



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 275**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96913160 .6**
86 Fecha de presentación : **19.04.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0821729**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.1998**

54 Título: **Productos resistentes a herbicidas diseñados sobre la base de la estructura.**

30 Prioridad: **20.04.1995 US 426125**
31.05.1995 US 455355

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es: **BASF Aktiengesellschaft**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Kakefuda, Genichi;**
Ott, Karl-Heinz;
Kwagh, Jae-Gyu y
Stockton, Gerald, W.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 275 275 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

Productos resistentes a herbicidas diseñados sobre la base de la estructura.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al modelado y el diseño basados en la estructura de variantes de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS) que son resistentes a las imidazolinonas y otros herbicidas, a AHAS que inhiben herbicidas, a las propias variantes de AHAS, a DNAs que codifican estas variantes, a plantas que expresan estas variantes y a procedimientos de gestión de malas hierbas.

10 **Antecedentes de la invención**

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS) es una enzima que cataliza la etapa inicial de la biosíntesis de isoleucina, leucina y valina en bacterias, levaduras y plantas. Por ejemplo, la AHAS madura de *Zea Mays* es una proteína de aproximadamente 599 aminoácidos que está localizada en el cloroplasto (véase la Fig. 1). La enzima utiliza pirofosfato de tiamina (TPP) y dinucleótido de flavina adenina (FAD) como cofactores y piruvato como sustrato para formar acetolactato. La enzima cataliza también la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxibutirato. La AHAS también es conocida como acetolactato sintasa o acetolactato piruvato liasa (que carboxila), y se designa EC 20 4.1.3.18. Probablemente, la enzima activa es como mínimo un homodímero. Ibdah y otros (Protein Science, 3:479-S, 1994), en un resumen, describen un modelo del sitio activo de AHAS.

Una variedad de herbicidas, entre las que están incluidos compuestos de imidazolinona tales como imazetapir (PURSUIT®), American Cyanamid Company-Wayne, NJ), compuestos basados en sulfonilurea tales como sulfometuronmetilo (OUST® - E.I. du Pont de Nemours and Company-Wilmington, DE), triazolopirimidin sulfonamidas (Broadstrike^{MC} - Dow Elanco; véase Gerwick y otros, Pestic. Sci. 29:357-364, 1990), sulfamoilureas (Rodaway y otros, *Mechanisms of Selectivity of Ac 322.140 in Pady Rice, Wheat and Barley*, Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Weeds, 1993), ácidos pirimidiloxibenzoicos (STABLE® - Kumiai Chemical Industry Company, E.I. du Pont de Nemours and Company; véase *The Pesticide Manual*, 10ª ed., págs. 888-889, Clive Tomlin, Ed., British Crop Protection Council, 49 Downing Street, Farmham, Surrey G49, Reino Unido), y sulfonilcarboxamidas (Alvarado y otros, patente U.S. n.º 4.883.914) actúan inhibiendo la actividad enzimática de AHAS. (véanse Chaleff y otros, Science 224:1443, 1984); LaRossa y otros, J. Biol. Chem. 259:8753, 1984; Ray, Plant Physiol. 75:827, 11984; Shaner y otros, Plant Physiol. 76:545, 1984). Estos herbicidas son muy efectivos y ambientalmente benignos. Sin embargo, su uso en agricultura es limitado por no tener selectividad, puesto que los cultivos, y también las indeseadas malas hierbas, son sensibles a los efectos fitotóxicos de estos herbicidas.

Bedbrook y otros, patentes U.S. n.º 5.013.659, n.º 5.141.870 y n.º 5.378.824 describen varias variantes de AHAS resistentes a sulfonilurea. Sin embargo, estas variantes se obtuvieron por mutagénesis de plantas, semillas o células y seleccionando mutantes resistentes a herbicidas, o derivaron de tales mutantes. Este enfoque es impredecible en cuanto a que se basa (al menos inicialmente) en la introducción al azar de una mutación relevante, y no en un criterio de diseño racional basado en un modelo estructural de la proteína diana.

Hay así necesidad en la técnica de procedimientos y composiciones que proporcionan un espectro selectivo amplio y/o una resistencia específica a herbicidas en cultivos. Los autores de la presente invención han descubierto que se pueden preparar formas variantes de AHAS resistentes selectivamente a herbicidas y plantas que contienen las mismas, mediante modelado basado en la estructura de AHAS contra la piruvato oxidasa (POX), identificando la bolsa o las bolsas que se unen al herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en el modelo de AHAS y diseñando mutaciones específicas que alteran la afinidad del herbicida basado en imidazolinona o sulfonilurea para la bolsa de unión. Estas variantes y plantas no son inhibidas o matadas por herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea y retienen una actividad enzimática de la AHAS suficiente para soportar el crecimiento de los cultivos.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una ilustración de una secuencia de 600 aminoácidos que corresponde a la secuencia de aproximadamente 599 aminoácidos de la acetohidroxi sintasa (AHAS) de *Zea Mays* que se da como ejemplo de una enzima AHAS de una planta. La secuencia no incluye una secuencia de tránsito y la glicina extra es un vestigio de un sitio de escisión de trombina. Los restos Met53, Arg128 y Phe115 se representan en negritas.

La Figura 2 es una ilustración del alineamiento de la secuencia de AHAS de maíz y piruvatooxidasa (POX) de *Lactobacillus planarum*.

La Figura 3 es una representación esquemática de la estructura secundaria de una subunidad de AHAS. Los elementos estructurales secundarios, hélices α y hojas β se representan como círculos y elipses, respectivamente, y están numerados separadamente para cada uno de los tres dominios dentro de una subunidad. Los lazos y las regiones enrolladas se representan con líneas negras, representando los números los comienzos y las terminales aproximados de los elementos. Las localizaciones de los sitios cofactores de unión y los sitios de mutación conocidos se indican por octaedros y estrellas, respectivamente.

ES 2 275 275 T3

La Figura 4 es una ilustración de un modelo generado con ordenador del sitio selectivo de AHAS de maíz con imazetapir (herbicida PURSUIT®) modelado en la bolsa de unión.

La Figura 5 es una ilustración de la homología entre secuencias de aminoácidos de AHAS derivadas de diferentes especies de plantas. PAC751 es isozima de AHAS als 2 de maíz según se expresa del vector de expresión pAC 751 de *E. coli* según la Figura 1; als 2 de maíz es la isozima de AHSA als 2 de maíz; als 1 de maíz es la isozima de AHAS als 1 de maíz; Tobac 1 es la isozima SuRA de AHAS de *tabaco*; Tobac 2 es la isozima SuRB de AHAS de *tabaco*; Athcar 12 es el gen Csr 1.2 de AHS de *Arabidopsis thaliana*; Bnaal 3 es la isozima de AHAS de *Brassica napus*; y Bnaal2 es la isozima de AHAS de *Brassica napus*.

PAC 751 y als 2 de maíz son genes idénticos excepto que als 2 de maíz empieza al comienzo de la secuencia de tránsito y pAC 751 empieza en el sitio N-terminal putativo maduro con una glicina adicional en el terminal N debido a la secuencia de reconocimiento en el vector de expresión pGEX-2T. La glicina de la terminal N no es un aminoácido natural en esa posición.

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de AHAS se generaron por PILEUP (paquete de GCG - Genetics Computer Group, Inc., -University Research Park - Madison-WI). La secuencia de consenso se generó por empaquetamiento PRETTY GCG.

La Figura 6 es una ilustración fotográfica de un gel de SDS-poliacrilamida teñida para proteína que muestra la purificación de AHAS de maíz. Los carriles contienen (de izquierda a derecha): A, marcadores del peso molecular; B, extracto en bruto de células de *E. coli*; C, preparación purificada por afinidad de glutatona-agarosa; D, digestión de trombina de la preparación purificada por afinidad; E, segunda pasada a través de la columna de glutatona-agarosa y filtración de gel de Sefacril S-100.

La Figura 7 es una ilustración gráfica de los resultados de ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de las proteínas de AHAS de tipo salvaje y mutantes en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de imazetapir (herbicida PURSUIT®). El eje Y representa el % de actividad de la enzima mutante, midiéndose el valor de 100% en ausencia de inhibidor.

La Figura 8 es una ilustración gráfica de los resultados de ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de las proteínas de AHAS de tipo salvaje y mutantes en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de sulfometironmetilo (herbicida OUST®). El eje Y representa el % de actividad de la enzima mutante, midiéndose el valor de 100% en ausencia de inhibidor.

La Figura 9 es una ilustración gráfica de los resultados de ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de la proteína de AHAS de *Arabidopsis* de tipo salvaje y la proteína Met124Ile mutante de AHAS mutante de *Arabidopsis* en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de imazetapir (herbicida PURSUIT®) y sulfometironmetilo (herbicida OUST®). El eje Y representa el % de actividad de la enzima mutante, midiéndose el valor de 100% en ausencia de inhibidor.

La Figura 10 es una ilustración gráfica de los resultados de ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de la proteína de AHAS de *Arabidopsis* de tipo salvaje y la proteína Met124Ile de AHAS mutante de *Arabidopsis* en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de imazetapir (herbicida PURSUIT®) y sulfometuronmetilo (herbicida OUST®). El eje Y representa el % de actividad de la enzima mutante, midiéndose el valor de 100% en ausencia de inhibidor.

La Figura 11 es una ilustración gráfica de los resultados de ensayos *in vitro* de la actividad enzimática de la proteína de AHAS de *Arabidopsis* de tipo salvaje y la proteína Arg199Glu de AHAS mutante de *Arabidopsis* en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de imazetapir (herbicida PURSUIT®) y sulfometuronmetilo (herbicida OUST®).. El eje Y representa el % de actividad de la enzima mutante, midiéndose el valor de 100% en ausencia de inhibidor.

La Figura 12 es una ilustración gráfica de un vector de DNA usado para transformación de plantas, que contiene el gen nptII (que codifica la resistencia a la canamicina) bajo el control del promotor 35S y un gen de AHAS (de tipo salvaje o variante) bajo el control del promotor de AHAS de *Arabidopsis*.

La Figura 13 es una fotografía que ilustra el desarrollo de la raíz de plantas de tabaco transformadas con el gen de AHAS de *Arabidopsis* que contiene la mutación de Met124Ile o Arg199Glu y un control no transformado. Las plantas crecieron durante 18 días después de su paso a un medio que contenía imazetapir 0,25 μ M.

La Figura 14 es una fotografía que presenta plantas de tabaco transformadas con el gen de AHAS de *Arabidopsis* que contiene la mutación de Met124Ile, Met124His o Arg199Glu y un control no transformado, sobre las que se había proyectado dos veces la cuantía del campo (100 g/ha) de imazetapir.

La Figura 15 es una fotografía que muestra los resultados de ensayos de germinación realizados en presencia del herbicida CL 299.263 (imazamox), que se realizaron sobre semillas cosechadas de transformantes da plantas de tabaco

ES 2 275 275 T3

primarias que se habían transformado con el gen de AHAS de *Arabidopsis* que contiene la mutación Met124Ile, Met124His o Arg199Glu.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de modelado basado en la estructura para la producción de proteína variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea: El procedimiento incluye:

- (a) alinear una proteína de AHAS diana sobre un molde de piruvato oxidasa para derivar la estructura tridimensional de la proteína de AHAS diana;
- (b) modelar uno o más herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en la estructura tridimensional para localizar una bolsa de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en la proteína de la AHAS diana;
- (c) seleccionar como diana para la mutación al menos una posición de aminoácido en la proteína de AHAS diana, en la que la mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la bolsa de unión;
- (d) mutar DNA que codifica la proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mutación en la posición; y
- (e) expresar el DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la AHAS variante que contiene la mutación en la posición.

El procedimiento puede incluir además:

- (f) expresar DNA que codifica la proteína de AHAS de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
- (g) purificar las proteínas de AHAS de tipo salvaje y de la variante de las células;
- (h) ensayar las proteínas de AHAS de tipo salvaje y la variante en cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxi-butirato en ausencia y presencia del herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea;
- (i) repetir las etapas (c)-(h), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (e) se usa como el DNA que codifica AHAS en la etapa (c) hasta que se identifica una proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene
 - (i) en ausencia del herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea,
 - (a) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o
 - (b) una actividad catalítica en combinación con una proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;en la que la célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y
 - (ii) una actividad catalítica que es más resistente al mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

También se proporciona un procedimiento alternativo de modelado basado en la estructura para la producción de una proteína variante resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea. Este procedimiento incluye:

- (a) alinear una proteína de AHAS diana en un primer molde de AHAS derivado de un polipéptido que tiene la secuencia de la Figura 1 o un equivalente funcional de él para derivar la estructura tridimensional de la proteína de AHAS diana;
- (b) modelar uno o más herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en la estructura tridimensional para localizar una bolsa de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en la proteína de AHAS diana;
- (c) seleccionar como diana para una mutación, al menos una posición del aminoácido en la proteína de AHAS

ES 2 275 275 T3

diana, en la que la mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la bolsa de unión;

- (d) mutar el DNA que codifica la proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mutación en la posición, y
- (e) expresar el DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la AHAS variante que contiene la mutación en la posición.

Este procedimiento puede incluir además:

- (f) expresar DNA que codifica la proteína de AHAS de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
- (g) purificar la proteínas de AHAS de tipo salvaje y la variante de las células;
- (h) ensayar la proteína de AHAS de tipo salvaje y la variante en cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxitirato en ausencia y presencia del herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea;
- (i) repetir las etapas (c)-(h), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (e) se usa como el DNA que codifica la variante de AHAS en la etapa (c) hasta que se identifica una primera proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene
 - (i) en ausencia de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea
 - (a) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o
 - (b) una actividad catalítica en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;
 - en la que la célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y
 - (ii) una actividad catalítica que es más resistente a al menos el mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

En otra realización alternativa, el procedimiento incluye

- (a) alinear una proteína de AHAS diana en un primer molde de AHAS que tiene una bolsa identificada de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea y que tiene la secuencia de la Figura 1 o un equivalente funcional de ella para derivar la estructura tridimensional de la proteína de AHAS diana;
- (b) seleccionar como diana para una mutación, al menos una posición de aminoácido en la proteína de AHAS diana, en la que la mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la bolsa de unión;
- (c) mutar el DNA que codifica la proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mutación en la posición, y
- (d) expresar el DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la AHAS variante que contiene la mutación en la posición.

