadas tales como los del arroz, trigo, sorgum, caña de azúcar, remolacha azucarera, y análogos. Las moléculas de las KRP de estas especies de plantas, junto con otras, se pueden clonar, expresar como proteínas recombinantes y evaluar en estudios similares para demostrar que el BnKrp1 n°. 512 y el BnKrp1 n°. 598 tienen un efecto similar en estos miembros de la familia.

#### Ejemplo 8. Mutación paralela en moléculas de KRP de otras especies de plantas que resulta en moléculas negativas dominantes.

[0229] Los residuos cambiados en BnKRP1 para producir el efecto negativo dominante se conservan en varios miembros de familias de KRP en Canola, maíz, soja, arroz, alfalfa, chopo, tabaco, y análogos. La sustitución de fenilalaninas conservadas en residuos de alanina puede realizarse en varias KRP de estas plantas de cultivo y ensayar su capacidad de comportarse como moléculas negativas dominantes.

[0230] El F151 y el F153 se conservan en algunas pero no todas las KRP de Canola, soja, maíz. La mutación de estos residuos conservados en las KRP de soja y maíz resultará en una molécula de la Krp negativa dominante similar.

#### Ejemplo 9. Plantas transgénicas de canola que expresan construcciones de transgenes diseñadas para conferir una expresión específica a los embriones y constitutiva de la Krp1 (F151a;F153a).

[0231] En base a los resultados in vivo presentes en los ejemplos anteriores, se prevé que la expresión de la invención en células de plantas cultivadas o en plantas transgénicas aumente la actividad quinasa de la CDK endógena. Este aumento de la actividad quinasa de la CDK tendrá una influencia positiva en el ciclo celular. La invención se clonó en un vector de expresión de plantas. Un vector de expresión de plantas contiene un promotor

nativo o no nativo relacionado con la invención arriba descrita. Los promotores pueden oscilar entre fuertes, débiles, inducibles, específicos a los tejidos, específicos a los órganos y específicos al desarrollo.

5 [0232] El equivalente de las mutaciones de la BnKrp1 (F151A; F153A) se introdujo en la AtKRP1 utilizando los oligonucleótidos siguientes: "QC AtKrp1 scd F173A;F175A-codifica" 5'-TTCAAGAAGAAGTACAATGCCGATGCCGAGAAGGAGAAGCCATTA-3' (SEC ID N°.:66) and "QC AtKrp1 scd F173A;F175A-no cod" 5'-TTATGGCTTCTCCTTCTGGGCA TCGGCATTGTACTTCTTCTTGAA-3' (SEC ID N°.:67). Se utilizó el AtKrp n°. 359 como plantilla utilizando un kit para mutagénesis dirigida al sitio Quikchange de Stratagene. La F173A; F175A de la AtKrp1 (pTG356) se confirmó por secuenciación. El promotor LFAH12 se insertó en el extremo 5' de la AtKrp1 mutante (F173A; F175A) en la pTG 356 en dos pasos. Primero, el promotor LFAH12 de Sall y PstI de pCAMBIA 2381Z (pTG 254) se subclonó en pBluescript II (Stratagene) en los sitios Sall y PstI, lo que resultó en una pTG 357. A continuación, el promotor LFAH12 se cortó de la pTG 357 utilizando PstI y BamHI y se insertó en la pTG 356 con lo que se obtuvo una pTG 361. Finalmente la pTG 361 se digirió con KpnI y NotI, pLAY112 se digirió con NotI y BglII (componente no traducido mas3') y el pCGN 1547 se digirió con KpnI y BamHI y se realizó una ligadura de 3 vías. Esto resultó en una cassette sin traducir LFAH12-AtICK1 cds DN-mas 3' (pTG 369).

20 [0233] El vector de expresión de la planta que contiene la BnKrp1(F151A; P153A) bajo el control del promotor constitutivo 35S se construyó de la manera siguiente. El fragmento BamHI/XhoI que contiene la scd de la BnKrp1 (F151A; F153A) se clonó en pTG 271 (35S/TOPO romo) utilizando los mismos sitios. La construcción resultante (pTG529) se cortó con KpnI y XbaI. pLAY112 se cortó con XbaI y HindIII y pCGN1547 se cortó con KpnI y HindIII y se realizó una ligadura de 3 vías. Esto resultó en una cassette sin traducir 35S-BnKrp1 (F151A;F153A)-mas3 (pTG533).

25 Transformación de la Canola (*Brassica napus*)

[0234] La variedad de canola doble haploide DH12075 se transformó con las construcciones de expresión del transgén de la AtKrp1 (F173A;F175A) LFAH-12 y de la BnKrp1 (F151A; F153A) 35-S (también denominadas de manera general en este Ejemplo "construcciones de expresión del transgén de la Krp1 mutante") utilizando un método de transformación mediado por *Agrobacterium* basado en el de Maloney et al. (Maloney et al., *Plant Cell Reports* 8:23 8, 1989).

35 [0235] Las semillas esterilizadas se germinaron en [1/2] medio de MS (Murashige & Skoog) con un 1 % de sacarosa en placas de Petri de 15 X 60 mm Petri durante 5 días con unas 40 a 60 semillas por placa aproximadamente. Se germinaron un total de 1500 semillas aproximadamente para cada construcción de transformación. Las semillas no se sumergieron del todo en el medio de germinación. Las plántulas germinadas se cultivaron en una sala de cultivo de tejidos a 25 °C, según un ciclo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

40 [0236] Los cotiledones se cortaron justo por encima del meristemo apical sin obtener nada del tejido del meristemo. Esto se hizo sujetando con cuidado los dos peciolos con fórceps justo por encima de la región del meristemo apical. Se procuró no aplastar los peciolos con el fórceps. Utilizando las puntas del fórceps como guía, los peciolos se cortaron utilizando un escalpelo de hoja fina del n°. 12. Los cotiledones se pusieron en una placa de 15 mm X 100 mm con un medio de co-cultivo. Si los cotiledones están bien cortados, se separan fácilmente. En caso de no hacerlo, existe la posibilidad que se hubiera obtenido el tejido meristemático y no hubiera utilizar dichos cotiledones. Cada placa tenía 20 cotiledones aproximadamente. Los explantos de los cotiledones se inocularon con *Agrobacterium* después de que hubiera unas cuantas placas preparadas para evitar el marchitamiento que tendría un impacto negativo en las fases siguientes del protocolo.

50 [0237] Las construcciones de expresión del transgén de la Krp1 mutante se introdujeron en electroporación con *Agrobacterium tumefaciens*. El *Agrobacterium* que albergaba las construcciones de expresión del transgén de la Krp1 mutante se cultivaron en un medio AB con los antibióticos apropiados durante dos días agitando a 28 °C. Para inocular los explantos de los cotiledones, se añadió un pequeño volumen de cultivo de *Agrobacterium* en una placa de Petri de 10 mm x 35 mm. El peciolo de cada explanto se sumergió en el cultivo de *Agrobacterium* y el extremo cortado se colocó en un medio de co-cultivo en una placa de Petri. Las placas se sellaron y se colocaron en una sala de cultivo de tejidos a 25 °C, según un ciclo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad durante 3 días.

55 [0238] Pasados los 3 días, los explantos se transfirieron, normalmente en grupos, a placas de Petri de 25 mm x 100 mm nuevas que contenían un medio de inducción de brotes. Este medio contenía un agente de selección (20 mg/l de Kanamicina) y una hormona (4,5 mg/l de BA). Solo se transfirieron los explantos que tenían un aspecto saludable. Los explantos se mantuvieron en el medio de inducción de brotes durante un período de 14 a 21 días. Durante este tiempo pudieron observarse callos verdes y, posiblemente algunos brotes desarrollados y algunos brotes no transformados. Los brotes no transformados podían reconocerse fácilmente por su color blanco y púrpura. Los brotes sensibles a la kanamicina se retiraron a base de cortarlos y todos los callos con un aspecto saludable fueron transferidos a placas nuevas con un medio de inducción de brotes. Los explantos se mantuvieron en estas plantas otros 14 a 21 días.

[0239] Pasadas 2 ó 3 semanas, los brotes que tenían un color verde oscuro se transfirieron a placas que contenían un medio de alargamiento de brotes. Este medio contenía un agente de selección (20 mg/l de Kanamicina) pero no contenía ninguna hormona. A cada placa se transfirieron cinco brotes. Las placas se sellaron y se volvieron a llevar a la sala de cultivo de tejidos. Los brotes transformados con un aspecto vítreo fueron transferidos a un medio de alargamiento de brotes que contenía floroglucinol (150 mg/l). Los brotes saludables y verdes se volvieron a poner en las placas con el medio de alargamiento de brotes. En algunos casos hubo que hacer varias transferencias de los brotes vítreos a placas nuevas con el mismo medio para obtener brotes de aspecto normal.

[0240] Los brotes con una morfología normal fueron transferidos a tarros de comida para bebés de 0,11 l con un medio de enraizamiento que contenía 0,5 mg/l de ácido indol butírico. Todo callo sobrante se cortó al transferir los brotes a los tarros. Los brotes podían mantenerse en los tarros de manera indefinida si se transferían a tarros nuevos con 0,2 mg/l de ácido indol butírico cada 6 semanas aproximadamente.