El procedimiento puede incluir además:

- (e) expresar DNA que codifica la proteína de AHAS diana de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
- (f) purificar la proteína de AHAS de tipo salvaje y la variante de las células;
- (g) ensayar la proteína de AHAS de tipo salvaje y la variante en cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxitirato, en ausencia y en presencia del herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, y
- (h) repetir las etapas (b)-(g), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (d) se usa como el DNA que codifica la AHAS en la etapa (b) hasta que se identifica una proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene

ES 2 275 275 T3

- (i) en ausencia de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea,
- (a) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o
- (b) una actividad catalítica en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;
- en la que la célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y
- (ii) una actividad catalítica que es más resistente a al menos el herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

En realizaciones preferentes de los procedimientos mencionados, la actividad catalítica en ausencia del herbicida es como mínimo de aproximadamente 5% y, muy preferiblemente, es de más de aproximadamente 20% de la actividad catalítica de la AHAS de tipo salvaje. Cuando el herbicida es un herbicida de imidazolinona, la proteína variante de AHAS resistente al herbicida tiene, preferiblemente:

- (i) una actividad catalítica en ausencia del herbicida de más de aproximadamente 20% de la actividad catalítica de la AHAS de tipo salvaje;
- (ii) una actividad catalítica que es relativamente más resistente a la presencia de herbicidas de imidazolinona en comparación con AHAS de tipo salvaje, y
- (iii) una actividad catalítica que es relativamente más sensible a la presencia de herbicidas de sulfonilurea en comparación con herbicidas de imidazolinona.

La presente invención proporciona además DNA aislado que codifica proteínas variantes de acetohidroxiácido sintasa, proteínas variantes que comprenden una proteína de AHAS modificada por

(i) sustitución de al menos un resto de aminoácido diferente de un resto de aminoácido de la secuencia de la Figura 1 seleccionado entre M53, R128, F135 y cualquier combinación de cualquier de los anteriores.

En este sistema de numeración el resto n°. 12 corresponde al término amino putativo de la proteína madura, esto es, después de la eliminación de un péptido que apunta la diana de cloroplasto.

Las modificaciones anteriores están dirigidas a alterar la capacidad de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para inhibir la actividad enzimática de la proteína. En una realización preferente, el DNA aislado codifica una variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea. También se proporcionan vectores de DNA que comprenden DNA que codifica estas variantes de AHAS, las propias proteínas de AHAS variantes, y células, crecidas *in vivo* o en cultivos de células, que expresan las variantes de AHAS o comprenden estos vectores.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para conferir resistencia a un herbicida basado en imidazolinona y/ sulfonilurea en una célula o en unas células y, en particular, una célula o unas células de plantas, como puede ser en una semilla. Se muta un gen de AHAS, preferiblemente el gen de AHAS de *Arabidopsis thaliana*, para alterar la capacidad de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea de inhibir la actividad enzimática de la AHAS. El gen mutante se clona en un vector de expresión compatible y el gen se transfiere a una célula sensible a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en condiciones bajo las cuales se expresa a niveles suficientes para conferir a la célula resistencia a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea.

También se contemplan procedimientos para el control de malas hierbas, en los que se trata un cultivo que contiene un gen de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea de acuerdo con la presente invención, con una cantidad efectiva del herbicida para controlar las malas hierbas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca el diseño racional o el modelado molecular basado en la estructura de versiones modificadas de la enzima AHAS y AHAS que inhiben herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. Estas enzimas modificadas (proteínas variantes de AHAS) son resistentes a la acción de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. La presente invención abarca también DNAs que codifican estas variantes, vectores que incluyen estos DNAs, las proteínas variantes de AHAS y células que expresan estas variantes. Adicionalmente se proporcionan procedimientos para producir resistencia a herbicidas basados en imidazolidinona y/o sulfonilurea en plantas por expresión de estas variantes y procedimientos de control de las malas hierbas. El DNA y las variantes de AHAS de la presente invención se descubrieron en estudios basados en el modelado molecular de la estructura de las AHAS.

Diseño racional basado en la estructura de variantes de AHAS y AHAS que inhiben herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea

Las variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea de acuerdo con la presente invención son útiles por conferir resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en plantas y se pueden diseñar con el modelo de POX.

1. Modelado molecular

Las técnicas de modelado molecular (y en particular, el modelado de homología de proteínas) pueden proporcionar una comprensión de la estructura y la actividad de una proteína dada. El modelo estructural de una proteína se puede determinar directamente a partir de datos experimentales tales como cristalografía de rayos X, indirectamente por modelado de la homología o una característica similar, o mediante combinación de ambos procedimientos (véase White y otros, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:349, 1994). La elucidación de la estructura tridimensional de AHAS proporciona una base para el desarrollo de un esquema racional de la mutación de restos de aminoácidos particulares dentro de la AHAS que confieren al polipéptido resistencia a los herbicidas.

El modelado molecular de la estructura de AHAS de *Zea Mays*, usando como molde la estructura cristalina obtenida por rayos X de la piruvato oxidasa (POX) afín de *Lactobacillus plantarum* proporciona un modelo tridimensional de la estructura de AHAS que es útil para el diseño de variantes de AHAS resistentes a herbicidas o AHAS que inhiben herbicidas. Este procedimiento de modelado aprovecha el hecho de que AHAS y POX comparten varias características bioquímicas y que pueden derivarse de un gen ancestral común (Chang y otros, *J. Bacteriol.* 170:3937, 1988).

Se describe detalladamente más adelante la derivación de un modelo usando gráficos y alineamientos moleculares interactivos. La estructura tridimensional de AHAS que resulta de este procedimiento predice la organización espacial aproximada del sitio activo de la enzima y del sitio o bolsa de unión de inhibidores tales como herbicidas, entre los que están incluidos los herbicidas de imidazolinona, aunque no únicamente. El modelo se afina luego y se reinterpreta basándose en estudios bioquímicos que también se describen más adelante.

El modelado de la homología de proteínas requiere el alineamiento de la secuencia primaria de la proteína en estudio con una segunda proteína cuya estructura cristalina es conocida. Para el modelado de la homología de AHAS se escogió la piruvato oxidasa (POX) porque la POX y la AHAS comparten varias características bioquímicas. Por ejemplo, ambas, AHAS y POX, comparten aspectos de los mecanismos de la reacción enzimática, así como requerimientos en cuanto a cofactor y metal. En ambas enzimas, para la actividad enzimática se requieren pirofosfato de tiamina (TPP), dinucleótido de flavina adenina (FAD) y un catión divalente. El FAD media una reacción redox durante la catálisis en la POX pero, presumiblemente, tiene sólo una función estructural en la AHAS, que posiblemente es resto vestigio de la evolución de la evolución de AHAS desde POX. Ambas enzimas utilizan piruvato como sustrato y forman pirofosfato de hidroxietiltiamina como intermedio de reacción estable (Schloss, J.V. y otros, en *Biosynthesis of branched chain amino acids*, Barak, Z.J.M., Chipman, D.M., Schloss, J.V. (eds.) VCH Publishers, Weinheim, Alemania, 1999).

Adicionalmente, la actividad de AHAS está presente en proteínas quiméricas de POX-AHAS que constan de la mitad N-terminal de POX y la mitad C-terminal de AHAS, y hay un grado pequeño de actividad de AHAS exhibido por la propia POX. AHAS y POX también presentan propiedades similares en solución (Risse, B. y otros, *Protein Science*, 1: 1699 y 1710, 1992; Singh, B.K. y Schmitt, G.K. (1989), *FEBS Letters*, 258: 113; Singh, B.K. y otros (1989), en *Prospects for Amino Acid Biosynthesis Inhibitors in Crop Protection and Pharmaceutical Chemistry*, (Lopping, L.G. y otros, eds., HCPC Monograph p- 87). Al aumentar la concentración de proteína, tanto la POX como la AHAS experimentan transiciones escalonadas de monómeros a dímeros y tetrámeros. Los aumentos de la concentración de FAD inducen también órdenes más altos del conjunto subunidad. La forma tetrámera de ambas proteínas es muy estable al calor y la desnaturalización química.

Además, la estructura cristalina de POX de *Lactobacillus planarum* ha sido resuelta por Muller y otros, *Science* 259:965, 1993. Los autores de la presente invención encontraron que, en parte sobre la base del grado de homología física, bioquímica y genética entre AHAS y POX, se puede usar la estructura cristalina de POX obtenida por rayos X como punto estructural de partida para el modelado de la homología de la estructura de AHAS.

Sin embargo, las secuencias de AHAS y POX de *L. plantarum* no eran suficientemente similares para un alineamiento completamente computarizado. Globalmente, sólo aproximadamente 20% de los átomos son idénticos, mientras que aproximadamente 50% de los restos son de clase similar (esto es, ácidos, básicos, aromáticos, etc.). Sin embargo, si se comparan las secuencias respecto a las clasificaciones de restos hidrófilos e hidrófobos, casan más de 500 de los 600 aminoácidos. Las predicciones de la estructura secundaria de AHAS (Holley y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:152, 1989) revelaron una fuerte similitud con la estructura secundaria real de POX. Para casi el 70% de los restos, la estructura secundaria de AHAS predicha casa con la de POX.

Los monómeros de POX están constituidos por tres dominios, teniendo todos ellos una hoja β central, paralela con pasos superiores que están constituidos por hélices α y unos lazos grandes. (Muller y otros, *Science*, 259:965, 1993). La topología de las hojas difiere entre los dominios, esto es, en los dominios primero y tercero, las cadenas están unidas a la hoja β en la secuencia 2-1-3-4-6-5, mientras que en la hoja β del segundo dominio, la secuencia lee 3-2-1-4-5-6.

ES 2 275 275 T3

Los alineamientos generados con ordenador estaban basados en la predicción de la estructura secundaria y la homología de secuencia. Se usó el procedimiento convencional de alineamiento de secuencia pareada descrito por Needleman y Wunch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970. Se alinearon dos secuencias para maximizar la puntuación del alineamiento. La puntuación de alineamiento (puntuación de la homología) es la suma de puntuaciones de todos los pares de restos alineados más una sanción opcional por la introducción de brechas en el alineamiento. La puntuación del alineamiento de un par de restos es un valor entero tabulado. El sistema de puntuación de la homología está basado en la observación de la frecuencia de la divergencia entre un par dado de restos. (MO Dayhoff, RM Schwartz y BC Orcutt, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supl. 3, págs. 345-362, 1978).

Los alineamientos se afinaron más mediante brechas de redistribución de manera que se conservaran estructuras secundarias regulares continuas. Las sustituciones de aminoácidos generadas por evaluación de esquemas de probable alineamiento se compararon mediante gráficos moleculares interactivos. Se escogieron los alineamientos con las sustituciones más conservadoras con respecto a la funcionalidad particular de los aminoácidos dentro de un sitio dado. En la Figura 2 se representa el alineamiento final de los aminoácidos de POX y AHAS. Se identificaron conjuntos conservados de restos, en particular para el sitio de unión de TPP y para partes del sitio de unión de FAD. El alineamiento reveló una gran similitud entre AHAS y POX para el primer dominio, para la mayoría de las partes del segundo dominio y para aproximadamente la mitad del tercer dominio. Se esperaba que la mayoría de las regiones que se alinearon malamente y pueden plegar de forma diferente en POX y AHAS estuviera en la superficie de la proteína y no estuviera implicada en el cofactor de unión del inhibidor. La predicción de los sitios de mutación no está afectada sustancialmente por pequeños desplazamientos en el alineamiento.

La mayoría de los restos de unión de TPP está altamente conservados entre POX y AHAS (por ejemplo, P48-G49-G50). En algunos casos, los restos que estaban próximos a TPP difieren entre POX y AHAS pero permanecen dentro de una región que está altamente conservada (por ejemplo, restos 90-110). Por otra parte, el sitio de unión de FAD parecía menos conservado. Aunque algunos sitios de unión de FAD estaban fuertemente conservados, (por ejemplo, D325-I326-D327-P328), otros se diferenciaban claramente entre AHAS y POX (por ejemplo, los restos en el lazo de las posiciones 278 a 285 no son homólogos). Un análisis detallado reveló que, al menos para algunos de los sitios de contacto menos conservados, las interacciones estaban mediadas por el espinazo del polipéptido más bien que por las cadenas laterales. Por tanto, la conservación se requería sólo para el pliegue del polipéptido y no se requería para la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, el espinazo de los restos 258-263 une la cadena de robitol de FAD). La mitad de los sitios de unión de la adenina y la isoaloxazina se diferencia claramente.

Después de alinear la estructura primaria, se construyó un modelo de homología por transposición de secuencias de aminoácidos de AHAS en la estructura del molde de POX. Se construyeron coordenadas por defecto escalonadamente usando moldes de aminoácidos para completar cadenas laterales indefinidas. Se usó la investigación de bancos de datos y la minimización energética de partes pequeñas de la molécula para completar las conformaciones de regiones indefinidas de lazo. Los cofactores TPP y FAD se modelaron en sus bolsas de unión. Este modelo se sometió a una minimización completa de energía a 5000 ciclos. Todo el modelado con ordenador se realizó en una estación de trabajo IRIS Indigo Elan R4000 de Silicon Graphics Co. El modelado interactivo y la minimización de energía se realizaron usando Quanta/CHERMm 4.0 de Molecular Simulations Inc. Durante esta etapa, la conformación era estable, lo que indicaba que no se habían presentado interacciones fuertemente desfavorecidas tales como, por ejemplo, contactos próximos a van der Waals. Los resultados se presentan esquemáticamente en la Figura 3.