[0241] Una vez formado un buen sistema de raíces, los brotes de generación T<sub>0</sub> se sacaron de los tarros, se quitó el agar de las raíces y la plántula se transfirió a tierra para macetas. Cada plántula T<sub>0</sub> independiente representa una ocurrencia de inserción del transgén independiente en el genoma de la canola y se le denomina evento. Sobre la plántula se colocó una taza transparente durante algunos días, lo que permitía que la planta se aclimatara al entorno nuevo. Una vez que la planta se hubo endurecido, se retiró la taza. A continuación se dejó madurar a los eventos transgénicos T<sub>0</sub> en el invernadero y se recolectaron las semillas T<sub>1</sub>.

#### Caracterización de eventos T<sub>0</sub>

[0242] El número de loci del sitio de inserción de los transgenes se determinó en cada evento mediante un análisis Southern. La expresión del transgén de la Krp1 mutante en los eventos T<sub>0</sub> se verificó mediante un análisis Northern o una RT-PCR de punto final. Los datos de la expresión del transgén de la Krp1 mutante se obtuvieron para un solo punto temporal en el desarrollo de los embriones, 19 días después de la polinización (DAP). A partir de estos datos se concluyó que, en este punto temporal del desarrollo, el promotor LFAH12 estaba motivando altos niveles de mRNA de la AtKrp1 (P173A; F175A). La expresión del transgén de la BnKrp1 (F151A; F153A) 35S se controló en muestras de hojas que tenían un nivel de expresión de moderado a alto en muchos eventos. Los datos de expresión demostraron que los dos promotores eran funcionales a la hora de motivar la expresión del transgén de la Krp1 mutante en plantas transgénicas de canola.

[0243] La actividad quinasa también se puede medir para determinar el efecto en la expresión de la proteína Krp1 mutante en la actividad quinasa endógena del complejo ciclina-CDK. Cantidades equivalentes de extractos de proteínas de los tejidos o células de plantas transgénicas o no transgénicas se enriquecen para la CDK utilizando resina p13Suc1 (Upstate, Chicago, IL) y se realizan ensayos de quinasa con Histona según lo descrito en el Ejemplo 4 o por Wang et al., Plant J. 15:501-510, 1998 . Las reacciones quinasa se resuelven mediante SDS-PAGE y la fosforilación de HHI cuantificada por un Generador de Imágenes de Fósforo.

[0244] Se generaron plantas T<sub>0</sub> con éxito para las dos construcciones de expresión de transgenes de la Krp1 mutante. Las construcciones ensayadas incluían (a) LFAH12/AtKrp1(F173A; F175A); (b) 35S BnKrp1(F151A; F153A).

#### Ejemplo 10. La expresión in vivo acelera el crecimiento/germinación temprana

[0245] La expresión de las proteínas mutantes de la presente invención en plantas transgénicas ejercerá sus efectos elevando la actividad quinasa del complejo ciclina-CDK. Esto tendrá una influencia impulsadora positiva en el ciclo celular que en última instancia resulta en órganos de mayor tamaño. En las plantas, la reducción de los niveles de expresión de la Krp1 suprimiendo la expresión de un gen de la Krp endógeno en el embrión utilizando un enfoque de repeticiones invertidas lleva a un aumento del tamaño de las semillas y del rendimiento de los cultivos. Además de tener un efecto en el rendimiento, un aumento del tamaño de las semillas puede resultar en un mayor vigor de las semillas. Las semillas más grandes contienen una mayor cantidad de reservas de proteínas y almidón almacenadas a utilizar durante la germinación y el crecimiento de las plántulas. Esto puede resultar en una germinación más temprana y en un crecimiento temprano más rápido. La germinación temprana y el crecimiento rápido temprano son características agronómicas valiosas ya que llevan a un establecimiento más rápido del cultivo. Esto aumenta las posibilidades de éxito del cultivo al reducir la ventana de vulnerabilidad a duras condiciones ambientales y similares que pueden dañar o arruinar un cultivo antes de su establecimiento.

[0246] Se observaron una mayor velocidad de crecimiento y desarrollo en las plántulas germinadas en invernadero de plantas transgénicas de canola transformadas con la construcción de expresión negativa dominante de la AtKrp1 (F173A; F175A) (pTG369) descrita en el Ejemplo 9. Se plantaron veinticuatro semillas de quince eventos de transformación independientes de la construcción de expresión negativa dominante de la AtKrp1 (F173A;F175A) en palets de turba Jiffy en bandejas y se germinaron en un invernadero. En paralelo se plantaron veinticuatro semillas de cada uno de los quince eventos independientes transformados en el gen de la KRP1 de tipo salvaje, también bajo

el control del promotor LFAH12. Adicionalmente, al mismo tiempo se plantaron la variedad de canola DH12075 madre sin transformar y un total de 135 eventos transgénicos transformados con cualquiera de las nueve construcciones de transgenes no relacionadas.

5 [0247] Tras tres semanas de crecimiento, todas las plántulas fueron transplantadas a un campo para crecer a partir de semillas. Cada juego de veinticuatro plántulas para cada evento se plantó en una parcela individual. En el momento del trasplante pudieron observarse claras diferencias de crecimiento entre las plántulas entre las parcelas. Entre toda la población de plántulas para todas las construcciones de transgenes, el tamaño varió de 1 pulgada a  
10 unas 4 ó 5 pulgadas de altura. El progreso del desarrollo también varió, de unas pocas plántulas que solo tenían cotiledones a plántulas con varias hojas verdaderas. Las parcelas con la variedad madre no transformada caería en medio de este rango. Las diferencias en las parcelas transgénicas eran específicas a las construcciones. La mayoría de las parcelas del campo que contenían plántulas en el extremo superior del rango de tamaño y desarrollo eran parcelas que contenían plantas transformadas con la construcción de expresión negativa dominante de la AtKrp1 (F173A; F175A) (pTG369). Otras construcciones no mostraron esta característica y la mayoría de las parcelas presentaban un crecimiento y desarrollo comparable a o menor que la variedad madre no transformada. Estos resultados indican que la expresión de un transgén de la Krp mutante negativa dominante confiere una mayor  
15 velocidad de crecimiento temprano y una velocidad de desarrollo acelerada.

[0248] Otras características a supervisar incluyen, por ejemplo, la duración de la pre-emergencia/germinación, el tiempo de emergencia del cotiledón, el tamaño del cotiledón, el tiempo en salir la primera hoja verdadera y la salida de la segunda hoja verdadera. El diámetro de la roseta también se puede controlar en plantas transgénicas y no transgénicas. También pueden controlarse otras características entre las plantas transgénicas y no transgénicas que incluyen, por ejemplo, el tiempo de emergencia de la yema y el tamaño del enrollado de la yema, el tamaño final del racimo principal, el momento de salida de la primera flor, el momento de la primera aparición de la vaina, y análogos.

25 Ejemplo 11. La expresión in vivo ofrece un mayor enraizamiento.

[0249] Las semillas de canola son muy pequeñas, necesitan una humedad relativamente alta para la germinación y se deben plantar cerca de la superficie del suelo para maximizar el vigor de las plántulas. Unas semillas pequeñas y una plantación poco profunda hacen que el cultivo sea vulnerable a las agresiones abióticas tales como un terreno seco e inundaciones. La expresión ubicua o expresión temprana en el desarrollo de las raíces de los polipéptidos mutantes de la presente invención bajo el control de varios promotores daría como resultado un crecimiento y desarrollo acelerado de las raíces. Un aumento de la división celular durante el desarrollo de las raíces beneficiará al vigor de las plántulas al establecer antes una base firme para las raíces y posiblemente una base para las raíces mayor que en el caso del control de plantas no transgénicas. El tamaño del sistema de raíces de las plantas transgénicas se puede comparar con el de las plantas no transgénicas.

40 Ejemplo 12. Evaluación del efecto de la expresión del transgén de la AKrp1 (F173A;F175A) durante el desarrollo de los embriones en el rendimiento de la canola en pruebas de campo repetidas.

[0250] En este ejemplo las plantas transgénicas de canola que comprenden el transgén de la Krp1(F173A;F175A) de Arabidopsis bajo el control del promotor específico para embriones LFAH12 (pTG369) se ensayaron en pruebas de campo.

45 Avance de eventos transgénicos en la AtKrp1(F173A;F175A) en ensayos de campo.

[0251] Se seleccionaron eventos  $T_0$  para el avance en ensayos de campo basados en una combinación de expresión de transgenes y el número de locus de inserción del transgén. A los eventos con la expresión del transgén verificada y un solo locus de inserción del transgén se les otorgó la prioridad más alta para avanzar al ensayo de campo. En algunos casos, se seleccionaron eventos con múltiples loci de inserción si la presencia de múltiples genes dio un alto nivel de expresión transgénica general debido a la dosificación de genes.

[0252] Se cultivaron semillas  $T_1$  de eventos seleccionados a modo de segregación de poblaciones  $T_1$  en las parcelas del campo. Cada evento se plantó a modo de veinticuatro parcelas de plantas en dos filas. En los eventos con un solo locus de inserción de transgenes, la segregación del transgén entre las veinticuatro plantas  $T_1$  producirá una distribución de aproximadamente seis plantas nulas a las que les falta el transgén, doce plantas heterocigóticas y seis plantas homocigóticas. Cada planta  $T_1$  se introdujo individualmente en una bolsa antes de la floración para evitar la polinización. Las semillas  $T_2$  de cada una de las veinticuatro plantas  $T_1$  se recolectaron por separado.