Características de la estructura de AHAS predicha

La inspección de la estructura de AHAS modelada descrita antes reveló que la mayor parte de la proteína se pliega con un espinazo que es energéticamente razonable, siendo accesible al disolvente la mayor parte de las cadenas laterales hidrófilas. La superficie de las hojas β es suave y acomoda las regiones de paso por encima que están unidas a las hojas.

Se generó un modelo para AHAS dímera por duplicación de coordenadas de la AHAS monómera de energía minimizada y sobreponiendo las dos copias en dos unidades de POX usando pares de coordenadas de $C\alpha$ según se define en el esquema de alineamiento. La cadena de polipéptido de AHAS se pliega entre dominios plegados similarmente compuestos por un núcleo de hoja β paralela de seis cadenas rodeado de "lazos" largos y hélices α . Dos unidades están unidas de manera que el primer dominio de una subunidad está muy próximo a los dominios 2 y 3 de la otra subunidad que unen el cofactor. Entre las subunidades queda en este sitio un espacio lleno de disolvente. Esta bolsa, que queda delimitada por la confluencia de los tres dominios, es el sitio de entrada propuesto para el sustrato. También es el sitio de unión propuesto para herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea.

La superficie interior de la mencionada bolsa de unión está perfilada por los cofactores. El tiazol de TPP está situado en el fondo de la bolsa. El dominio 3 contribuye a la superficie interior de la bolsa con una hélice α corta que dirige su eje hacia el pirofosfato del TPP, compensando las cargas de fosfato con su momento dipolar. Esta hélice crítica, que comienza con G498, un resto "paso" en contacto próximo con TPP y que termina en G498, contiene tres sitios de mutación conocidos para la resistencia a la sulfonilurea: V500, W503 y F507. (Véanse patentes U.S. n.º. 5.013.659, n.º. 5.141.870 y n.º. 5.378.824). En el dominio 1, el lazo definido como P48-S52 (entre la β -cadena 2 y la α -hélice 2) se enfrenta a W503, una mutación en la que confiere resistencia a imidazolinonas. Los restos Y47 a G50 también están en contacto con TPP. Este lazo es adyacente a P184-Q189, otro paso, que conecta la última cadena de la hoja β del dominio 1 con una cadena β que conecta con el dominio 2. Dentro de la bolsa, cerca de su entrada, hay

ES 2 275 275 T3

una región alargada del dominio 1 que interacciona con una extensión complementaria del dominio 2. Los restos 125-129 y 133-137 del dominio 1 y los restos 304-313 del dominio 2 están en la superficie de la bolsa. Un paso constituido por T96-G100 está entre el lazo 125-129 y TPP. En el extremo opuesto de la bolsa hay otra extensión del dominio 3 y dos regiones del dominio 2 que alinean la bolsa de unión. Los restos 572, 575, 582 y 583 del dominio 3 delimitan la superficie de la bolsa en un lado. La parte restante del interior de la superficie de la bolsa está delimitada por FAD y por un lazo, L278-G282, que tiene contacto con el anillo de isoaloxazina de FAD.

2. Modelado de herbicidas en sitios de unión

Se puso imazetapir, la imidazolinona activa de PURSUIT[®], en su sitio de unión propuesto usando un gráfico molecular interactivo (Figura 4) y el soporte lógico descrito antes (Figura 4). Se escogió K185 como un “anclaje” para interaccionar con la carga del grupo carboxilo. La unidad NH-CO de imidazolinona se situó para formar uniones de hidrógeno a G50 y A51. Esto puso el sustituto metilo de imazetapir próximo a V500 en el espinazo de la hélice α pequeña. Posiblemente, el grupo isopropilo está unido a restos hidrófobos de los aminoácidos en la región de los restos 125-135 que contribuyen a la superficie interior de la bolsa. Muy probablemente, el anillo de piridina está “intercalado” entre A134 o F135, F507 y W503. W503 también interactúa con el sistema anular de la imidazolinona.

De manera similar, los herbicidas de sulfonilurea se modelaron en un sitio que se solapaba en parte con el sitio de unión de imidazolinona descrito. El solapamiento de los sitios de unión de la sulfonilurea y la imidazolinona era consistente con experimentos de unión con competición y con los datos mutantes establecidos, lo que revela que la misma mutación en el maíz, W503L, puede conferir resistencia a ambos herbicidas. En estos modelos, la mayoría de los sitios de mutación conocidos que confieren resistencia a herbicidas de sulfonilurea, esto es, G50, A51, K185, V500, W503, F507, está en contacto íntimo con los herbicidas unidos. P126 y A51 son requeridos para mantener en su sitio la cadena lateral de K185 generando un poro hidrófobo. S582, un sitio para resistencia específica a la imidazolinona, está alejado de la región de unión y está situado en la región en la que la homología es tan baja que es de esperar un cambio del pliegue. Aparentemente, el sitio de unión de FAD tiene una homología baja entre AHAS y POX en esta región; S582 es un resto que confiere resistencia en el maíz y S582 y sus restos adyacentes están en contacto íntimo con la bolsa del sitio activo. Se propone que FAD y la región del lazo que abarca los restos 278 a 285 se separen ligeramente del tercer dominio (hacia abajo en la Figura 4) y que un lazo que contiene S582 se pliegue al espacio entre la hélice en las posiciones 499 a 507 y el lazo en las posiciones 278 a 285. D305, otro sitio de resistencia conocido, está próximo a FAD y modula la interacción entre los dominios 1 y 2. M280 puede estar implicado en situar la hélice en las posiciones 498 a 507 o directamente en unir un inhibidor. M280 y D305 podrían también estar implicados directamente en unir un inhibidor si los dominios 1 y 2 se acercaran entre sí ligeramente más próximos.

3. Selección de mutaciones

Los restos de aminoácidos específicos están indicados precisamente como sitios para la introducción de mutaciones en la secuencia primaria de AHAS. Estos aminoácidos se seleccionan sobre la base de su posición en la que, si se modifica la posición ese aminoácido, habrá una alteración resultante (esto es, una caída) de la afinidad del herbicida a la bolsa de unión. No es necesario que la posición de mutación resida en la bolsa de unión, puesto que restos de aminoácidos fuera de la propia bolsa pueden alterar la carga o la configuración de la bolsa. La selección de sitios diana para mutación se consigue usando modelos moleculares como se ha descrito antes. Por ejemplo, de acuerdo con el modelo anterior, se sitúa arginina de la posición 128 (designada R128 en la Figura 1 usando el código de letra individual para los aminoácidos) cerca de la entrada a la bolsa de unión al sustrato y la bolsa de unión al herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea y tiene un grado alto de libertad de conformación que permite que participe en el transporte de herbicidas cargados a la bolsa de unión. Por tanto, este resto se sustituye por alanina para eliminar su carga y su cadena lateral hidrófoba larga. La mutación resultante se designa R128A.

Las mutaciones pueden comprender sustituciones simples que reemplazan la secuencia de tipo salvaje con cualquier otro aminoácido. Alternativamente, las mutaciones pueden comprender supresiones o adiciones de uno o varios aminoácidos, preferiblemente hasta 5 aminoácidos, en un sitio dado. La secuencia añadida puede comprender una secuencia de aminoácidos que se sabe que existe en otra proteína, o puede comprender una secuencia completamente sintética. Además, en un polipéptido individual se pueden introducir más de un aminoácido y/o más de un tipo de mutación.

4. Mutagénesis dirigida al sitio

El DNA que codifica AHAS se puede manipular de manera que se introduzcan las mutaciones deseadas. La mutagénesis se realiza usando procedimientos que son convencionales en la técnica según se describe, por ejemplo, por Higuchi, R., *Recombinant PCR*, en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A. y otros, eds., Academic Press. Págs. 177-183, 1990.

5. Expresión y purificación de variantes

La secuencia de AHAS mutada o variante se clona en un vector de expresión de DNA (véase, por ejemplo, Ejemplo 3) y se expresa en una célula adecuada tal como, por ejemplo, *E. coli*. Preferiblemente, el DNA que codifica AHAS se une a un elemento regulador de transcripción y la AHAS variante se expresa como parte de una proteína de fusión, por ejemplo, glutatona-S-transferasa, para facilitar la purificación (véase el Ejemplo 3 más adelante.) La AHAS variante se

ES 2 275 275 T3

purifica luego por cromatografía de afinidad o por cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. “Purificación” de un polipéptido de AHAS se refiere al aislamiento del polipéptido de AHAS en una forma que permite medir su actividad enzimática sin interferencias de otros componentes de la célula en la que se expresa el polipéptido.

5 6. Ensayo de propiedades enzimáticas

La AHAS purificada se puede ensayar en cuanto a una o varias de las propiedades siguientes:

10 (a) actividad específica o catalítica para la conversión de piruvato en acetolactato (expresada como unidades/mg de AHAS pura, definiéndose una unidad de actividad como 1 μ mol de acetolactato producido/hora), o para la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxitirato (expresada como unidades/mg de AHAS pura, definiéndose una unidad de actividad como 1 μ mol de acetohidroxitirato producido/hora;

15 (b) nivel de inhibición por un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, por ejemplo, imidazolinona (expresada como IC₅₀, la concentración a la que se inhibe el 50% de la actividad de la enzima), y

20 (c) selectividad de la resistencia al herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea frente a otros herbicidas. El índice de selectividad se define como la resistencia al plegado del mutante a imidazolinonas en relación a la enzima de tipo salvaje dividida por la resistencia al plegado del mismo mutante a otros herbicidas también en relación a la del tipo salvaje. La resistencia al plegado a un herbicida en relación a la enzima de tipo salvaje se expresa como la IC₅₀ de la variante dividida por la IC₅₀ del tipo salvaje. Por tanto, el índice de selectividad (S.I.) se representa por la ecuación siguiente:

$$25 \quad \text{S.I.} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ de la variante para el herbicida A} / \text{IC}_{50} \text{ del tipo salvaje para el herbicida A}}{\text{IC}_{50} \text{ de la variante para el herbicida B} / \text{IC}_{50} \text{ del tipo salvaje para el herbicida B}}$$

Los sistemas de ensayo adecuados para hacer estas determinaciones incluyen aunque no únicamente, los descritos detalladamente en el siguiente Ejemplo 4.

30 7A, Evaluación de variantes adecuadas

Las propiedades enzimáticas de polipéptidos de AHAS variantes se comparan con las de AHAS de tipo salvaje. Preferiblemente, una mutación dada da por resultado un polipéptido de AHAS variante que retiene *in vitro* la actividad enzimática hacia piruvato o piruvato y 2-cetobutirato, esto es, la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxitirato (y por ello se espera que sea biológicamente activa *in vivo*), mientras que tiene una actividad catalítica que es relativamente más resistente al (los) herbicida(s) seleccionado(s) que la de AHAS de tipo salvaje. Preferiblemente, la AHAS variante exhibe:

40 (i) en ausencia del herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea presente como mínimo,

(a) sola, una actividad catalítica suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa; o

45 (b) en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a herbicidas también expresada en la célula, que puede ser la misma proteína variante de AHAS o una diferente, una actividad catalítica suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa,

en la que la célula requiere la actividad de AHAS para su viabilidad, y

50 (ii) una actividad catalítica que es más resistente al herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea presente como mínimo que la AHAS de tipo salvaje,

y que es relativamente más resistente al (los) herbicida(s) basado(s) en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

55 Por tanto, una proteína cualquiera variante específica de AHAS no necesita tener la actividad catalítica total necesaria para mantener la viabilidad de la célula, sino que debe tener alguna actividad catalítica en una cuantía, sola o en combinación con la actividad catalítica de copias adicionales de la misma variante de AHAS y/o la actividad catalítica de otra(s) proteína(s) variante(s) de AHAS, suficiente para mantener la viabilidad de una célula que requiere la actividad de AHAS para su viabilidad. Por ejemplo, la actividad catalítica se puede aumentar a niveles mínimos aceptables en la célula, introduciendo en la célula múltiples copias de un gen que codifica una variante o introduciendo el gen que además incluye un promotor relativamente fuerte para intensificar la producción de la variante.

65 Más resistente significa que la actividad catalítica de la variante es disminuida por el (los) herbicida(s) basado(s) en imidazolinona y/o sulfonilurea, si disminuye, en un grado menor que el grado en que es disminuida por el (los) herbicida(s) basado(s) en diazolinona y/o sulfonilurea la actividad catalítica de AHAS de tipo salvaje. Una variante preferida de AHAS más resistente retiene la actividad catalítica suficiente para mantener la viabilidad de una célula, una planta o un organismo en el que la misma concentración del (los) mismo(s) herbicida(s) basados(s) en imidazoli-

ES 2 275 275 T3

nona y/o sulfonilurea no retendría suficiente actividad catalítica para mantener la viabilidad de la célula, la planta o el organismo.

5 Preferiblemente, la actividad catalítica en ausencia de herbicida(s) basado(s) en imidazolinona y/o sulfonilurea es como mínimo de aproximadamente 5% y, muy preferiblemente, es de más de aproximadamente 20% de la actividad catalítica de la AHAS de tipo salvaje en ausencia de herbicida(s) basado(s) en diazolinona y/o sulfonilurea. Las variantes de AHAS muy preferidas son más resistentes a herbicidas de imidazolinona que otros herbicidas tales como los herbicidas basados en sulfonilurea, aunque en algunas aplicaciones ni son necesarias ni preferidas.

10 En el caso de una AHAS variante resistente a imidazolinona, se prefiere que la proteína de la variante de AHAS tenga:

15 (i) una actividad catalítica en ausencia del mencionado herbicida de más de aproximadamente 20% de la actividad catalítica de la mencionada AHAS de tipo salvaje;

(ii) una actividad catalítica que es relativamente más resistente a la presencia de herbicidas de imidazolinona en comparación con la de AHAS de tipo salvaje, y

20 (iii) una actividad catalítica que es relativamente más sensible en presencia de herbicidas de sulfonilurea en comparación con la de herbicidas de imidazolinona. La mayoría de variantes de AHAS muy preferidas resistentes a herbicidas presentan una actividad específica mínima de aproximadamente 20 unidades/mg, una inhibición mínima o ninguna inhibición por la imidazolinona y un índice de selectividad que varía de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 3000 en relación a otros herbicidas.