60 [0253] Las semillas  $T_2$  se utilizaron para identificar cuáles de las veinticuatro plantas madre  $T_1$  eran nulas, heterocigóticas u homocigóticas. Aproximadamente treinta semillas  $T_2$  de cada planta  $T_1$  se germinaron sobre papel filtrante en placas de Petri con una solución que contenía el antibiótico G418, un análogo de la kanamicina. Dado que las plantas se co-transformaron en el gen de resistencia nptII como marcador seleccionable, solo aquellas semillas portadas del transgén serían las que germinarían y continuarían creciendo. Si quedara probado que todas

las semillas de una placa eran sensibles al G418, a la planta madre T<sub>1</sub> se le identificaría entonces como una línea nula. Si todas las semillas de una placa eran sensibles al G418, a la planta madre T<sub>1</sub> se le identificaría entonces como una línea nula. Si aproximadamente un cuarto de las semillas de una placa fuera sensible y el resto resistente, a la planta madre T<sub>1</sub> se le identificaría como una planta heterocigótica. Las semillas T<sub>2</sub> de plantas madre T<sub>1</sub> homocigóticas del mismo evento de transformación se agruparon para generar semillas homocigóticas para el ensayo de las pruebas de campo. Las semillas T<sub>2</sub> de plantas madre T<sub>1</sub> nulas del mismo evento de transformación se agruparon para generar semillas gemelas nulas para el ensayo de las pruebas de campo.

Diseño de la prueba de campo

[0254] El efecto del transgén de la AtKrp1(F173A;F175A) en las características de rendimiento de las líneas de canola transgénicas se evaluó comparando cada línea transgénica directamente con su gemela nula en el campo en pruebas repetidas a gran escala. Dado que la gemela nula surge de la segregación del transgén en la generación T<sub>1</sub>, las gemelas nulas y homocigóticas son casi idénticas genéticamente. La única diferencia significativa es la presencia o ausencia del transgén de la AtKrp1(F173A;F175A). Esta identidad casi genética convierte a la gemela nula en el control óptimo para la evaluación del efecto del transgén de la AtKrp1(F173A;F175A). Dado que el objetivo principal de la prueba era la comparación de la línea transgénica de un evento con su segregante nulo, se eligió un diseño de parcelas divididas. Este diseño proporciona un alto nivel de evaluación a la interacción entre las subparcelas transgénicas y no transgénicas y las diferencias entre las subparcelas transgénicas entre eventos (la interacción entre la subparcela y la parcela principal) y un menor nivel de evaluación a las diferencias entre eventos generales o la parcela principal.

[0255] Las pruebas de campo se llevaron a cabo en múltiples lugares a través de las provincias de las praderas para evaluar los fenotipos de rendimiento bajo el rango de condiciones ambientales en las que normalmente crece la canola. En todos los lugares, cada evento transgénico se emparejó físicamente con su gemela nula en parcelas adyacentes. Cada par de parcelas de las gemelas homocigóticas y nulas se repitió cuatro veces en cada lugar de las pruebas. Los lugares de los cuatro pares de parcelas repetidos en cada prueba se distribuyeron aleatoriamente en cada lugar de prueba. Las parcelas eran de 1,6 m por 6 m a una densidad de 142 semillas aproximadamente por metro cuadrado. Las plantas se cultivaron hasta la madurez siguiendo prácticas agronómicas estándar típicas de la producción comercial de la canola.

Ejemplo 13. Mayor rendimiento en la AtKrp1(F173A;F175A) que expresa la canola transgénica durante el desarrollo de embriones utilizando promotores específicos a embriones.

[0256] Todas las parcelas de cada lugar de prueba de campo de producción se recolectaron individualmente con una cosechadora. Los datos sobre la producción total de semillas se recogieron como el peso total de las semillas ajustado según el contenido de humedad de cada parcela. Para cada evento transgénico de cada prueba, la media de la producción total de las cuatro parcelas repetidas de cada línea homocigótica se comparó con la media de producción total de las cuatro parcelas repetidas de la línea gemela nula asociada. Esta comparación se utilizó para evaluar el efecto del transgén de la AtKrp1(F173A;F175A) en la producción total de semillas. Los resultados de cada uno de los múltiples lugares de prueba se combinaron para obtener un análisis entre pruebas del efecto del transgén de la AtKrp1(F173A;F175A) en la producción total de semillas. Los análisis estadísticos de la variación en cada lugar de prueba permitió la asignación de un valor umbral de significancia (P = 0,05) para las diferencias en la producción total de semillas entre líneas transgénicas homocigóticas y sus gemelas nulas.

[0257] Las líneas transgénicas de canola de la AtKrp1(F173A;F175A) que mostraron un aumento estadísticamente significativo en la producción total de semillas se resumen en la Tabla 3. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de la AtKrp1(F173A;F175A) utilizando un promotor específico para los embriones (AH12) resulta en un aumento de la producción de semillas.

Tabla 3. Cambio en la producción total de semillas en plantas de AtKrp1 (F173A; F175A) homocigóticas respecto a sus gemelas nulas. Todos los valores son estadísticamente significativos (P = 0,05)

Evento	Promotor	Transgén	% aumento producción
TG39-2	LFAH12	AtKrp1(F173A;F175A)	13,0
TG39-26	LFAP112	AtKrp1(F173A;F175A)	18,6
TG39-32	LFAH12	AtKrp1(F173A;F175A)	12,0

[0258] Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas en este documento se ofrecen a título meramente ilustrativo

1. Un polipéptido CKI de plantas mutante aislado que comprende:  
 una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje, en donde dicho polipéptido CKI de tipo salvaje comprende (a) una región de unión a la ciclina que confiere una afinidad de unión a una ciclina y (b) una región de unión a una CDK que confiere una afinidad de unión a una CDK;  
 en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido CKI de tipo salvaje, una afinidad de unión modificada del polipéptido CKI mutante a la CDK;  
 en donde el polipéptido CKI mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido CKI de tipo salvaje, una afinidad de unión a la ciclina; y  
 en donde el polipéptido CKI mutante puede competir con dicho CKI de tipo salvaje por unirse a la región de unión a la CDK.
2. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 1, en donde dicho polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje es un miembro de la familia de las proteínas relacionadas con KIP (KRP).
3. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 2, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido CKI de Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max), maíz, trigo, arroz, alfalfa, algodón o chopo.
4. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 2, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido de la KRP1 de Arabidopsis o Brassica.
5. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 2, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de una KRP1 de Brassica (BnKRP1).
6. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 5, que comprende al menos dos modificaciones dentro de la región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de una KRP1 de Brassica (BnKRP1).
7. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 5, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende una sustitución de aminoácidos.
8. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 7, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución de no alanina a alanina.
9. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 7, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución no conservadora.
10. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 7, que comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos, en donde cada sustitución de aminoácidos está en una posición independientemente seleccionada del grupo que consiste en:  
 (a) una posición correspondiente al aminoácido 145 de la BnKRP1;  
 (b) una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1;  
 (c) una posición correspondiente al aminoácido 151 de la BnKRP1;  
 (d) una posición correspondiente al aminoácido 153 de la BnKRP1;  
 (e) una posición correspondiente al aminoácido 164 de la BnKRP1;  
 (f) una posición correspondiente al aminoácido 165 de la BnKRP1;
11. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 10, en donde una o más, y opcionalmente todas, de entre las dos sustituciones de aminoácidos son sustituciones de no alanina a alanina.
12. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 10, en donde una o más, y opcionalmente todas, de entre las dos sustituciones de aminoácidos son sustituciones no conservadoras.
13. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 5, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro del motivo KYNFDF.
14. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 13, que comprende al menos dos modificaciones dentro del motivo KYNFDF.
15. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 14, en donde dichas dos modificaciones que hay por lo menos dentro del motivo KYNFDF comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1.

- 5 16. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 15, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
17. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 16, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 10 18. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 15, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 15 19. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 18, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 20 20. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula de cualquiera de las cláusulas 15 a 19, que además comprende una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1.
21. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 20, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 25 22. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 20, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución no conservadora.
- 30 23. El polipéptido CKI de plantas mutante de cualquiera de las cláusulas 15 a 22, que además comprende una sustitución de aminoácidos en al menos una de  
(e) una posición correspondiente al aminoácido 164 de la BnKRP1, y  
(b) una posición correspondiente al aminoácido 165 de la BnKRP1.
24. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 23, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
- 35 25. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 23, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
- 40 26. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 23, que comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de (a) y (b).
- 45 27. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 26, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
28. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 26, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
29. El polipéptido CKI de plantas mutante de cualquiera de las cláusulas 4 a 28, que es un polipéptido mutante de la BnKRP1.
- 50 30. El polipéptido mutante de la BnKRP1 de la cláusula 29, que es  
(1) BnKRP1 F151A; F153A;  
(2) BnKRP1 Y149A; F151A; F153A;  
(3) BnKRP1 E164A; W165A; o  
(4) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.
- 55 31. El polipéptido CKI mutante como en cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende la truncación de la región de unión a la CDK.
- 60 32. El polipéptido CKI de plantas mutante de la cláusula 31, que es un polipéptido de mutante de la BnKRP1.
33. Un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido CKI mutante de cualquiera de las cláusulas 1 a 32.

34. Un vector que comprende un replicón y el ácido nucleico recombinante de la cláusula 33.
35. El vector de la cláusula 34, que es un vector de expresión que comprende además una región promotora unida de manera operativa al ácido nucleico recombinante.
- 5 36. El vector de expresión de la cláusula 35, en donde la región promotora puede operar en una célula de plantas.
37. El vector de expresión de la cláusula 36, en donde la región promotora comprende un promotor CaMV 35S o un promotor LFAH12.
- 10 38. El vector de expresión de la cláusula 35, en donde la región promotora es transcripcionalmente activa de una manera específica a los tejidos y/o específica a los órganos.
39. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico recombinante de la cláusula 33.
- 15 40. Una célula huésped que comprende el vector de cualquiera de las cláusulas 34 a 38.
41. Un método para la producción de un polipéptido CKI mutante, en donde dicho método comprende: cultivar la célula huésped de la cláusula 39 ó 40 bajo condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido CKI mutante.
- 20 42. El método de la cláusula 41, que además comprende recuperar dicho polipéptido CKI mutante.
43. Una planta transgénica que comprende un transgén que codifica un polipéptido CKI mutante, dicha planta transgénica que expresa un polipéptido CKI de tipo salvaje, dicho polipéptido CKI de tipo salvaje que comprende (a) una región de unión a una ciclina que confiere una afinidad de unión a una ciclina y (b) una región de unión a una CDK que confiere una afinidad de unión a una CDK, en donde dicho polipéptido CKI mutante comprende una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido CKI de referencia, y dicho polipéptido CKI de referencia se selecciona del grupo que consiste en
- 25 (1) el polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje expresado por la planta transgénica, y  
 (2) un polipéptido CKI de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función CKI de tipo salvaje dentro de una célula de la planta transgénica sustancialmente equivalente a la función CKI de tipo salvaje de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido CKI de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido CKI mutante a la CDK, y en donde el polipéptido CKI mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido CKI de referencia, una afinidad de unión a la ciclina.
- 30 44. La planta transgénica de la cláusula 43, que es una planta monocotiledónea.
- 35 45. La planta transgénica de la cláusula 43, que es una planta dicotiledónea.
46. La planta transgénica como la de cualquiera de las cláusulas 43 a 45, en donde dicho polipéptido CKI de referencia es miembro de la familia de las proteínas relacionadas con KIP (KRP).
- 45 47. La planta transgénica de la cláusula 46, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido CKI de Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max), maíz, trigo, arroz, alfalfa, algodón o chopo.
48. La planta transgénica de la cláusula 46, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido de la KRP1.
- 50 49. La planta transgénica de la cláusula 46, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de una KRP1 de Brassica (BnKRP1).
- 55 50. La planta transgénica de la cláusula 49, en donde dicho polipéptido CKI mutante comprende al menos dos modificaciones dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de una KRP1 de Brassica (BnKRP1).
51. La planta transgénica de la cláusula 49, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende una sustitución de aminoácidos.
- 60 52. La planta transgénica de la cláusula 51, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución de no alanina a alanina.

53. La planta transgénica de la cláusula 51, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 5 54. La planta transgénica de la cláusula 49, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro del motivo KYNFDF.
55. La planta transgénica de la cláusula 54, en donde dicho polipéptido CKI mutante comprende al menos dos modificaciones dentro del motivo KYNFDF.
- 10 56. La planta transgénica de la cláusula 54, en donde dichas dos modificaciones que hay por lo menos dentro del motivo KYNFDF comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1.
- 15 57. La planta transgénica de la cláusula 56, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
58. La planta transgénica de la cláusula 57, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 20 59. La planta transgénica de la cláusula 56, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 25 60. La planta transgénica de la cláusula 59, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 30 61. La planta transgénica de cualquiera de las cláusulas 56 a 60, en donde el polipéptido CKI mutante que además comprende una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1.
62. La planta transgénica de la cláusula 61, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 35 63. La planta transgénica de la cláusula 61, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución no conservadora.
64. La planta transgénica de cualquiera de las cláusulas 56 a 63, que además comprende una sustitución de aminoácidos en al menos una de
- 40 (e) una posición correspondiente al aminoácido 164 de la BnKRP1, y  
(b) una posición correspondiente al aminoácido 165 de la BnKRP1.
65. La planta transgénica de la cláusula 64, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
- 45 66. La planta transgénica de la cláusula 64, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
67. La planta transgénica de la cláusula 64, en donde el polipéptido CKI mutante comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de (a) y (b).
- 50 68. La planta transgénica de la cláusula 67, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
- 55 69. La planta transgénica de la cláusula 67, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
70. La planta transgénica como en cualquiera de las cláusulas 46 a 69, en donde el polipéptido CKI de referencia es un polipéptido de la BnKRP1.
- 60 71. La planta transgénica de la cláusula 70, en donde el polipéptido CKI mutante es (1) BnKRP1 F151A; F153A;

- (2) BnKRP1 Y149A; F151A; F153A;
- (3) BnKRP1 E164A; W165A; o
- (4) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.

- 5 72. La planta transgénica como en cualquiera de las cláusulas 43 a 49, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende la truncación de la región de unión a la CDK.
73. La planta transgénica de la cláusula 72, en donde el polipéptido CKI mutante es un polipéptido de la BnKRP1.
- 10 74. La planta transgénica como en cualquiera de las cláusulas 43 a 73, que se selecciona del grupo que consiste en Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max), maíz, trigo, arroz, alfalfa, algodón, chopo y camelina.
75. La planta transgénica de la cláusula 74, que se selecciona del grupo que consiste en Brassica napus, soja (Glycine max) y maíz.
- 15 76. La planta transgénica de la cláusula 75, en donde el polipéptido CKI de referencia es un polipéptido CKI de Arabidopsis thaliana.
77. Un método para la producción de una planta transgénica como en cualquiera de las cláusulas 43 a 74, que consiste en:  
Introducir en una planta un vector que comprende el transgén que codifica el polipéptido CKI mutante.
- 20 78. Un método de modulación de la división celular en una célula de planta que expresa un polipéptido CKI de tipo salvaje, en donde dicho polipéptido CKI de tipo salvaje comprende (a) una región de unión a la ciclina que confiere una afinidad de unión a una ciclina y (b) una región de unión a la CDK que confiere una afinidad de unión a una CDK; en donde el método consiste en:  
expresar dentro de la célula un polipéptido CKI mutante que comprende una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido CKI de referencia, en donde dicho polipéptido CKI de referencia se selecciona del grupo que consiste en
- 25 (1) el polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje expresado dentro de la célula de la planta; y  
(2) un polipéptido CKI de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función CKI de tipo salvaje dentro de la célula de la planta sustancialmente equivalente a la función CKI de tipo salvaje de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido CKI de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido CKI mutante a la CDK, y
- 30 en donde el polipéptido CKI mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido CKI de referencia, una afinidad de unión a la ciclina; y  
dejar que dicho polipéptido CKI mutante inhiba la actividad biológica CKI de tipo salvaje dentro de la célula de la planta.
- 35 79. El método de la cláusula 78, en donde dicho polipéptido CKI de referencia es un miembro de la familia de las proteínas relacionadas con KIP (KRP).
80. El método de la cláusula 79, en donde el polipéptido CKI mutante antagoniza una pluralidad de miembros de la familia de las KRP endógenas dentro de la célula de la planta.
- 40 81. El método de la cláusula 79, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido CKI de Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max) o maíz, o Maíz.
- 45 82. El método de la cláusula 79, en donde dicho miembro de la familia de las KRP es un polipéptido de la KRP1.
- 50 83. El método de la cláusula 79, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de una KRP1 de Brassica (BnKRP1).
- 55 84. El método de la cláusula 83, en donde dicho polipéptido CKI mutante comprende al menos dos modificaciones dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 145-168 de la KRP1 de Brassica (BnKRP1).
85. El método de la cláusula 83, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende una sustitución de aminoácidos.
- 60 86. El método de la cláusula 85, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución de no alanina a alanina.

87. El método de la cláusula 85, en donde la sustitución de aminoácidos es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 5 88. El método de la cláusula 83, en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro del motivo KYNFDF.
89. El método de la cláusula 88, en donde dicho polipéptido CKI mutante comprende al menos dos modificaciones dentro del motivo KYNFDF.
- 10 90. El método de la cláusula 89, en donde dichas dos modificaciones que hay por lo menos dentro del motivo KYNFDF comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1.
- 15 91. El método de la cláusula 90, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
92. El método de la cláusula 91, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 20 93. El método de la cláusula 90, en donde al menos una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
- 25 94. El método de la cláusula 93, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 151 y 153 de la BnKRP1 es una sustitución de un aminoácido por un aminoácido de carga opuesta.
95. El método de cualquiera de las cláusulas 90 a 94, en donde el polipéptido CKI mutante comprende además una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1.
- 30 96. El método de la cláusula 95, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución de no alanina a alanina.
- 35 97. El método de la cláusula 95, en donde la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1 es una sustitución no conservadora.
98. El método como en cualquiera de las cláusulas 90 a 97, en donde el polipéptido CKI mutante comprende además en al menos una de  
(e) una posición correspondiente al aminoácido 164 de la BnKRP1, y  
40 (b) una posición correspondiente al aminoácido 165 de la BnKRP1.
99. El método de la cláusula 98, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
- 45 100. El método de la cláusula 98, en donde la sustitución de aminoácidos en al menos una de entre (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
101. El método de la cláusula 98, en donde el polipéptido CKI mutante comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de (a) y (b).
- 50 102. El método de la cláusula 101, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución de no alanina a alanina.
103. El método de la cláusula 101, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos en (a) y (b) es una sustitución no conservadora.
- 55 104. El método como en cualquiera de las cláusulas 82 a 103, en donde el polipéptido CKI de referencia es un polipéptido de la BnKRP1.
- 60 105. El método de la cláusula 104, en donde el polipéptido CKI mutante se selecciona del grupo que consiste en  
(1) BnKRP1 F151A; F153A;  
(2) BnKRP1 Y149A; F151A;F153A;

- (3) BnKRP1 E164A; W165A; o  
(4) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A

5 106. El método como en cualquiera de las cláusulas 78 a 83, en donde dicha modificación que hay por lo menos comprende la truncación de la región de unión a la CDK.