25 Sin que ello suponga un condicionamiento teórico, se cree que la aplicación sistemática e iterativa de este procedimiento para proteína de AHAS de tipo salvaje y otras AHAS diana dará por resultado la producción de variantes de AHAS que tienen las propiedades deseadas de una alta actividad enzimática según se ha explicado antes y resistencia a una clase o varias clases de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. Por ejemplo, la mutación de una secuencia de AHAS de tipo salvaje en una posición particular a un aminoácido dado puede dar por resultado un mutante que exhibe un grado alto de resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, pero que tiene una pérdida significativa de actividad enzimática a piruvato y 2-cetobutirato. En una segunda aplicación del procedimiento anterior, el polipéptido de AHAS de partida o diana sería luego esta variante (en vez de la AHAS de tipo salvaje). El diseño racional implica luego la sustitución de otros aminoácidos en la posición originalmente mutada y/o la adición o supresión de aminoácidos en puntos o intervalos seleccionados en espera de que se retenga la resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea pero que se mantenga un nivel más alto de actividad enzimática.

El diseño racional basado en la estructura de proteínas de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea ofrece muchas ventajas sobre otros enfoques que descansan en mutagénesis al azar y selección. Por ejemplo, cuando la sustitución de un aminoácido particular con otro requiere la sustitución de más de un nucleótido en el codón, la probabilidad de que esto se produzca al azar es tan baja, que es impracticable. A diferencia, se pueden realizar fácilmente incluso cambios dobles o triples en la secuencia de nucleótido dentro del codón cuando lo sugieren criterios de diseño racional. Por ejemplo, una mutación diseñada racionalmente para conferir resistencia selectiva a imidazolinona requiere un cambio de arginina a glutamato. La arginina es codificada por CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG, mientras que el glutamato es codificado por GAA y GAG. Puesto que ninguno de los codones de la arginina comienza con GA, esta mutación requeriría una doble sustitución de nucleótidos adyacentes que se produciría tan raramente usando mutagénesis al azar que sería impredecible e irrepetible con un cierto éxito. Aunque la frecuencia de mutación se puede aumentar durante la mutagénesis al azar, las alteraciones de la secuencia tendrían una probabilidad igual de que se presentaran en el gen de AHAS, en ausencia de una anterior dirección al sitio de las mutaciones. Esto aumenta la probabilidad de obtener una mutación irrelevante que interfiere con la actividad enzimática. Análogamente, sería raro, usando mutagénesis al azar, encontrar una mutación por sustitución, supresión o sustitución/supresión de múltiples aminoácidos que confiriera resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea a la vez que se mantiene la actividad catalítica. Serían también improbables, usando un enfoque de mutagénesis al azar, mutaciones por supresión que confirieran resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. Sería necesario que las supresiones estuvieran limitadas a regiones pequeñas y tendrían que presentarse en tripletes de manera que retuvieran el marco de lectura de AHAS con el fin de retener la actividad enzimática.

30 Sin embargo, con un criterio racional basado en la estructura, las mutaciones por sustitución y/o supresión de aminoácidos se logran fácilmente y se apuntan como dianas con precisión. Además, diferentes mutagenes usados en la mutagénesis al azar crean tipos específicos de mutaciones. Por ejemplo, la azida sódica crea mutaciones por sustitución puntual en plantas, mientras que la radiación tiende a crear supresiones. Consecuentemente, tendrían que emplearse dos protocolos de mutagénesis para obtener una combinación múltiple de sustitución/supresión.

65 Finalmente, el presente procedimiento basado en la estructura para el diseño racional de variantes de AHAS resistentes a herbicidas permite la mejora iterativa de mutaciones de resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, una etapa que no es facilitada por la mutagénesis al azar. La identificación de un sitio de mutación para resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea por mutagénesis al azar puede ofrecer un valor pequeño, si ofrece alguno, para guiar más mejoras en las características del mutante. El presente enfoque basado en la

ES 2 275 275 T3

estructura, por otra parte, permite implantar mejoras basadas en la posición, el medio y la función de la posición de aminoácidos en el modelo estructural.

5 El procedimiento de mejora iterativa también permite la manipulación independiente de tres propiedades importantes de AHAS: nivel de resistencia, selectividad de la resistencia y eficiencia catalítica. Por ejemplo, se pueden diseñar de forma predictiva mutaciones compensatorias. Si una mutación particular tiene un efecto perjudicial sobre la actividad de una enzima, para restaurar la actividad se puede usar una segunda mutación compensatoria. Por ejemplo, se puede compensar introduciendo una segunda mutación, un cambio de la carga neta dentro de un dominio cuando se introduce o se pierde un resto cargado debido a una mutación. La predicción de la posición y el tipo de resto(s) a introducir, suprimir o sustituir en un segundo sitio con el fin de restablecer la actividad enzimática requiere el conocimiento de las relaciones de estructura-función derivadas de un modelo tal como el descrito aquí.

Variantes de AHAS resistentes a herbicidas: DNA, vectores y polipéptidos

15 La presente invención abarca también moléculas de DNA aisladas que codifican polipéptidos de AHAS variantes resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. Los genes que codifican polipéptidos de AHAS de acuerdo con la presente invención pueden derivar de cualquier especie y preferiblemente de especies de plantas, y las mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea se pueden introducir en posiciones equivalentes dentro de cualquiera de estos genes de AHAS. La equivalencia de una posición de codón dada en diferentes genes de AHAS es función de la conservación de la secuencia primaria de aminoácidos y su proteína y la retención de la estructura tridimensional similar. Por ejemplo, la Figura 5 ilustra el alto grado de homología de secuencia entre polipéptidos de AHAS derivados de diferentes especies de plantas. Estos polipéptidos de AHAS presentan como mínimo de aproximadamente 60% a aproximadamente 70% de homología global. Sin que eso signifique un condicionamiento teórico, se cree que la conformación de la cadena de polipéptido se conservará también en las regiones del polipéptido que tienen una secuencia altamente conservada. Así, es posible usar una secuencia que codifica AHAS de una especie para modelado molecular para introducir previsiblemente mutaciones en un gen de AHAS de una segunda especie para ensayo inicial y mejora iterativa y, finalmente, para introducir mutaciones optimizadas en AHAS derivada de una tercera especie de planta para expresión en una planta transgénica.

30 En una serie de realizaciones, estos DNAs de AHAS codifican variantes de un polipéptido de AHAS y preferiblemente del polipéptido de AHAS de maíz de la Figura 1, en la que el polipéptido es modificado por sustitución o supresión de restos de aminoácidos.

35 La presente invención abarca DNA y las correspondientes secuencia de RNA, así como secuencias de sentido y antisentido. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de AHAS pueden estar flanqueadas por secuencias reguladoras naturales de AHAS, o pueden estar asociadas con secuencias heterólogas, incluidos promotores, agentes de intensificación, elementos de respuesta, secuencias de señalización, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificadoras de 5' y 3', etc. Además, los ácidos nucleicos se pueden modificar para alterar la estabilidad, la solubilidad. La afinidad y la especificidad. Por ejemplo, se pueden metilar selectivamente AHAS variantes que codifican secuencias. Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención también se pueden modificar con una marca capaz de proporcionar una señal detectable, directa o indirectamente. Entre los ejemplos de marcadores están incluidos radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, etc.

45 La invención proporciona también vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican variantes de AHAS. Se han descrito numerosos vectores, incluidos vectores de plásmidos y de hongos para expresión en una variedad de huéspedes eucarióticos y procarióticos. Los vectores pueden incluir también ventajosamente un promotor operativamente unido a la porción que codifica AHAS. La AHAS codificada puede expresarse usando cualesquier vectores adecuados y células huésped, por procedimientos descritos o citados aquí o conocidos por los expertos en la técnica relevante. Entre los ejemplos de vectores adecuados están incluidos, aunque no limitativamente, vectores basados en pBIN, vectores pBluescript y vectores pGEM.

55 La presente invención también abarca polipéptidos de AHAS variantes resistentes a ambos herbicidas o fragmentos peptídicos de ellos. Como se ha explicado antes, los polipéptidos de AHAS variantes pueden derivar del polipéptido principal de maíz representado en la Figura 1 o de cualquier planta o polipéptido microbiano de AHAS, preferiblemente cualquier polipéptido de AHAS de plantas. Los polipéptidos se pueden modificar más mediante, por ejemplo, fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación u otras modificaciones de proteínas. Los polipéptidos se pueden aislar de plantas o de organismos heterólogos o células (incluidas, aunque no únicamente, células de bacterias, levaduras, insectos, plantas y de mamífero) en los que se ha introducido y expresado el gen que codifica un polipéptido de AHAS variante. Además, los polipéptidos de AHAS se pueden modificar con un marcador capaz de proporcionar una señal detectable, directa o indirectamente, incluidos radioisótopos, compuestos fluorescentes, etc.

Plantas y plantas que contienen genes de AHAS variantes, resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea

65 La presente invención abarca células transgénicas, incluidas, aunque no únicamente, semillas, organismos y plantas en las que se han introducido genes que codifican variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. En la Tabla 1 se dan ejemplos no limitativos de plantas receptoras adecuadas.

ES 2 275 275 T3

TABLA 1

Plantas receptoras

5

Nombre vulgar	Familia	Nombre latino
Maíz	Gramíneas	Zea mays
Maíz dentiforme	Gramíneas	Zea mays dentiformis
Maíz blando	Gramíneas	Zea mays vulgaris
Maíz de rosetas	Gramíneas	Zea mays microsperma
Maíz amiláceo	Gramíneas	Zea mays amylácea
Maíz dulce	Gramíneas	Zea mays amyleasaccharata
Maíz dulce	Gramíneas	Zea mays saccharata
Maíz ceroso	Gramíneas	Zea mays ceratina
Trigo espelta	Poáceas	Triticum spelta
Trigo moruno	Poáceas	Triticum durum
Trigo redondillo	Poáceas	Triticum turgidum
Trigo de escaña mayor	Poáceas	Triticum spelta
Trigo polaco	Poáceas	Triticum polonium
Trigo almidonero	Poáceas	Triticum turgidum
Trigo escaña menor	Poáceas	Triticum monococcum
Trigo de esprilla	Poáceas	Triticum monococcum
Trigo blando	Poáceas	Triticum aestivium
Arroz	Gramíneas	Oryza sativa
Arroz salvaje americano	Gramíneas	Zizania aquatica
Arroz australiano	Gramíneas	Oryza australiensis
Arroz indio	Gramíneas	Zizania aquatica
Arroz rojo africano	Gramíneas	Oryza glauaberrima
Arroz tuscarora	Gramíneas	Zizania aquatica
Arroz africano occidental	Gramíneas	Oriza glauaberrima

55

Nombre vulgar	Familia	Nombre latino
Cebada	Poáceas	Hordeum vulgare
Cebada, intermedio abisinio, También irregular	Poáceas	Hordeum irregulare

65

ES 2 275 275 T3

5	Cebada espontánea	Poáceas	Hordeum spontaneum
	Cebada sin aristas	Poáceas	Hordeum trifurcatum
	Cebada egipcia	Poáceas	Hordeum trifurcatum
	Cebada vulgar poliística	Poáceas	Hordeum vulgarepolystichon
10	Cebada hexaística	Poáceas	Hordeum hexastichon
	Cebada dística	Poáceas	Hordeum distichon
15	Algodón abroma	Dicotiledóneas	Abroma augusta
	Algodón, de tierras altas de América	Malváceas	Gossypium hirsutum
20	Algodón de árbol asiático, también de árbol indio	Malváceas	Gossypium arboreum
25	Algodón brasileño o de Kidney y Pernambuco	Malváceas	Gossypium barbadense brasilense
	Algodón de Levante	Malváceas	Gossypium herbaceum
30	Algodón de seda larga, también de fibra larga, de Sea Island	Malváceas	Gossypium barbadense
35	Algodón mejicano o de fibra corta	Malváceas	Gossypium hirsutum
40	Haba de soja, soja	Leguminosas	Glycine max
	Remolacha azucarera	Quenopodiáceas	Beta vulgaris altissima
	Caña de azúcar	Plantas leñosas	Arenga pinnata
45	Tomate	Solanáceas	Lycopersicon esculentum
	Tomate cherry	Solanáceas	Lycopersicon esculentum cerasiforme
50			

55	Nombre vulgar	Familia	Nombre latino
	Tomate común	Solanáceas	Lycopersicon esculentum commune
60	Tomate con umbelas	Solanáceas	Lycopersicon pimpinelli-

65

ES 2 275 275 T3

5	Tomate de invierno	Solanáceas	Physalis ixocarpa
	Tomate solano	Solanáceas	Solanum incanum
	Tomate de pera	Solanáceas	Lycopersicon esculentum pyriforme
10	Tomate de árbol	Solanáceas	Cyphomandra betacea
15	Patata	Solanáceas	Solanum tuberosum
20	Batata	Convolvuláceas	Ipomoea batatas
	Centeno común	Poáceas	Secale cereale
	Centeno de monte	Poáceas	Secale montanum
25			
	Pimiento	Solanáceas	Capsicum annuum grossum
30	Cayena	Solanáceas	Capsicum annum minimum
35	Pimiento de bonete	Solanáceas	Capsicum sinense
	Pimiento dulce	Solanáceas	Capsicum annum grossum
40	Pimiento cherry	Solanáceas	Capsicum annum cerasiforme
45	Pimiento de hojas	Solanáceas	Capsicum annum fasciculatum
	Pimiento ají	Solanáceas	Capsicum annum conoides
50	Pimiento afrutado	Solanáceas	Capsicum frutescens
	Pimiento largo	Solanáceas	Capsicum frutescens longum
55			

60	Nombre vulgar	Familia	Nombre latino
	Pimiento arrugado	Solanáceas	Capsicum annum abbreviatum
65	Tabasco	Solanáceas	Capsicum annum

ES 2 275 275 T3

		conoides
5	Lechuga	Lactuca sativa
	Lechuga de tallo	Lactuca sativa asparagina
	Lechuga espinosa	Lactuca perennis
10	Lechuga azul, achicoria	Lactuca pulchella
	Lechuga de cogollo	Lactuca sativa capitata
15	Lechuga de hoja larga	Lactuca sativa longifolia
	Lechuga de hoja rizada	Lactuca sativa crispa
20	Apio	Apium graveolens dulce
	Apio de jardín	Apium graveolens dulce
	Apio cañarejo	Apium graveolens rapaceum
25		
	Berenjena	Solanum melongena
30		
	Sorgo	All crop species
35		
	Alfalfa	Medicago sativum
40		
	Zanahoria	Daucus carota sativa
45		
	Haba	Phaseolus vulgaris vulgaris
	Col de Bruselas	Phaseolus aureus
	Frijol	Canavalia ensiformis
50	Habichuela	Vicia faba
	Judía	Phaseolus vulgaris

Nombre vulgar	Familia	Nombre latino	
60	Haba egipcia	Leguminosas	Dolichos lablab
	Haba larga	Leguminosa	Vigna sesquipedalia
	Haba lobada	Leguminosas	Psophocarpus tetragono-

65

ES 2 275 275 T3

			lobus
5	Avena	Avena	Sativa
	Avena negra	Avena	Strigosa
10	Avena erizada	Avena	
	Guisante	Leguminosas	Pisum, sativum sativum
15	Guisante de ojo negro	Leguminosas	Vigna sinensis
	Guisantre abro	Leguminosas	Vigna sativum axpium
	Guisante sabroso	Leguminosas	Pisum sativum speciosum
20	Guisante de flor púrpura	Leguminosas	Tetragonolobus purpureus
	Guisante medular	Leguminosas	Pisum sativum medullare
25	Girasol	Compuestas	Heliantus annuus
	Calabaza grande	Dicotiledóneas	Cucurbita maxima
30	Calabaza de San Juan	Dicotiledóneas	Cucurbita pepo melepepo
	Calabaza bonetera	Dicotiledóneas	Cucurbita maxima turbani- formis
35			
	Pepino	Docotiledóneas	Cucumis sativus
40	Pepinillo amargo		Momordica charantia
	Elaterio		Ecballium elaterium
	Pepino salvaje		Cucumis anguria
45			
	Álamo de California	Plantas leñosas	Populus trichocarpa
50	Álamo negro		Populus nigra
	Álamo gris		Populus canescens
	Álamo lombardo		Populus italica
55	Álamo blanco		Populus alba

60	Nombre vulgar	Familia	Nombre latino
	Álamo occidental		Populus trichocarpa
65			

	Tabaco	Solanáceas	Nicotiana
5	Arabidopsis thaliana	Crucíferas	Arabidopsis thaliana
10	Hierba para césped Hierba para césped	Lolio Agrostis	
15		Otras familias de hierbas para césped	
20	Trébol	Leguminosas	

25 La expresión de los polipéptidos de AHAS variante en plantas transgénicas confiere un nivel de resistencia alto a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, incluido imazetapir (PURSUIT®), permitiendo el uso de estos herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea durante el cultivo de las plantas transgénicas.

30 Los procedimientos para introducir genes foráneos en plantas son conocidos en la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de tales procedimientos están incluidos infección por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas, tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG), electroporación de protoplastos, microinyección, macroinyección, inyección de siembra, paso de un tubo de polen, incorporación de semilla seca, perforación con láser y electroforesis. Estos procedimientos son descritos, por ejemplo, por B. Jenes y otros, y S.W. Ritchie y otros, en *Transgenic Plants*, vol. 1, *Engineering and Utilization*, ed. S.D. Kung, R. Wu, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich 1993; y L. Mannonen y otros, *Critical Reviews in Biotechnology*, 14:287-310, 1994.

35 En una realización preferente, el DNA que codifica una AHAS variante se clona en un vector de DNA que contiene un gen de marcador de resistencia a antibióticos, y el AHAS-DNA que contiene el plásmido se introduce en *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un plásmido de Ti. Este "sistema de vector binario" se describe en por ejemplo, la patente U.S. nº. 4.490.838 y por An y otros en *Plant Mol. Biol. Manual* A3:1-19 (1988). El *Agrobacterium* transformado se cocultiva luego con discos de hojas de la planta receptora para posibilitar la infección y transformación de las células de la planta. Las células transformadas de la planta se cultivan luego en el medio de regeneración, que promueve la formación de vástagos, primeramente en presencia del antibiótico apropiado para seleccionar células transformadas, luego en presencia de herbicida. En células de plantas transformadas satisfactoriamente con DNA que codifica AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, la formación de vástagos se produce 45 incluso en presencia de niveles de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que inhiben la formación de vástagos de células no transformadas. Después de confirmar la presencia de DNA de AHAS variante usando, por ejemplo, el análisis por reacción en cadena de polimerasa (PCR), las plantas transformadas se ensayaron en cuanto a su capacidad de resistir la aplicación por proyección de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea y en cuanto a su capacidad para la germinación de semillas y la iniciación de la raíz y la proliferación en presencia de 50 herbicida.

Otras aplicaciones

55 Los procedimientos y las composiciones de presente invención se pueden usar en el diseño racional basado en la estructura de variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, que se pueden incorporar en plantas para conferir a las plantas una resistencia selectiva a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea.

60 Los genes de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea se pueden transformar en cultivos en copias individuales o múltiples para conferir resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea. La ingeniería genética de especies de cultivos con una sensibilidad reducida a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea puede:

65 (1) aumentar el espectro y la flexibilidad de aplicación de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, ambientalmente benignos;

(2) intensificar el valor comercial de estos herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea;

ES 2 275 275 T3

(3) reducir la presión de malas hierbas en campos de cultivo por uso efectivo de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea sobre las especies de cultivos resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea y aumentar correspondientemente los rendimientos de las cosechas;

5 (4) aumentar las ventas de semillas de plantas resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea;

(5) aumentar la resistencia a daños de cultivos debidos a la aplicación de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en una plantación anterior;

10 (6) disminuir la susceptibilidad a cambios en las características de herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea debidos a condiciones climáticas adversas, y

(7) aumentar la tolerancia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea aplicados no homogéneamente o mal aplicados.

15 Por ejemplo, se pueden cultivar plantas que contienen proteínas de variantes transgénicas de AHAS. El cultivo se puede tratar con el herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea al que es resistente la planta transgénica de variante de AHAS en una cantidad efectiva para controlar las malas hierbas, lo que da por resultado el control de las malas hierbas en el cultivo sin afectar perjudicialmente al cultivo.

20 Los vectores de DNA descritos antes que codifican variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en diazolinona y/o sulfonilurea se pueden utilizar de manera que la expresión de la variante de AHAS proporcione un marcador seleccionable para la transformación de las células por el vector. Las células receptoras en cuestión pueden estar en un cultivo o *in situ* y los genes de las variantes de AHAS pueden usarse solos o en combinación con otros marcadores seleccionables. El único requerimiento es que la célula receptora sea sensible a los efectos citotóxicos del herbicida cognado. Esta realización se aprovecha ventajosamente del bajo coste y la carencia de toxicidad de los herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, y se puede aplicar en cualquier sistema que requiera una transformación mediada por DNA.

30 Ejemplos de realizaciones preferentes

Ejemplo 1

Diseño de variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea

35 Para la mutagénesis se seleccionaron restos situados en la proximidad del sitio de unión del herbicida basado en diazolinona y/o sulfonilurea con el fin de diseñar un polipéptido activo de AHAS con una capacidad disminuida de unión del herbicida basado en diazolinona y/o sulfonilurea. Cada sitio de la superficie de la bolsa se consideró en términos de interacciones potenciales con otros restos de la bolsa, así como con cofactores y herbicidas basados en diazolinona y/o sulfonilurea. Por ejemplo, se esperaba que la adición de resto(s) cargado(s) positivamente interfiriera con la distribución de la carga dentro del sitio de unión, dando por resultado una pérdida de la afinidad de unión del herbicida basado en diazolinona y/o sulfonilurea.

Se identificaron tres restos como las dianas más útiles para la mutagénesis:

45 (1) se consideró que F135 interacciona con el anillo de isoaloxazina de FAD y con el grupo aromático de los herbicidas. De acuerdo con la estrategia de introducir restos más cargados en la bolsa de unión, este resto se cambió a arginina.

50 (2) M53 tiene contacto con la hélice 498-507. Esta hélice contiene sitios de mutación conocidos de resistencia a herbicidas y también está implicada en la unión de TPP. Además, se creía que la sustitución del ácido glutámico en la posición 53 favorece una interacción con K185, reduciendo la afinidad de K158 para el grupo carboxilato de imazetapir.

55 (3) R128 está situado cerca de la entrada a la bolsa, donde se creía que estaba implicado en el transporte inicial a la bolsa de unión de herbicidas basados en diazolinona y/o sulfonilurea cargados. Este resto se cambió a alanina para eliminar tanto su carga como su cadena lateral hidrófoba larga.

Ejemplo 2

60 *Mutagénesis de AHAS dirigida al sitio para producir variantes resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea*

El gen de AHAS de *Arabidopsis* se insertó en marco al extremo 3' de la región de codificación del gen de glutatona S-transferasa en el vector pGEX-2T (Pharmacia). La construcción del vector de esta manera mantenía la secuencia de reconocimiento de seis aminoácidos de trombina en la unión de la proteína de fusión expresada glutatona-S-transferasa (GST)/AHAS. La digestión de trombina de la mencionada proteína de fusión expresada da por resultado una proteína de AHAS con una posición de partida N-terminal en el extremo del péptido de tránsito en un sitio de

ES 2 275 275 T3

tratamiento del péptido de tránsito putativo, con una glicina N-terminal residual derivada del sitio de reconocimiento de trombina. El terminal final amino de la proteína de AHAS escindida está constituida por Gly-Ser-Ser-Ile-Ser. En el gen de AHAS en este vector se introdujeron mutaciones dirigidas al sitio.

5 Se construyeron mutaciones dirigidas al sitio de acuerdo con el procedimiento de PCR de Higuchi (*Recombinant PCR*. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, por MA Innis y otros, Academic Press, San Diego, págs. 177-183, 1990). Se amplificaron dos productos de PCR, cada uno de los cuales solapa el sitio de mutación. Los cebadores de la región de solapamiento contenían la mutación. Los fragmentos amplificados de PCR de solapamiento se combinaron, desnaturalizaron y se dejó que se reanillaran conjuntamente, produciéndose dos posibles productos heterodúplex que separan los extremos 3'. Los extremos 3' separados se extendieron por Taq DNA-polimerasa para producir un fragmento que era la suma de los dos productos de PCR de solapamiento que contenían la mutación deseada. Una posterior reamplificación de este fragmento con sólo los dos cebadores "externos" dio por resultado el enriquecimiento del producto de longitud entera. El producto que contenía la mutación se reintrodujo en el gen de AHAS de *Arabidopsis* en el vector pGEX-2T.

15 Ejemplo 3

Expresión y purificación de variantes de AHAS

20 A. Procedimientos

Células de *E. coli* (DH5 α) transformadas con el vector pGEX-2T que contenía gen de AHAS de tipo salvaje de maíz (designación del vector pAC751), el mutante Ser653Asn de *Arabidopsis* o el mutante Ile401Phe de *Arabidopsis* se dejaron crecer durante la noche en un caldo de cultivo que contenía 50 μ g/ml de ampicilina. El cultivo nocturno de *E. coli* se diluyó 1:10 en 1 l de LB, 50 μ g/ml de ampicilina y 0,1% v/v de antiespumante A. El cultivo se incubó a 37°C con sacudidas hasta que OD₆₀₀ alcanzó aproximadamente el valor 0,8. Se añadió isopropiltiogalactosa (IPTG) a un volumen final de 1 mM y el cultivo se incubó durante 3 horas más.

30 Las células se cosecharon por centrifugación a 8.670 xg durante 10 min en una centrifugadora JA-10 y se pusieron nuevamente en suspensión en una centésima parte del volumen original de cultivo en MTPBS (Na₂HPO₄ 16 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3). Se añadió Triton X-100 y lisozima a una concentración final de 1% v/v y 100 μ g/ml, respectivamente. Las células se incubaron a 30°C durante 15 min, se enfriaron a 4°C sobre hielo y se lisaron por sonicación durante 7 segundos a nivel 7 con un disruptor de células Branson Sonifier equipado con una sonda de micropunta. El extracto exento de células se centrifugó a 35.000 xg durante 10 min a 4°C. Se decantó la sustancia sobrenadante y se repitió la etapa de sonicación.

40 La purificación de las proteínas de fusión expresadas se realizó según la modificación de Smith y Johnson (Gene 67:31-40, 1988). El material sobrenadante se calentó a temperatura ambiente y se hizo pasar a través de una columna de 2 ml de perlas de glutatona-agarosa (unión por azufre, Sigma) equilibrada en MTPBS. La columna se lavó seguidamente con MTPBS a temperatura ambiente hasta que la A₂₈₀ del eluyente casaba con la de MTPBS. La proteína de fusión se eluyó luego usando una solución que contenía glutatona reducida 5 mM en Tris HCl 50 mM, pH 8,0. La proteína de fusión eluida se trató con aproximadamente 30 unidades NHD de trombina y se dializó frente a citrato 50 mM pH 6,5 y NaCl 150 mM.