107. El método de la cláusula 106, en donde el polipéptido CKI de referencia es un polipéptido de la BnKRP1.

10 108. El método de cualquiera de las cláusulas 78 a 107 consiste además en introducir en la célula de la planta un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido CKI mutante.

109. El método de la cláusula 108, en donde el ácido nucleico recombinante es un vector de expresión.

15 110. El método de cualquiera de las cláusulas 78 a 109, en donde la célula de la planta es de una planta seleccionada del grupo que consiste en Brassica napus, Arabidopsis thaliana, soja (Glycine max) y maíz.

111. El método de la cláusula 110, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en Brassica napus, soja (Glycine max) y maíz.

20 112. El método de la cláusula 111, en donde el polipéptido CKI de referencia es un polipéptido CKI de Arabidopsis thaliana.

113. Un método para aumentar el vigor de las plantas que consiste en:  
expresar dentro de la planta un polipéptido de la KRP mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de  
25 una KRP que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido de la KRP de referencia, en donde dicho polipéptido de la KRP de referencia se selecciona del grupo que consiste en  
(1) el polipéptido de la KRP de tipo salvaje expresado dentro de la planta; y  
(2) un polipéptido de la KRP de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función de la KRP de tipo salvaje dentro de una célula de la planta sustancialmente equivalente a la función de la KRP de tipo salvaje  
30 de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido de la KRP mutante a la CDK, y en donde el polipéptido de la KRP mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión a la ciclina; y  
35 permitir que dicho polipéptido de la KRP mutante inhiba la actividad biológica de la KRP de tipo salvaje dentro de la planta para aumentar así el vigor de la planta.

114. Un método para aumentar la masa radicular de una planta que consiste en:  
expresar dentro de la planta un polipéptido de la KRP mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de  
40 una KRP que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido de la KRP de referencia, en donde dicho polipéptido de la KRP de referencia se selecciona del grupo que consiste en  
(1) el polipéptido de la KRP de tipo salvaje expresado dentro de la planta; y  
(2) un polipéptido de la KRP de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función de la KRP de tipo salvaje dentro de una célula de la planta sustancialmente equivalente a la función de la KRP de tipo salvaje  
45 de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido de la KRP mutante a la CDK, y en donde el polipéptido de la KRP mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión a la ciclina; y  
50 permitir que dicho polipéptido de la KRP mutante inhiba la actividad biológica de la KRP de tipo salvaje dentro de la planta para aumentar así la masa radicular de la planta.

115. Un método para aumentar el tamaño de las semillas de las plantas que consiste en:  
expresar dentro de la planta un polipéptido de la KRP mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de  
una KRP que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido de la KRP de referencia, en donde dicho polipéptido de la KRP de referencia se selecciona del grupo que consiste en  
55 (1) el polipéptido de la KRP de tipo salvaje expresado dentro de la planta, y (2) un polipéptido de la KRP de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función de la KRP de tipo salvaje dentro de una célula de la planta transgénica sustancialmente equivalente a la función de la KRP de tipo salvaje de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido de la KRP mutante a la CDK, y  
60 en donde el polipéptido de la KRP mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión a la ciclina; y  
permitir que dicho polipéptido de la KRP mutante inhiba la actividad biológica de la KRP de tipo salvaje dentro de la planta para aumentar así el tamaño de las semillas de la planta.

116. Un método para aumentar la germinación temprana en una planta que consiste en:  
 expresar dentro de la planta un polipéptido de la KRP mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de una KRP que tiene al menos una modificación relativa a un polipéptido de la KRP de referencia, en donde dicho polipéptido de la KRP de referencia se selecciona del grupo que consiste en  
 (1) el polipéptido de la KRP de tipo salvaje expresado dentro de la planta; y  
 (2) un polipéptido de la KRP de tipo salvaje heterólogo a (1) y que es capaz de proporcionar una función de la KRP de tipo salvaje dentro de una célula de la planta sustancialmente equivalente a la función de la KRP de tipo salvaje de (1); en donde dicha modificación que hay por lo menos se encuentra dentro de la región de unión a la CDK para así conferir, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión modificada del polipéptido de la KRP mutante a la CDK, y en donde el polipéptido de la KRP mutante mantiene sustancialmente, respecto al polipéptido de la KRP de referencia, una afinidad de unión a la ciclina; y  
 permitir que dicho polipéptido de la KRP mutante inhiba la actividad biológica de la KRP de tipo salvaje dentro de la planta para aumentar la germinación temprana en la planta.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TARGETED GROWTH, INC.

<120> PROTECCIÓN DE UNA PROTEÍNA KRP MUTANTE NEGATIVA DOMINANTE CONTRA LA INHIBICIÓN DE UN COMPLEJO CICLINA-CDK ACTIVO POR PARTE DE UNA KRP DE TIPO SALVAJE

<130> 25941-1-1PC

<140> PCT/US06/29349

<141> 28-07-2006

<150> EE.UU. 60/703.999

<151> 29-07-2005

<160> 101

<170> Patente Internacional versión 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

**<400> 1**

**Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu**

**1**

**5**

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

ES 2 502 415 T3

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

Pro

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

<400> 5

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

Ala Gly Glu Ser Ser Ile Ala  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asp

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

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

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

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

Trp Asp Arg Leu  
 195

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

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

Leu Lys Pro  
195

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

<400> 9

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

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

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

Ile

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

<220>

<221> Características varias

<222> (4)..(4)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características varias

<222> (20)..(20)

10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características varias

<222> (27)..(27)

15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> Características varias

<222> (32)..(32)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 502 415 T3

<400> 10

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

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

Asp Val Pro Leu Asp Gly Arg Tyr  
 35 40

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Glycine max

<400> 11

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

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

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

<210> 12  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Populus tremula

<400> 12

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

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

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

<210> 13  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 13

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

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

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

ES 2 502 415 T3

<210> 14  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

<400> 14

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

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

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

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

<400> 15

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

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

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

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

<400> 16

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

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

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

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

<400> 17

ES 2 502 415 T3

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

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

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

5 <210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<221>  
<222>  
<223> Epitopo FLAG

<400> 18

Met Asp Tyr Lys Ala Phe Asp Asn Leu  
1 5

15 <210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Influenzavirus A

<220>  
<223> Epitopo de hemaglutinina humana

<400> 19

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

20 <210> 20  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> PCR

<400> 20

atggtgagaa aatatagaaa agct

24

30 <210> 21  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> PCR

	<b>&lt;400&gt; 21</b>	
	<b>tcactctaac tttacccatt cgta</b>	<b>24</b>
	<210> 22	
	<211> 45	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador RACE	
	<b>&lt;400&gt; 22</b>	
	<b>ctctgataat ttaaccact cgtagcgtcc ttctaattggc ttctc</b>	<b>45</b>
	<210> 23	
	<212> 513	
	<212> ADN	
15	<213> Brassica napus	
	<b>&lt;400&gt; 23</b>	
	<b>atggtgagaa aatgcagaaa aactaaaggg acggtgggag cttcgtctac gtatatgcag</b>	<b>60</b>
	<b>cttcgcagcc ggagaatcgt ttacagatcg gaaaaagcta gctcgtcgtc gtcgtcttgt</b>	<b>120</b>
	<b>tgcgcgagta acaacaatgg agttatagat cttgaggagg aaagagatgg tgagactgaa</b>	<b>180</b>
	<b>acgtcgtcgt gtcgacggag tagtaagagg aagctatttg aaaaccttag agaaaaagaa</b>	<b>240</b>
	<b>tctatggaga attcacagca aatcgtagct ggttttgatt ccgccgtgaa agaatcatcg</b>	<b>300</b>
	<b>gattgttgtt gcagccggag aacatctttg tcaacgacgg aggagaaggg gaaatcagcg</b>	<b>360</b>
	<b>acggagcaac caccaacggc agtggagatt gaagattttt tcgtggaagc tgagaaacag</b>	<b>420</b>
	<b>ctccatgata atttcaagaa gaagtataac tttgatttcg aaaaggagaa gccattagaa</b>	<b>480</b>
	<b>ggacgctacg agtgggttaa attatcagag taa</b>	<b>513</b>
	<210> 24	
	<211> 28	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PCR	
	<b>&lt;400&gt; 24</b>	
	<b>acggatccca tatggtgaga aaatatag</b>	<b>28</b>
25	<210> 25	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> PCR	
	<b>&lt;400&gt; 25</b>	
	<b>atcgctcgag tcactctaac tttac</b>	<b>25</b>
35	<210> 26	

	<211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> PCR	
	<b>&lt;400&gt; 26</b> <b>acggatccca tatggtgaga aaatgc</b>	<b>26</b>
10	<210> 27 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> PCR	
	<b>&lt;400&gt; 27</b> <b>atcgctcgag tcactctgat aatttaac</b>	<b>28</b>
20	<210> 28 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido	
	<b>&lt;400&gt; 28</b> <b>ggagcaacca ccaacggcag tggctgctgc tgcttttttc gtg</b>	<b>43</b>
30	<210> 29 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 29</b> <b>cacgaaaaaa gcagcagcag ccaactgccgt tggtggttgc tcc</b>	<b>43</b>
40	<210> 30 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido	
	<b>&lt;400&gt; 30</b> <b>ccttctaatag gcttctcctt ttcagcatca gcgttatact tcttcttgaa</b>	<b>50</b>

	<210> 31	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 31</b>	
	<b>ttcaagaaga agtataacgc tgatgctgaa aaggagaagc cattagaagg</b>	<b>50</b>
10	<210> 32	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 32</b>	
	<b>ttcaagaaga agtacaatgc cgatgccgag aaggagaagc catta</b>	<b>45</b>
20	<210> 33	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio	
	<b>&lt;400&gt; 33</b>	
	<b>ttatggcttc tccttctggg catcggcatt gtacttcttc ttgaa</b>	<b>45</b>
30	<210> 34	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido	
	<b>&lt;400&gt; 34</b>	
	<b>gataatttca agaaggcgta taactttgat ttc</b>	<b>33</b>
40	<210> 35	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 35</b>	
	<b>gaaatcaaag ttatagcct tcttgaatt atc</b>	<b>33</b>
	<210> 36	

	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 36</b>		
	<b>aatttcaaga agaaggctaa ctttgatttc gaa</b>		<b>33</b>
10	<210> 37		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido		
	<b>&lt;400&gt; 37</b>		
	<b>ttcgaaatca aagttagcct tcttcttgaa att</b>		<b>33</b>
20	<210> 38		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 38</b>		
	<b>ttcaagaaga agtatgcctt tgatttcgaa aag</b>		<b>33</b>
30	<210> 39		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido		
	<b>&lt;400&gt; 39</b>		
	<b>cttttcgaaa tcaaaggcat acttcttctt gaa</b>		<b>33</b>
40	<210> 40		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 40</b>		
	<b>agaagaagta taacgctgat ttcggaaagg a</b>		<b>31</b>
	<210> 41		
	<211> 31		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
5		
	<b>&lt;400&gt; 41</b>	
	<b>tccttttcga aatcagcgtt atactttctt c</b>	<b>31</b>
	<210> 42	
	<211> 31	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido	
15		
	<b>&lt;400&gt; 42</b>	
	<b>agtataactt tgatgccgaa aaggagaagc c</b>	<b>31</b>
	<210> 43	
	<211> 31	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 43</b>	
	<b>ggctttctcct ttcggcatc aaagttatac t</b>	<b>31</b>
25		
	<210> 44	
	<211> 34	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido	
	<b>&lt;400&gt; 44</b>	
	<b>gatttcgaaa aggaggcggc attagaagga cgct</b>	<b>34</b>
35		
	<210> 45	
	<211> 34	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido	
	<b>&lt;400&gt; 45</b>	
	<b>agcgtccttc taatgccgcc tccttttcga aatc</b>	<b>34</b>
45		
	<210> 46	
	<211> 33	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 46</b>		
	<b>gccattagaa ggagccgccg agtgggtaa att</b>		<b>33</b>
5	<210> 47		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido		
	<b>&lt;400&gt; 47</b>		
	<b>aatttaacc actcggcggc tccttctaatt ggc</b>		<b>33</b>
15	<210> 48		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 48</b>		
	<b>agaaggacgc tacgcgcg ttaaattatc aga</b>		<b>33</b>
25	<210> 49		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido		
	<b>&lt;400&gt; 49</b>		
	<b>tctgataatt taaccgccgc gtagcgtcct tct</b>		<b>33</b>
35	<210> 50		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido		
	<b>&lt;400&gt; 50</b>		
	<b>cgctacgagt gggttgcagc atcagagtga gagc</b>		<b>34</b>
45	<210> 51		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido

**<400> 51**

5 **gctctcactc tgatgctgca acccactcgt agcg** 34

<210> 52

<211> 50

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido

**<400> 52**

15 **ccttctaatag gcttctcctt ttcagcatca gcgttatact tcttcttgaa** 50

<210> 53

<211> 50

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido

**<400> 53**

25 **ttcaagaaga agtataacgc tgatgctgaa aaggagaagc cattagaagg** 50

<210> 54

<211> 33

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio-sentido

**<400> 54**

35 **aatttcaaga agaaggctaa cgctgatgct gaa** 33

<210> 55

<211> 33

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio antisentido

**<400> 55**

45 **ttcagcatca gcgttagcct tcttcttgaa att** 33

<210> 56

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> PCR

**<400> 56**  
**ctcgcagtcaa gcagctaatt taaccacctc gta** **33**

5

<210> 57  
<211> 24  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> PCR

**<400> 57**  
**ctcgcagtcac ttcttgaaat tacc** **24**

15

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

**<400> 58**

**Lys Tyr Asn Phe Asp Phe**  
**1 5**

20 <210> 59  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> AtKrp2 mutante

**<400> 59**

**Lys Ala Ala Ala Ala Ala**  
**1 5**

30 <210> 60  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> PCR

**<400> 60**  
**ggatcccata tgggaaaata cataaag** **27**

40 <210> 61  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

	<220> <223> PCR		
	<b>&lt;400&gt; 61</b> <b>ctcgagctaa tcatctacct tctt</b>		<b>24</b>
5	<210> 62 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> PCR		
	<b>&lt;400&gt; 62</b> <b>ggatcccata tgggcaagta catgcgc</b>		<b>27</b>
15	<210> 63 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> PCR		
	<b>&lt;400&gt; 63</b> <b>ggatcctcag tctagcttca ccca</b>		<b>24</b>
25	<210> 64 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> PCR		
	<b>&lt;400&gt; 64</b> <b>ctcgaggaca tatggagatg gctcaggta aggca</b>		<b>35</b>
35	<210> 65 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> PCR		
	<b>&lt;400&gt; 65</b> <b>ctcgagtcaa ctgaaccac tcgtatcgtc c</b>		<b>31</b>
45	<210> 66 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 502 415 T3

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio

<400> 66

ttcaagaaga agtacaatgc cgatgccgag aaggagaagc catta

45

5

<210> 67

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Mutagénesis dirigida al sitio

<400> 67

ttatggettc tccttctggg catcggcatt gtacttcttc ttgaa

45

15

<210> 68

<211> 168

<212> PRT

<213> Brassica napus

20

<400> 68

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
 165

<210> 69

<211> 192

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 69

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 70  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Brassica napus

<400> 70

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

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

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

Phe Glu Trp Lys Lys Val Asp Asp  
245

<210> 71

<211> 199

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

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

Glu Trp Ile Lys Val Val Pro  
 195

- <210> 72
- <211> 190
- <212> PRT
- <213> Brassica napus

<400> 72

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 502 415 T3

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

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

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

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

<210> 73

<211> 70

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 73

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

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

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

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

Pro Lys Gly Ala Cys Lys  
65 70

10 <210> 74

<211> 513

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Krp1 F151A; F153A optimizados para su expresión en maíz

ES 2 502 415 T3

```

<400> 74
atggtccgga agtgccggaa gacgaaaggc accgtggggg ctagtagcac ctatatgcaa      60
cttaggtcaa gaaggatcgt ctaccgtagc gagaaggcta gttcctctag ttcgtcatgc      120
tgtgcttcaa ataacaacgg cgtgatcgac cttgaggagg agcgggatgg agagacagag      180
acctcttcgt gcaggcgctc cagcaaacgt aaactcttcg agaatcttag ggagaaggag      240
agtatggaaa attctcagca aatcgtagcc ggatttgatt cggcggtgaa agagtctagc      300
gactgctgct gttccagaag gacgagtctg tctactaccg aggagaaggg gaaaagcgcc      360
accgagcaac cgccgacggc tgtcgagatt gaggatttct ttgtcgaggc ggagaaacag      420
ctccaagaca attttaagaa gaaatataac gctgacgctg aaaaggagaa gccactggag      480
ggcaggtacg agtggggttaa attgtccgag tga                                     513

```

<210> 75

5 <211> 513

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Krp1 Y149A; F151A; F153A optimizados para su expresión en maíz

ES 2 502 415 T3

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

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

<400> 76

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

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

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

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

<400> 77

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

Arg Gln Gln Gln Asp Phe Ile Asp Lys Tyr Asn Phe Asp Pro Ala Asn

ES 2 502 415 T3

20

25

30

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

<210> 78

<211> 47

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 78

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

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

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

<210> 79

<211> 47

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 79

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

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

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

<210> 80

<211> 47

<212> PRT

<213> Glycine max

<220>

<221> Características varias

<222> (7)..(7)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 502 415 T3

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

<210> 81  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Glycine max

<400> 81

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

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

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

<210> 82  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Glycine max

<400> 82

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

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

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

<210> 83  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Glycine max

<400> 83

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

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

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

<210> 84  
 <211> 45  
 <212> PRT

ES 2 502 415 T3

<213> Populus tremula

<400> 84

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

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

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

<210> 85

<211> 43

<212> PRT

<213> Populus tremula

<400> 85

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

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

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

<210> 86

<211> 45

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 86

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

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

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

<210> 87

<211> 46

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 87

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

ES 2 502 415 T3

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

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

<210> 88

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F145A;Y149A

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
 165



ES 2 502 415 T3

<220>

<223> BnKrp1 F145A;Y149A;F151A

<400> 90

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
165

<210> 91

5 <211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 Y149A;F151A

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
165

<210> 92

<211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> BnKrp1 Y149A;F153A

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
165

<210> 93

5 <211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Lys Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Glu Lys Glu Lys Pro Leu Glu

145

150

155

160

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
165

- 5 <210> 94
- <211> 168
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Trp Val Lys Leu  
165

<210> 95

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;E164A

<400> 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Ala Trp Val Lys Leu  
165