45 La proteína de fusión se mantuvo en digestión durante la noche a temperatura ambiente. Las muestras digeridas se dializaron frente a MTPBS y se hicieron pasar dos veces a través de una columna de glutatona-agarosa equilibrada en MTPBS para eliminar la proteína glutatona transferasa liberada. Se recogió la fracción de proteína que no se unió a la columna y se concentró por ultrafiltración en un filtro YM10 (Amicon). La muestra concentrada se cargó en una columna de filtración en gel Sephacryl S-100 de 1,5 x 95 cm equilibrada en tampón de filtración (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Se recogieron fracciones de 2 ml a un caudal de 0,14 ml/min. La estabilidad de la enzima se ensayó almacenando la enzima a 4°C en gel de filtración con la adición de 0,02% de azida sódica en presencia o ausencia de pirofosfato de tiamina 2 mM y dinucleótido de flavina adenina (FAD) 100 μ M.

55 B. Resultados

E. coli transformados con el plásmido pAC751 que contenía gen de AHAS de tipo salvaje fusionado corriente abajo y en marco con el gen de GST expresaron una proteína de 91 kD cuando se indujeron con IPTG. La proteína de 91 kD tenía la masa molecular predicha de una proteína de fusión de GST/AHAS (la suma de 26 kD y 65 kD, respectivamente). Cuando el extracto libre de células de DH5 α /pAC751 se hizo pasar a través de gel de afinidad de glutatona-agarosa, se lavó y se eluyó con la glutatona libre, resultó una preparación enriquecida en la proteína de 91 kD (Figura 6, carril C). El sitio de reconocimiento de trombina de seis aminoácidos tratado por ingeniería en la unión de GST y AHAS fue escindido con éxito por la trombina (Figura 6, carril D). La preparación de la proteína de fusión escindida estaba constituida por la proteína GST de 26 kD esperada y la proteína de AHAS de maíz de 65 kD. La AHAS de maíz se purificó hasta homogeneidad por una segunda pasada a través de la columna de glutatona-agarosa al sustrato GST de afinidad y se sometió a una etapa final de filtración en gel Sephacryl S-100 para eliminar la trombina (Figura 6, carril E). La proteína de 65 kD es reconocida en manchas western por un anticuerpo monoclonal generado frente a un péptido de AHAS de maíz.

ES 2 275 275 T3

La AHAS de tipo salvaje purificada se analizó por espectrometría de masas por electroproyección y se determinó que tenía una masa molecular de 64.996 daltons (datos no presentados). La masa predicha, calculada a partir de la secuencia de aminoácidos deducida del gen insertado en el vector pGEX-2T, es de 65.058. La discrepancia de 0,096% entre la masa determinada empíricamente y la predicha estaba dentro de la variabilidad de ajuste del espectrómetro de masas. La estrecha proximidad de las dos determinaciones de la masa sugiere que no había nucleótidos mal incorporados durante la construcción del vector de expresión ni cualesquiera modificaciones postranscripcionales a la proteína que causarían cambios grandes de la masa molecular. Además, la falta de picos espúreos en la preparación de la enzima purificada indicaba que la muestra estaba exenta de contaminación.

10 Ejemplo 4

Propiedades enzimáticas de variantes de AHAS

15 Las propiedades enzimáticas de AHAS de tipo salvaje y de AHAS variante producidas en *E. coli* se midieron por el procedimiento de Singh y otros modificado (Anal. Biochem. 171:173-179) como sigue

Se obtuvo una mezcla de reacción que contenía tampón de ensayo 1X de AHAS (HEPES 50 mM pH 7,0, piruvato 100 mM, MgCl₂ 10 mM, pirofosfato de tiamina (TPP) 1 mM y dinucleótido de flavina adenina (FAD) 50 μM) por dilución de la enzima en tampón de ensayo 1X de AHAS o por adición de enzima concentrada al tampón de ensayo 20 1X de AHAS. Todos los ensayos que contenían imazetapir y controles asociados contenían una concentración final de 5% de DMSO debido a la adición de imazetapir a las mezclas de ensayo como solución al 50% en DMSO. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 250 μl a 37°C en placas de microtitulación. Después de dejar que la reacción transcurriera durante 60 min, se midió colorimétricamente la acumulación de acetolactato como lo describen Singh y otros, Anal. Biochem. 171:173-176, 1988.

25 La AHAS de maíz expresada y purificada de pAC751 como se describe en el Ejemplo 3 es activa en la conversión de piruvato en acetolactato. La actividad total de la AHAS depende de la presencia de los cofactores FAD y TPP en el medio de ensayo. No se detectó actividad sólo cuando se añadió únicamente FAD al medio de ensayo. La actividad de la enzima purificada con sólo TPP, o sin cofactores, era inferior a 1% de la actividad detectada en presencia de TPP y FAD. Normalmente, la AHAS presente en extractos en bruto de plantas es muy lábil, en particular en ausencia de sustrato y cofactores. A diferencia, la AHAS purificada del sistema de expresión bacteriano no presentaba pérdida de la actividad catalítica cuando se almacenó durante un mes a 4°C en HEPES 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 0,02% de NaN₃ en presencia o ausencia de FAD y TPP. Además, no eran visibles productos de degradación de estas preparaciones almacenadas cuando se resolvieron en geles de SDS-PAGE.

35 Las actividades específicas de AHAS de tipo salvaje y las variantes M124E, R199A y F206R se presentan en la siguiente Tabla 2. Determinada a partir del alineamiento de la Figura 5, la mutación de M124E en AHAS de *Arabidopsis* es la equivalente de la mutación M53E de maíz, la mutación de R199A en *Arabidopsis* es la equivalente de la mutación de R128A de maíz y la mutación de F206R en *Arabidopsis* es la equivalente de la mutación de F135R de maíz. Las mutaciones diseñadas en el modelo estructural de AHAS de maíz se usaron para identificar el aminoácido equivalente en el gen de AHAS de *Arabidopsis* dicotiledónea y se incorporaron y ensayaron en el gen de AHAS de *Arabidopsis*. Esta translación e incorporación de mutaciones de herbicidas diseñadas racionalmente en el gen de AHAS de *Arabidopsis* dicotiledónea puede facilitar la evaluación de la resistencia a herbicidas en plantas de una especie dicotiledónea.

45 TABLA 2

Actividad específica

	Actividad específica	% de actividad catalítica en comparación con la de tipo salvaje
De tipo salvaje	99,8	100
Met124Glu	9,15	9,16
Arg199A1a	86,3	86,5
Phe206Arg	5,07	5,1

65 La mutación de R199A mantiene un nivel alto de actividad catalítica (Tabla 2) mientras que presenta un nivel significativo de resistencia al imazetapir (Figura 7). Notablemente, esta variante retiene una sensibilidad completa a sulfonilureas (Figura 8). Así, la variante satisface los criterios de alta actividad específica y resistencia selectiva a herbicidas. A diferencia, la sustitución de M124E dio por resultado una resistencia casi completa al imazetapir (Figura 7), pero también presentaba una actividad catalítica severamente reducida (Tabla 2). En cuanto a la resistencia a la

ES 2 275 275 T3

imidazolinona, esta variante presenta una mayor sensibilidad a la sulfonilurea, lo que sugiere que este resto es un buen candidato para crear una mutación que confiera resistencia selectiva. La sustitución de un aminoácido que no sea el ácido glutámico puede ayudar a mantener la actividad catalítica. La sustitución de F206R dio resultados similares con la variante M124E, pero carecía de selectividad de la resistencia.

Ejemplo 5

Mejora iterativa de una variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea usando criterios de diseño racional

El cambio del resto 124 en AHAS de Met a Glu como se ha descrito en el Ejemplo 4 confirió resistencia a la imidazolinona, pero también redujo la actividad catalítica a 9,2% del valor de la de tipo salvaje. El modelo de la estructura de AHAS de maíz descrito antes sugería que Met53 (equivalente al resto Met124 de *Arabidopsis*) interacciona con una serie de restos hidrófobos en la cara de una hélice α que deriva de una subunidad separada pero que están próximos a Met 53. Así, la interacción hidrófoba entre Met53 y los restos en la hélice puede estabilizar tanto la asociación de subunidad/subunidad como la conformación del sitio activo. Se creyó que la sustitución del resto Met hidrófobo con un resto glutamato cargado muy probablemente desestabiliza la interacción hidrófoba intersubunidades y da por resultado una pérdida de actividad catalítica.

Sobre la base de este análisis de estructura/función, la actividad de la enzima mutante Met124Glu original de *Arabidopsis* (equivalente a Met53 Glu de maíz) se mejoró luego iterativamente sustituyendo un aminoácido más hidrófobo (Ile) en esta posición. La naturaleza hidrófoba de la cadena lateral de Ile dio por resultado la restauración de la actividad a niveles de la de tipo salvaje (la actividad específica de 102, equivalente a 102% de la actividad del tipo salvaje), pero la mayor masa de la cadena lateral de Ile era todavía capaz de mantener un nivel significativo de resistencia a la imidazolinona (Figura 9).

Comparativamente, la sustitución de un resto de histidina en esta posición dio por resultado una variante de AHAS que presentaba una actividad específica de 42,5, equivalente a 42,6% de la actividad de la de tipo salvaje. Este mutante, sin embargo, presentaba un grado alto de resistencia a PURSUIT® (Figura 10).

Ejemplo 6

Mejora iterativa de una variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea usando un enfoque de diseño racional

Otro ejemplo de afino iterativo usando los procedimientos de la presente invención implica la variante Arg128Ala. El modelo estructural de AHAS de maíz sugirió que el resto Arg128, que reside en el labio de la bolsa de unión del herbicida, contribuye a canalizar sustratos cargados y herbicidas a la bolsa de unión del herbicida y al sitio activo. El resto Arg 128 está distante del resto de TPP, que une la molécula de piruvato inicial en el mecanismo de reacción de AHAS, lo que explica por qué la sustitución de Arg199 de AHAS de *Arabidopsis* (equivalente a Arg128 de maíz) en alanina tenía un efecto pequeño sobre la actividad catalítica de la enzima. El modelo estructural indicaba además que se podía hacer más de un cambio radical en esta posición para aumentar el nivel de resistencia a la vez que se mantenían niveles altos de actividad catalítica. Sobre esta base, se hizo una mejora iterativa de la mutación para sustituir el resto de arginina cargado positivamente con un resto de glutamato cargado negativamente. La enzima así mutada tenía niveles mejorados de resistencia a PURSUIT®, mientras que se mantenían niveles altos de actividad (actividad específica de 114, equivalente a 114% de actividad de la de tipo salvaje). (Figura 11).

Ejemplo 7

Intercambiabilidad de AHAS derivada de diferentes especies en diseño racional basado en la estructura de variantes de AHAS resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea

Un modelo estructural de la estructura tridimensional de AHAS se construye con una secuencia de AHAS monocotiledónea tal como la derivada de maíz, como se ha descrito antes. Para introducir mutaciones en AHAS derivada de una especie dicotiledónea tal como *Arabidopsis*, las secuencias de AHAS derivada de la especie de monocotiledóneas y dicotiledóneas se alinean usando los programas GAP y PILEUP (Genetics Computer Group, 575 Sequence Drive, Madison, WI 53711). Se determinan posiciones equivalentes a partir del alineamiento generado con ordenador. Las mutaciones se introducen luego en el gen de AHAS de dicotiledónea según se ha descrito antes. Después de la expresión de la proteína de AHAS mutante en *E. coli* y evaluación de propiedades bioquímicas (esto es, actividad específica y resistencia a herbicidas), el gen mutante se introduce en una planta dicotiledónea por procedimientos de transformación de plantas como se ha descrito antes.

Ejemplo 8

Producción de plantas resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea por transformación con genes de AHAS diseñada racionalmente

5

Construcciones de DNA

Se usaron genes de variantes de AHAS diseñadas racionalmente en vectores de expresión de *E. coli* como fuente de fragmentos de restricción de DNA para reemplazar el fragmento de restricción equivalente en un gen de AHAS de *Arabidopsis*. Este gen está presente en un fragmento de DNA genómico de 5,5 kb que también contiene el promotor de AHAS de *Arabidopsis*, la secuencia terminal de AHAS de *Arabidopsis* y el DNA de los flancos 5' y 3'. Después de haber secuenciado DNA a través de los sitios de mutación para confirmar la presencia de la mutación apropiada, el fragmento de 5,5 kb de cada plásmido se insertó en un vector de transformación de plantas basado en pBIN (Mogen, Leiden, Holanda). El vector de transformación de plantas contiene también el gen de resistencia a la canamicina de neomicinofosfotransferasa II (nptII) impulsado por el promotor del virus mosaico de coliflor 35S. La construcción final del vector se presenta en la Figura 12. Los vectores que contienen genes de AHAS de *Arabidopsis* con mutaciones de Met124Ile, Met124His y Arg199Glu (que corresponden a mutaciones de Met53Ile, Met 53His y Atg128Glu en la secuencia de AHAS de maíz según se presentado en la Figura 1) se marcaron pJK002, pJK003 y pJK004, respectivamente.

20

Cada uno de estos vectores se transformó en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (R&D Life Technologies, Gaithersburg, MD) usando el procedimiento de transformación descrito por An y otros, en Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19 (1988).

25

Transformación de la planta

La transformación de discos de hojas de *Nicotinum tabacum* cv Wisconsin 38 se realizó de conformidad con lo descrito por Horsch y otros (Science 227:1229-1231, 1985) con ligeras modificaciones. Se cortaron discos de hojas de plantas crecidas en condiciones estériles y cocultivadas mantenidas de arriba-abajo en medio de Murashige Skoog (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 2-3 días a 25°C en la oscuridad con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían los plásmidos pJK002, pJK003 y pJK004. Los discos se transfirieron en seco y se pasaron a medio de Murashige Skoog con vitaminas B5 que contenían 1 mg/ml de benciladenina y 0,1 mg/l de ácido 1-naftilacético, 100 mg/l de canamicina y 500 mg/l de cefotaxima (todos obtenidos de Sigma).