<210> 96

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;W165A

<400> 96

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

Thr Tyr Met Gln Leu Arg Ser Arg Arg Ile Val Tyr Arg Ser Glu Lys

20

25

30

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Ala Val Lys Leu  
165

<210> 97

5 <211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;E164A;W165A

<400> 97

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu  
165

- 5 <210> 98
- <211> 168
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A

<400> 98

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Ala Trp Val Lys Leu  
165

<210> 99

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;W165A

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Glu Ala Val Lys Leu  
165

- 5 <210> 100
- <211> 168
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A;W165A

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu  
165

<210> 101

<211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

ES 2 502 415 T3

<220>

<223> BnKrp1 E164A;W165A

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Ala Ala Val Lys Leu  
165

5

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido inhibidor de quinasa dependiente de ciclina de plantas (CKI) mutante que comprende:  
 una secuencia de aminoácidos CKI que tiene al menos dos modificaciones de aminoácidos relativas a un polipéptido  
 CKI de plantas de tipo salvaje, en donde dicho polipéptido CKI de tipo salvaje comprende
- 5 (a) Una región de unión a la ciclina que confiere una afinidad de unión a una ciclina y  
 (b) una región de unión a una quinasa dependiente de ciclinas (CDK) que confiere una afinidad de unión  
 a la CDK; en donde el polipéptido CKI de tipo salvaje se une a un complejo ciclina/CDK;  
 en donde las dos modificaciones que hay por lo menos se encuentran dentro de la región de unión a la CDK;  
 en donde el polipéptido CKI mutante puede competir con dicho CKI de tipo salvaje por unirse al complejo  
 10 ciclina/CDK;  
 en donde dicho polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje es miembro de la familia de las proteínas relacionadas con  
 KIP (KRP) y en donde dicho polipéptido CKI de plantas mutante no inhibe la actividad quinasa del complejo  
 ciclina/CDK; y  
 en donde las dos modificaciones que hay por lo menos antedichas se encuentran dentro de la región  
 15 correspondiente a los aminoácidos 145-168 de la KRP1 de Brassica (BnKRP1), estando cada sustitución de  
 aminoácidos en una posición seleccionada independientemente del grupo que consiste en:
- (a) (a) una posición correspondiente al aminoácido 145 de la BnKRP1;  
 (b) (a) una posición correspondiente al aminoácido 149 de la BnKRP1;  
 (c) (a) una posición correspondiente al aminoácido 151 de la BnKRP1;  
 20 (d) (a) una posición correspondiente al aminoácido 153 de la BnKRP1;  
 (e) (a) una posición correspondiente al aminoácido 164 de la BnKRP1; y  
 (f) (a) una posición correspondiente al aminoácido 165 de la BnKRP1.
2. El polipéptido CKI mutante de la reivindicación 1, en donde las dos modificaciones que hay por lo menos  
 25 antedichas se encuentran dentro de la región de unión a la CDK correspondiente a los aminoácidos 145-168 de la  
 KRP1 de *Brassica napus* (BnKRPI, SEC ID N°.: 68).
3. El polipéptido CKI mutante de la reivindicación 1, en donde el polipéptido CKI mutante no inhibe la actividad  
 quinasa del complejo ciclina/CDK cuando se utiliza en una cantidad 10 veces mayor que la cantidad mínima de CKI  
 de tipo salvaje necesaria para abolir la actividad quinasa del complejo ciclina/CDK en un ensayo de la actividad  
 quinasa in vitro.
- 30 4. El polipéptido CKI mutante de la reivindicación 1, en donde el polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje es de  
 una planta monocotiledónea, una planta dicotiledónea o una planta inferior.
5. El polipéptido CKI mutante de la reivindicación 4, en donde el polipéptido CKI de plantas de tipo salvaje se  
 deriva de la *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, soja (*Glycine max*), maíz, arroz, trigo, alfalfa, algodón y chopo.
- 35 6. Un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido CKI mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1  
 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 6.
8. El vector de expresión de la reivindicación 7, en donde el vector de expresión comprende además un promotor  
 unido de manera operativa al ácido nucleico recombinante.
9. El vector de expresión de la reivindicación 8, en donde el promotor es un promotor constitutivo, un promotor  
 40 inducible, un promotor específico de los tejidos, un promotor de desarrollo regulado o un promotor específico de las  
 etapas.
10. El vector de expresión de la reivindicación 9, en donde el promotor constitutivo es un promotor CaMV 35S, el  
 promotor específico a los tejidos es un promotor específico a las semillas, o el promotor es un promotor del  
 desarrollo temprano de los embriones o un promotor específico de los embriones.
- 45 11. Una planta transgénica, órgano de plantas, semillas, células de plantas o la progenie de las mismas que  
 comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 6.

12. La planta transgénica de la reivindicación 11, en donde la planta es espárrago, maíz, cebada, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar, cebolla, mijo, centeno, avena, tomate, tabaco, algodón, canola, carmelina, habas, soja, pimientos, lechuga, chopo, pino, cedro, roble o abeto.

5 13. Un método para aumentar el vigor de las plantas, la masa radicular, el tamaño de los frutos, el tamaño de las semilla de plantas, el número de semillas de plantas, el rendimiento de las plantas, biomasa de las plantas, germinación temprana o división celular en unaplanta, que consiste en expresar dentro de la planta el polipéptido CKI mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10 14. El método de la reivindicación 13, en donde la planta es espárrago, maíz, cebada, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar, cebolla, mijo, centeno, avena, tomate, tabaco, algodón, canola, carmelina, habas, soja, pimientos, lechuga, chopo, pino, cedro, roble o abeto.

15

20

```

BnKrp1      1 --MVRKORRKKGTVGA-----SSTYMQLRSRRIIVYRS
AtKRP1     1 --MVRKVRKAKGIVEAG-----V-----SSTYMQLRSRRIIVYVR
AtKRP2     1 --MAAVRRRERDVVE-----ENGVTITVKKRKMEEVDLVE
BnKrp3     1 --MGKYIKKSKITG-----DIDSMEATEATSLGVRTR-AAAKTLALKR
AtKRP3     1 --MGKYIKKSKITG-----DISVMEVSKATAPSPGVRTRAAKTLALKR
BnKrp4     1 --MGKYIKKSKLDG-----EALSLIDVSP--SPLGVLTRAKSEAEQR
AtKRP4     1 --MGKYIRKSKIDGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVSPPSSSSSLGVLTRAKSLALQQ
BnKrp5     1 --MGRYIKKSKIACG-----ALSAKDISHQTASGFRTAAKNLALQRLR
AtKRP5     1 --MGKYIKKSKVAC-----AVSVKDKSHPPALGFRTAAAANKLALHR
BnKrp6     1 --MSERDPNCKRDAR-----SLEASSQNDSQLKKKKLDDDFVFLA
AtKRP6     1 --MSERKRELAEAS-----STSFSPKKTKLNDS
AtKRP7     1 MSETKPKRDSSEYEC-----SNIKRMRLDDDDVLR
p27       1 -----

BnKrp1     31 EKASS-----SSSSCCASN----NNGVIT
AtKRP1     33 SEKSSSVS-----VVGDNVSSSCSGSNEYKKKELTH
AtKRP2     36 SRIILSP-----CVQATNRGGIVARNAGASSETSVAI
BnKrp3     41 LNSSAP-----DSSCYLQIRSRRLKPPSLAE
AtKRP3     42 LNSSAADS-----ALPNDS CYLQIRSRRLKPPSLTE
BnKrp4     39 RLQ-----KPPSSPSPNPPPS---KQEITDCSGGSYLQIRSRRLKPPPIIV
AtKRP4     59 QQORCLLQKPPSSPSSLPPTSASPNNPSKQKMKKKQQMNDCGSYLQIRSRRLKPP--LV
BnKrp5     43 SHSTPPF-----VDADSFYRLOIRSRRLVKLPLIAD
AtKRP5     42 LRSHSD-----EADSFNYLQIRSRRLVKLPLITN
BnKrp6     39 VPSMAS-----SDDSSRGCSVTSAGEDDDKSET
AtKRP6     29 SDSSPDSDHVIVF-----AVSSSSVASSAALASDECSVTI
AtKRP7     31 SPRTLS-----SSSSSLAYSVSDSGGFCVAL
p27       1 -----

BnKrp1     50 DLEE---ERDGETEISSCRRSSKRKLFENLREK-----ESMENSQ--
AtKRP1     65 LEEE---DKDGDTEISTYRRGTRKRLFENLREE-----EKELSKSM
AtKRP2     68 VRRR---DSPVVEQCQIEEDSSVSCCSTSEEK-----SKRRIEFVDLE
BnKrp3     69 PRQ---VKPGIKESGSK---IDSVNSSVAGSGD-----ECFCRE
AtKRP3     75 PKQPPRVHRSIGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSN-----EDECFDNFVSVQVSCGE
BnKrp4     83 VIRSSKRRKORREBEGRNPNPNPQ-NHDSIRGSGDGSRRSDSVAESVVFGEKDFNGGI
AtKRP4     118 VIRSTKRRKQQRNETCGRNPNPNRNLDSIRGDG---SRSDSVSESVVFGEKDKLISEI
BnKrp5     74 TRKQ---QORQLANSVGK---RQTNPAN-----PVLSEPT
AtKRP5     71 TRKQ---QKQLIPSVNQ---CQTKNPRASSGP-----AKKLEPDT
BnKrp6     71 CFSS---ESNEIVRK-SPTVSDLETHQIS-----DLSVS
AtKRP6     64 GGEE---SDQSSSISGCFSTESKEIAKNSSSFG-----VDLEDHQIETET
AtKRP7     60 SEEE---DDHLSSISGCSSETNETATRLP-----FSDLEAHEISET
p27       1 -----

BnKrp1     87 -QIVAGFDSAVK-----ESSDCCSRR---TSLSTTEEGK-----
AtKRP1     104 ENYSSEFESAVK-----ESLDCCSGRKIMEETVTAEEEEK-----
AtKRP2     110 ENNGDDRETETS-----WIYDDLNKS ESMNMDSSSVAVEDVESR-----
BnKrp3     102 NSPEFQTRQST-----RESTPCNFVEDLETIVTPGSSTRSMR-----
AtKRP3     126 NSLGFESRHST-----RESTPCNFVEDMEIIVTPGSSTRSMCRATK-----
BnKrp4     142 NRELDGSESFN-----WTSRESSTPCSLIRKHETITSPGSSTKLSNGISDNSNQR
AtKRP4     174 NKDPTFGQNFDFLEEHTQSFNRTTRESIPCSLIRPEIIVTPGSSTKLNICVSE-SNQR
BnKrp5     106 NLEEDRGSNLV-----KFESGCSLGEKLEFESGDRETTPCSL-----
AtKRP5     106 TTEACGDNER-----ISRSDCNFCDKGFDLESEN-----
BnKrp6     103 GRIAHNEANP-----ESEEALGETTEMES SADDRKS-----
AtKRP6     107 ETSTFITSNFR-----KETSPPVSEGLGETTEMES SATKRK-----
AtKRP7     101 EISTLLTNFRK-----QGISSENLGETAEMDSATTEMRDQR-----
p27       1 -----

```

Fig 1A

```

BnKrp1 118 ----KSATÉQPPTAVELHEDFFVBAEK---QLHDNEKKKYNEDFEKEKPLEG-RYEWVKL-
AtKRP1 140 ----AKLMTEMPTESEHEDFFVBAEK---OLKEKEFKKYNDFEKEKPLEG-RYEWVKLE
AtKRP2 150 -RRLRKS LHETVKEAEEEDFFQVAEKDLRNKLLLECSMKYNDFEKEDEPLGGRYEWVKLN
BnKrp3 139 ---TPARDSTVPTIGEELEEFFAYAEQ---QQORLFMEKYNFDIVNDVPLPG-CYEWVQVS
AtKRP3 167 -EYTREQDNVPIPTTSEMEEFFAYAEQ---QQORLFMEKYNFDIVNDIPLSG-RYEWVQVK
BnKrp4 192 EDSFSGSHRHLPTTPEMDEFFSAABE---EQOKQFTEKYNFDPVNEQPLPG-RFEWKKVD
AtKRP4 233 EDSLRSRSHRRRPTTPEMDEFFSGABE---EQOKQFTEKYNFDPVNEQPLPG-RFEWIKVD
BnKrp5 144 -RRDSEEATQSVPSHEHEEFAFAEQ---QQORFFTEKYNFDIVSENPPLPG-RYEWIKVV
AtKRP5 137 ----SMISDSKSIQSEHEEFAFAEQ---QQORFFTEKYNFDIVSDNPPLPG-RYEWVKVM
BnKrp6 136 ----SPEVSKSPTPGHEEFLSELES---KDOKRFMDKYNFDIVNDKPLQG-RYKWDRLV
AtKRP6 144 ---QPGVRKTPTAAEHEEFLSELES---DKKKQFTEKYNFDIVNDEPLEG-RYKWDRLV
AtKRP7 140 -TEKKKKMEKSPTOAELEDEFFSAAER---YEOKRFTEKYNFDIVNDIPLPG-RYQWVSLK
p27 31 -----NLFGPVDHEELTRDLEKHC RDMEEASQKWNDFONHKPLEG-KYEWQEVVE
    
```

Unión a la ciclina

Unión a la CDK

```

BnKrp1 -----
AtKRP1 192 -----
AtKRP2 209 P-----
BnKrp3 192 P-----
AtKRP3 222 P-----
BnKrp4 248 D-----
AtKRP4 289 D-----
BnKrp5 199 P-----
AtKRP5 189 P-----
BnKrp6 188 ELK-----
AtKRP6 -----
AtKRP7 195 P-----
p27 81 KGSLPEFYRPPRPPKGACK
    
```

Fig 1B

Bn Krp1	124	PPTAVETDEFFVEAEKQLHDNFKKKYNFD FEKSKPLEG- RYEWVKL---
Bn Krp3	146	VPTIGETDEFFAYAEQQQRLEFMEKYNFDIVNDVPLEG- GYEWVQVSP-
Bn Krp4	202	HPPTPEVDEFFFAAEHEEQOKQFIEKYNFDPVNEQPLEG- RFEWKKVDD-
Bn Krp5	154	VPS-HEHDEFFFAFAEQQQRFFIEKYNFDIVSENPLEG- RYEWIKVVP-
Bn Krp6	142	SPTPGETDEFFLSELESKDKRFMDKYNFDIVNDKPLQG- RYKWDRVKPL
Gm AAS13377	122	VPTSELEDEFFFAAAEKDIOKRFTDKYNFDIVKDMPLG- RYEWVQL---
Gm AAS13374	159	MPTELEDEFFFAAEKDIQKRFODRYNMDIVKDVPLEG- RYEWVQLKP-
Gm AAS13375	152	MPTELEXDEFFFAAEKDIQKRFODKYNMDIVKDVPLEG- RYEWVQLKP-
Gm AAS13376	136	MPTELEDEFFFAAAEKDIRKRFSDKYNMDIVKGVSLG- RYEWVKL---
Gm CO980060*		-PPKAEHDEFFFAAEKYEOKKFTKYNFDIVRDLPLEG- RYQWVRL--
Gm CO981606*		IPISREHDEFFFAAEIEAQKKFIEKYNFDPVNEKPLSG- RYEWVKLKP
Zm AI737717*	68	VPPAQETDEFFFAAAEAHAHAKRFASKYNFDVIRGVPLDAG- RFEWTPGVSI
Zm AW267370*	41	IPSSTEMDEFFFAAEQRQQAFFIDKYNFDPVNDQPLG- RFEWVKLD--
Zm CD963560*	17	VPSREHDEFFFAAEQRQQAFFIDKYNFDPVNDQPLG- RFEWVKLD--
Zm CB329626*	144	IPSSLEHDEFFFAAEQRQQAFFIDKYNFDPVNDQPLG- RFEWVKLD--
Os CV727532*		IPASAELEDEFFFAAEQRQQAFFIDKYNFDPVNDQPLG- RFEWVKLD--
Os CR293278*		VPSLEHDEFFFAAAEQQHQAFFREYNFCPVNDQPLG- RYEWVRL--
Os BI306406*		-PPEEBLEAFIAAAESSVARRFAAKYNMDIVKDAPIG- RYEWVVRP
Ta BG908519	145	IPCSAEHDEFFFAAEQRQQAFFIDKYNFDPVNDQPLG- RYEWVKLDZ
Ta AI820225*		VPSLEHDEFFFAAAEQQHQAFFREYNFCPASERPLG- RYEWVRLDC
Pt CK096447*		IPTTCEHDEFFFAAEQRQQAFFIEKYNFDIVNDLPLG- RYEWVRL--
Pt BU862176*		IPTTREHDEFFFAAEQRQQAFFIEKYNFDPVSDKPLG- RYEWVKL
Pt BU892281*		TDEBLEKFFGETGNIPCCSKDKYNFDKDEPLEG- RYEWVRL
Nt KIS1	117	MPSEKETEDEFFFAAEKDLHAEFAEKYNFDFAKEEPLG- RYEWVRLGS-
St BQ505644*		--SEAELEDEFFFAAAEKDLHAEFAEKYNFDFAKEEPLG- RYEWVRL---
Gh A1728644*		IPSKAEHDEFFFAAEKYEQXAEFAEKYNMDIVKDVPLEG- RY-----

Bn= Brassica napus (canola)  
 Gm= Glycine max (soja)  
 Os= Oryza sativa (arroz)  
 St= Solanum tuberosum (patata)  
 Gh= Gossypium hirsutum (algodón)  
 Ta= Triticum aestivum (trigo)  
 Pt= Populus tremula (chopo)  
 Nt= Nicotiana tabacum (tabajo)

Fig 2

- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 

➤ Krp1 F151A; F153A de codones optimizados para su expresión en maíz

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc  
 gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgacgaccttgaggagg  
 agcgggatggagagacagagacctcttcgtgcaggcgtccagcaaactccttcgagaatcttagggagaagga  
 gagtatggaatctcagcaaatcgtagccggattgattcggcgggtaagagcttagcgactgctgctgtccagaagg  
 acgagtctgtactaccgaggagaaggggaaaagcggcaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggattctt  
 tgcgagggcgagaacagctccacgacaatttaagaagaatataacgctgacgctgaaaaggagaagccactggag  
 ggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

➤ Krp1 Y149A;F151A;F153A de codones optimizados para su expresión en maíz

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc  
 gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgacgaccttgaggagg  
 agcgggatggagagacagagacctcttcgtgcaggcgtccagcaaactccttcgagaatcttagggagaagga  
 gagtatggaatctcagcaaatcgtagccggattgattcggcgggtaagagcttagcgactgctgctgtccagaagg  
 acgagtctgtactaccgaggagaaggggaaaagcggcaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggattctt  
 tgcgagggcgagaacagctccacgacaatttaagaagaagcgaacgctgacgctgaaaaggagaagccactgga  
 ggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

Fig 3