35

Inicialmente, los transformantes se seleccionaron atendiendo a la resistencia a la canamicina conferida por el gen nptII presente en el vector de transformación. Se cortaron retoños derivados de los discos de hoja y se pusieron en medio fresco de Murashige Skoog exento de hormonas que contenía cefotaxima y canamicina.

40

Resistencia a herbicidas in vivo

Reñoños resistentes a canamicina se pasaron a un medio que contenía imazetapir 0,25 μ M. A esta concentración del herbicida de imidazolinona, los retoños de tabaco no transformados (que contenían AHAS de tipo salvaje endógena) no eran capaces de iniciar la formación de raíz. A diferencia, en retoños de tabaco transformados con cada uno de los genes de AHAS mutantes se observó la iniciación de la raíz y el crecimiento. En la Figura 1 se presentan las raíces desarrolladas en los retoños transformados con los genes mutantes de Met124Ile y Arg199Glu junto con el tipo salvaje. Además, las plantas transformadas con los genes mutantes de Met124Ile y Arg199Glu eran resistentes a la proyección de dos veces la cuantía de campo (100 g/Ha) de imazetapir (Figura 13). Las configuraciones del crecimiento de la raíz en plantas transformadas frente a las no transformadas en presencia de herbicida, así como el comportamiento después de la proyección de herbicida sugieren que la expresión de los genes de resistencia a herbicidas diseñados racionalmente confiere resistencia a herbicidas *in vivo*.

50

Detección de los genes diseñados racionalmente en tabaco resistente a herbicidas

Se aisló DNA genómico de plantas de tabaco transformadas con AHAS y se verificó por análisis por PCR la presencia de genes de variantes de AHAS de *Arabidopsis*. Las diferencias entre las secuencias de nucleótidos del gen de AHAS de *Arabidopsis* y los dos genes de AHAS de tabaco se explotaron para diseñar cebadores por PCR que amplifican sólo el gen de *Arabidopsis* en un fondo de DNA genómico. Se detectaron los genes diseñados racionalmente de resistencia a herbicidas, según lo revelaba la amplificación de un fragmento de DNA del tamaño apropiado, en la mayoría de plantas resistentes a herbicidas. No se vio señal de PCR alguna de plantas de tabaco no transformadas.

60

Segregación de genes de AHAS transformadas

Para controlar la segregación de genes de AHAS diseñados racionalmente en plantas transformadas, se realizaron ensayos de germinación. Las semillas se pusieron en medio de Murashige-Skoop exento de hormona que contenía hasta PURSUIT 2,5 μ M y canamicina 100 μ M. Los plantones resultantes se puntuaron visualmente en cuanto a la resistencia o susceptibilidad al herbicida.

65

ES 2 275 275 T3

Puesto que las plantas de tabaco son diploides, era de esperar que la progenie de plantas autopolinizadas segregara 3:1 resistentes:susceptibles, reflejando la existencia de 1 plantón homocigótico para el gen de AHAS resistente, 2 plantones heterocigóticos para el gen de AHAS resistente y 1 plantón que carecería del gen de AHAS resistente.

5 Los resultados indican que los genes de AHAS están segregando en la relación 3:1 esperada, lo que soporta la conclusión de que la resistencia a herbicidas la confiere una copia individual dominante de un gen de AHAS racionalmente diseñado.

10 Esto resultados indican que el diseño racional de genes de AHAS resistentes a herbicidas se puede usar para producir plantas que presentan un crecimiento resistente a herbicidas *in vivo*.

Ejemplo 9

15 *Producción de plantas resistentes a diferentes herbicidas por transformación de genes de AHAS diseñados racionalmente*

20 Plantas de tabaco transformadas con genes de AHAS diseñados racionalmente como se ha descrito en el Ejemplo 8 anterior se ensayaron en cuanto a resistencia por cruce a otro herbicida, CL 299.263 (también conocido como imazamox). Los ensayos de germinación se realizaron con semillas cosechadas de transformantes primarios que contenían los genes variantes Met124Ile, Met124His y Arg19Glu de AHAS de *Arabidopsis* en ausencia o presencia de CL 299.263 2,5 μ M (Figura 15). Esta concentración del herbicida causa atrofia y blanqueo severos de plantas de tabaco de tipo salvaje. Las plantas de tabaco transformadas con el gen de AHAS Met124His presentaban el máximo nivel de resistencia. (Figura 15). Los transformantes Arg19Glu presentaban un nivel intermedio de resistencia, mientras que Met124Ile presentaba una resistencia pequeña (Figura 15).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una proteína de una variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea usando información basada en la estructura, procedimiento que comprende:

- (a) alinear una proteína de AHAS diana sobre un molde de piruvato oxidasa para derivar la estructura tridimensional de la mencionada proteína de AHAS diana;
- (b) modelar uno o más herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en la estructura tridimensional para localizar una bolsa de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en la mencionada proteína de AHAS diana;
- (c) seleccionar como diana para la mutación al menos una posición de aminoácido en la proteína de AHAS diana, en la que la mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la mencionada bolsa de unión;
- (d) mutar DNA que codifica la proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mencionada mutación en la posición mencionada; y
- (e) expresar el mencionado DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la mencionada AHAS variante que contiene la mencionada mutación en la posición mencionada.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende:

- (f) expresar DNA que codifica la proteína de AHAS de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
- (g) purificar las proteínas de la mencionada AHAS de tipo salvaje y de la mencionada AHAS variante de las mencionadas células,
- (h) ensayar las proteínas de la mencionada AHAS de tipo salvaje y de la mencionada AHAS variante cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxitirato, en ausencia y presencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea; y
- (i) repetir las etapas (c)-(h), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (e) se usa como el DNA que codifica AHAS en la etapa (c) hasta que se identifica una proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene
 - (i) en ausencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea,
 - (a) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o
 - (b) una actividad catalítica en combinación con una proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa; en la que la mencionada célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y
 - (ii) una actividad catalítica que es más resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

3. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 2, en el que la mencionada actividad catalítica en ausencia de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea es de más de 20% de la actividad catalítica de la mencionada AHAS de tipo salvaje en ausencia de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea.

4. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 3, el que el herbicida es un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea y la mencionada proteína de la variante de AHAS resistente a herbicidas tiene:

- (i) una actividad catalítica en ausencia del mencionado herbicida de más de 20% de la actividad catalítica de la AHAS de tipo salvaje;
- (ii) una actividad catalítica que es más resistente a la presencia de herbicidas de imidazolinona en comparación con AHAS de tipo salvaje, y
- (iii) una actividad catalítica que es más sensible a la presencia de herbicidas de sulfonilurea en comparación con herbicidas de imidazolinona.

ES 2 275 275 T3

5. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 1, en el que la mencionada proteína de AHAS diana se deriva de *Arabidopsis thaliana*.
6. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 1, en el que la mencionada primera célula es *E. Coli*.
7. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 2, en el que las mencionadas primera célula y segunda células son *E. Coli*.
8. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 1, en el que la mencionada proteína de AHAS diana comprende una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 o la secuencia de aminoácidos de una proteína de AHAS de otra planta.
9. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 1, en el que la mencionada mutación es una sustitución de al menos un resto de aminoácido diferente en un resto de aminoácido de la secuencia de SEQ ID NO:1 seleccionado entre el grupo constituido por F135, M53, R128 y un resto de aminoácido de proteína de AHAS de otra planta en un aminoácido alineado con cualquiera de los anteriores, y cualquier combinación de cualesquier de los anteriores.
10. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 9, en el que la mencionada sustitución se selecciona entre el grupo constituido por Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg o una combinación de cualesquier de los anteriores.
11. Un procedimiento para la producción de una proteína de variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea usando información basada en la estructura, procedimiento que comprende:
- alinearse una proteína de AHAS diana en un primer molde de AHAS derivada de un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:° o la secuencia de aminoácidos de AHAS de otra planta para derivar la estructura tridimensional de la mencionada proteína de AHAS diana;
 - modelar uno o más herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea en la estructura tridimensional para localizar una bolsa de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea en la mencionada proteína de la AHAS diana;
 - seleccionar como diana para la mutación al menos una posición de aminoácido en la proteína de AHAS diana, en la que la mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la mencionada bolsa de unión;
 - mutar DNA que codifica la mencionada proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mutación en la posición mencionada; y
 - expresar el DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la AHAS variante que contiene la mencionada mutación en la posición mencionada.
12. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 11, que además comprende:
- expresar DNA que codifica la proteína de AHAS de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
 - purificar la proteína de AHAS de tipo salvaje mencionada y la proteína de AHAS variante mencionada de las células;
 - ensayar la proteína de AHAS de tipo salvaje mencionada y la proteína de AHAS variante mencionada en cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxibutirato, en ausencia y presencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea;
 - repetir las etapas (c)-(h), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (e) se usa como el DNA que codifica la AHAS en la etapa (c) hasta que se identifica una primera proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene
 - en ausencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea
 - una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o
 - una actividad catalítica en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la

ES 2 275 275 T3

viabilidad de una célula en la que se expresa; en la que la célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y

- 5 (ii) una actividad catalítica que es más resistente a al menos el mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

13. Un procedimiento para la producción de una proteína de variante de AHAS resistente a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea usando información basada en la estructura, procedimiento que comprende:

- 10 (a) alinear una proteína de AHAS diana sobre un primer molde de AHAS que tiene una bolsa identificada de unión de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea y que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1 para derivar la estructura tridimensional de la mencionada proteína de AHAS diana;
- 15 (b) seleccionar como diana para la mutación al menos una posición de aminoácido en la mencionada proteína de AHAS diana, en la que la mencionada mutación altera la afinidad de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea para la mencionada bolsa de unión;
- (c) mutar DNA que codifica la mencionada proteína de AHAS diana para producir un DNA mutado que codifica una AHAS variante que contiene la mencionada mutación en la posición mencionada; y
- 20 (d) expresar el mencionada DNA mutado en una primera célula en condiciones en las que se produce la AHAS variante que contiene la mencionada mutación en la posición mencionada.

14. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 13, que además comprende:

- 25 (e) expresar DNA que codifica la proteína de AHAS de tipo salvaje paralelamente en una segunda célula;
- (f) purificar la proteína de AHAS de tipo salvaje mencionada y la proteína de AHAS variante mencionada de las mencionadas células;
- 30 (g) ensayar la proteína de AHAS de tipo salvaje mencionada y proteína de AHAS variante mencionada en cuanto a su actividad catalítica en la conversión de piruvato en acetolactato o en la condensación de piruvato y 2-cetobutirato para formar acetohidroxibutirato, en ausencia y presencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, y
- 35 (h) repetir las etapas (c)-(h), en las que el DNA que codifica la variante de AHAS de la etapa (e) se usa como el DNA que codifica la variante de AHAS en la etapa (c) hasta que se identifica una primera proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea, que tiene

- 40 (i) en ausencia del mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea

(a) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa, o

45 (b) una actividad catalítica en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la mencionada célula, que puede ser la misma primera proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;

50 en la que la célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y

- (ii) una actividad catalítica que es más resistente a al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje.

55 15. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 12 o 14, en el que la mencionada actividad catalítica en ausencia de al menos el mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea es de más de 20% de la actividad catalítica de la mencionada AHAS de tipo salvaje.

60 16. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 15, en el que el mencionado herbicida es un herbicida basado en imidazolinona y una primera proteína de una primera variante de AHAS resistente a herbicida tiene:

(i) una actividad catalítica en ausencia del mencionado herbicida de más de 20% de la actividad catalítica de la mencionada AHAS de tipo salvaje;

65 (ii) una actividad catalítica que es más resistente a la presencia de herbicidas de imidazolinona en comparación con AHAS de tipo salvaje, y

ES 2 275 275 T3

(iii) actividad catalítica que es más sensible a la presencia de herbicidas de sulfonilurea en comparación con herbicidas basados en imidazolinona.

5 17. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 16, en el que la mencionada proteína de AHAS diana se deriva de *Arabidopsis thaliana*.

18. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 11 o 13, en el que la mencionada célula es *E. coli*.

10 19. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 12 o 14, en el que las mencionadas células primera y segunda son *E. coli*.

15 20. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 11 o 13, en el que la mencionada mutación es una sustitución de al menos un resto de aminoácido diferente en un resto de aminoácido de la secuencia de SEQ ID NO:1 seleccionado entre el grupo constituido por F135, M53, R128 y un resto de aminoácido de proteína de AHAS de otra planta en un aminoácido alineado con cualquiera de los anteriores, y cualquier combinación de cualesquier de los anteriores.

20 21. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 20, en el que la mencionada sustitución se selecciona entre el grupo constituido por Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, un resto de aminoácido de proteína de AHAS de otra planta en un aminoácido alineado con cualquiera de los anteriores, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

25 22. Un DNA aislado que codifica una proteína variante de acetohidroxiácido sintasa (AHAS), proteína variante que comprende una proteína de AHAS modificada por sustitución de al menos un resto de aminoácido diferente en un resto de aminoácido de la secuencia de SEQ ID NO:1 seleccionado entre el grupo constituido por M53, R128, F135 y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores.

30 23. DNA según se ha definido en la reivindicación 22, en el que la mencionada modificación altera la capacidad de un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea de inhibir la actividad enzimática de la mencionada proteína.

30 24. DNA según se ha definido en la reivindicación 23, en el que la mencionada proteína de AHAS deriva de *arabidopsis thaliana*.

35 25. DNA según se ha definido en la reivindicación 24, en el que la mencionada sustitución se selecciona entre el grupo constituido por Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

26. DNA según se ha definido en la reivindicación 25, en el que la mencionada proteína de AHAS variante tiene:

40 (a) en ausencia de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que inhibe AHAS,

(i) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa; o

45 (ii) una actividad catalítica en combinación con cualquier segunda proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la mencionada célula, que puede ser la misma proteína variante de AHAS mencionada o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;

en la que la mencionada célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y

50 (b) una actividad catalítica que es más resistente a al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje,

55 27. DNA según se ha definido en la reivindicación 22, en el que la mencionada AHAS variante tiene más de 20% de la actividad catalítica que la AHAS de tipo salvaje.

28. DNA según se ha definido en la reivindicación 27, en el que la mencionada AHAS variante es más resistente a herbicidas basados en imidazolinona que a herbicidas basados en sulfonilurea.

60 29. Un vector de DNA que comprende la secuencia de DNA de la reivindicación 22 unido operativamente a un elemento regulador de transcripción.

65 30. Una célula que comprende una AHAS que codifica una secuencia de DNA derivada de un vector de DNA según se ha definido en la reivindicación 29, célula que se selecciona entre el grupo constituido por células bacterianas, de hongos, plantas, insectos y mamíferos.

31. Una célula según se ha definido en la reivindicación 30, que comprende una célula de una planta.

ES 2 275 275 T3

32. Una semilla que comprende una célula según se ha definido en la reivindicación 31.

33. Una proteína de AHAS variante que comprende una proteína codificada por un DNA según se ha definido en la reivindicación 22.

34. Una proteína de AHAS variante que comprende una proteína de AHAS modificada por sustitución de al menos un resto de un aminoácido diferente en un resto de aminoácido de la secuencia de SEQ ID NO:1 seleccionado entre el grupo constituido por M53, R128, F135, un resto de aminoácido de proteína de AHAS de otra planta en un aminoácido alineado con cualquiera de los anteriores, y cualquier combinación de cualesquier de los anteriores.

35. Una proteína de AHAS variante según se ha definido en la reivindicación 34, en la que la modificación mencionada altera la capacidad de un herbicida basado en imidazolinona y/ sulfonilurea de inhibir la actividad enzimática de la mencionada proteína.

36. Una proteína de AHAS variante según se ha definido en la reivindicación 35, en la que la mencionada proteína de AHAS deriva de *Arabidopsis thaliana*.

37. Una proteína de AHAS variante según se ha definido en la reivindicación 33, en la que la mencionada sustitución se selecciona entre el grupo constituido por Met53Trp, Met53Glu, Met53Ile, Met53His, Arg128Ala, Arg128Glu, Phe135Arg, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

38. Una proteína de AHAS variante según se ha definido en la reivindicación 33, proteína variante de AHAS que tiene:

(a) en ausencia de al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que inhibe AHAS mencionado,

(i) una actividad catalítica sola suficiente para mantener la viabilidad de una célula en la que se expresa;

(ii) una actividad catalítica en combinación con cualquier proteína variante de AHAS resistente a un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea también expresada en la mencionada célula, que puede ser la misma proteína variante de AHAS o una diferente, suficiente para mantener la viabilidad de la célula en la que se expresa;

en la que la mencionada célula requiere actividad de la AHAS para la viabilidad, y

(b) una actividad catalítica que es más resistente a al menos un herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea que la AHAS de tipo salvaje,

39. Una proteína de AHAS variante según se ha definido en la reivindicación 33, en la que la AHAS variante tiene más de 20% de la actividad catalítica de la AHAS de tipo salvaje.

40. Un procedimiento para conferir en una célula resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea, procedimiento que comprende:

(a) clonar un DNA según se ha definido en la reivindicación 22 en un vector de expresión compatible, y

(b) transoformar el mencionado DNA en la mencionada célula, en condiciones en las que el gen mencionado se expresa a niveles suficientes para conferir a la mencionada célula resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea.

41. Una célula preparada de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 40.

42. Una planta que comprende una célula según se ha definido en la reivindicación 41.

43. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 40, en el que el mencionado gen mutado codifica un aminoácido diferente, al menos uno de las posiciones 53, 128, 135 o combinaciones de ellos.

44. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 43, en el que el mencionado gen de AHAS comprende el gen de AHAS de *Arabidopsis thaliana*.

45. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 43, en el que la mencionada célula es una célula de una planta.

46. Un procedimiento según se ha definido en la reivindicación 45, en el que la mencionada célula es una semilla.

ES 2 275 275 T3

47. Un procedimiento para controlar malas hierbas en un cultivo, procedimiento que comprende cultivar un campo que incluye plantas resistentes a herbicidas basados en diazolinona y/o sulfonilurea según se define en la reivindicación 42, y tratar el mencionado cultivo con el mencionado herbicida basado en imidazolinona y/o sulfonilurea.
- 5 48. Un procedimiento para controlar malas hierbas en un cultivo, procedimiento que comprende cultivar un campo que incluye plantas resistentes a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea según se define en la reivindicación 42, y tratar el mencionado cultivo con la mencionada composición herbicida basada en imidazolinona y/o sulfonilurea que incluye el mencionado herbicida.
- 10 49. Una célula transformada con un DNA según se ha definido en la reivindicación 22, en la que el mencionado DNA se expresa en la mencionada célula de manera que confiere a la mencionada célula resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea.
- 15 50. Una planta transformada con un DNA según se ha definido en la reivindicación 23, en la que el mencionado DNA se expresa en la mencionada célula de manera que confiere a la mencionada planta resistencia a herbicidas basados en imidazolinona y/o sulfonilurea.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

*1 * GSAASPAMP*10 *MAPPATPLRP*20 *WGPTDPRKGA*
 *60 *TRSPVIANHL*70 *FRHEQCEAFA*90 *ASGYARSSGR*
 Arg128 Phe135
 *120 *AITQQVPRRM*130 *IGTDAFQETP*140 *IVEVTRSIK*
 *180 *LVDI PKDIQQ*190 *QMAVPVWDKP*200 *HSLPGYIARL*
 *240 *ARSGEELRRP*250 *VELTQIPVTT*260 *TLHGLONFPS*
 *300 *GVRFDORVTO*310 *KIEAFASRAK*320 *IVIVDIDPAE*
 *360 *SKKSFDFOSW*370 *NDELDDQKRE*380 *FPLGYKTSNE*
 *420 *WAAQYTTYKR*430 *PRQWLSSAGL*440 *GAMQFQLPAA*
 *480 *IRIENLPVKV*490 *FVLNNQILGM*500 *VVQWEDRFYK*
 *540 *PAVRVTKKNE*550 *VRAAIKKHLE*560 *TPOPYLLDII*

Fig. 1a

Met 53

A

30 *DILVESLERC*40 *GVRDVFAYPG*50 *GASMEIHQAL

90 *VGVCIAATSGP*100 *GATNLVSALA*110 *DALLDSVPMV

150 *INYLVLDVDD*160 *IPRVVQEAFF*170 *LASSGRPGPV

210 *PKPPATELLE*220 *QVLRRLVGESR*230 *RPVLYVGGGC

270 *DDPLSLRMLG*280 *MHGTVYANYA*290 *VDKADLLLLAL

330 *IGKNKQPHVS*340 *ICADVKKLALQ*350 *GMNALLEGST

390 *EIQPQYAIQV*400 *LDELTKGEAI*410 *IGTGVGQHQM

450 *AGASVANPGV*460 *TVVDIDGDGS*470 *FLMNVQELAM

510 *ANRAHTYLGN*520 *PENESEIYPD*530 *FVTIAKGFNI

570 *VPHQEIVLPM*580 *IPSGCAFKDM*590 *ILDGDGRITVY

A

FIG. 1b

FIG. 2b

A

```

POX      *297*FVGNNY  PF*305*AEVSKAFKNT*315*RYFLQIDIDP*325*AKLGRHKHTD*335*I AVLAD  A*342*QKTLAAILAQ
      III II II  IIIIIIIIIII  IIIIIIIIIII  IIIIIIIIIII  III II I  IIIIIIIIIII
AHAS_pred *298*ALGVRFD DRRV*308*TKIEAFASR*318*AKIVHVDIDP*328*AEIGKNKQPH*338*VSICADV KLA*348*LQGMNALLEG

POX      *352*VSEREST  *359*PMWQANLANV*369*KNWRAYLASL*379*EDKQEGPLQA*389*YQVLR AVNKI*399*AEPDAIYSID
      IIIIIII  IIIII III  IIIII IIIII  III III  III IIIIIIIII  IIIIIIIIIII

AHAS_pred *358*STSKKSFD FG*368*SWNDEL DQOK*378*REFPLGYKTS*388*NEE  IQP*394*QYAIQV LDEL*404*TKGEAII GTG

POX      *409*VGDINLNANR*419*HLKLT P SNRH*429*ITSNL FATMG*439*VGIPGAI AAK*449*LNYP ERQVFN*459*LAGDGGASMT
      IIIII III  IIIIIIIIIII  IIIII IIIII  IIIII IIIII  IIIIIIIIIII  IIIII III

AHAS_pred *414*VGQHMQWAAQ*424*YYTYKRPRQW*434*LSSAGLGAMG*444*FGLPAAAGAS*454*VANPGVTVVD*464*IDGDGGSFLMN

POX      *469*MQDLVTQVQY*479*HLPVINVVFT*489*NCQYGF IKDE*499*QEDTNQNDFI*509*GVEFN DID F*518*SKIADGVHMQ
      IIIIIIIIIII  IIIII IIIII  IIIII IIIII  III IIIII  III IIIII  III IIIII

AHAS_pred *474*VQELAMIRIE*484*NL PVKVFV LN*494*NQHLGMVVQW*504*EDRFYKANRA*514*HTYLG NPENE*524*SEIY P D FVTI

POX      *528*AFRVNKIEQL*538*PDVFEQAKAI*548*AQHEPVLIDA*558*VITGDRPLPA*568*EKLR L D SAMS*578*SAADIEAFKQ
      I IIIIIIIII  III IIIIIII  IIIIIIIIIII  III IIIIIII  IIIII IIIII  III IIIIIII

AHAS_pred *534*AKGFNIPAVR*544*VTKKNEVRAA*554*IKKMLETPGP*564*YLLDIIVPHQ*574*EHVLP MIPSG*584*GAFKDMILDG

POX      *588*RYEAQDLQPL*598*STY LKQFGLD*608*D
      IIIII

AHAS_pred *594*DGRTVY  * * * * *
    
```

FIG. 3a

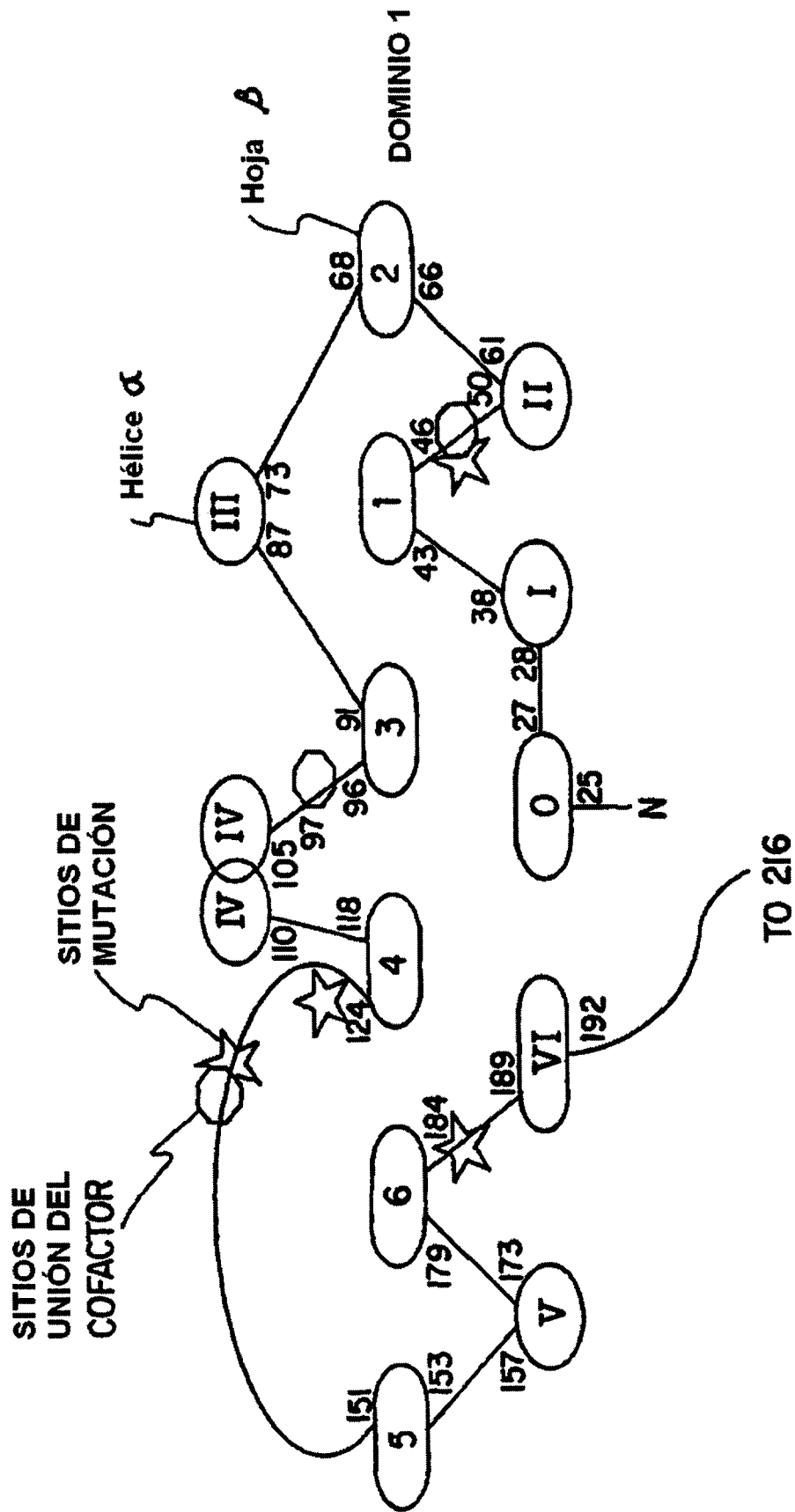


FIG. 3b

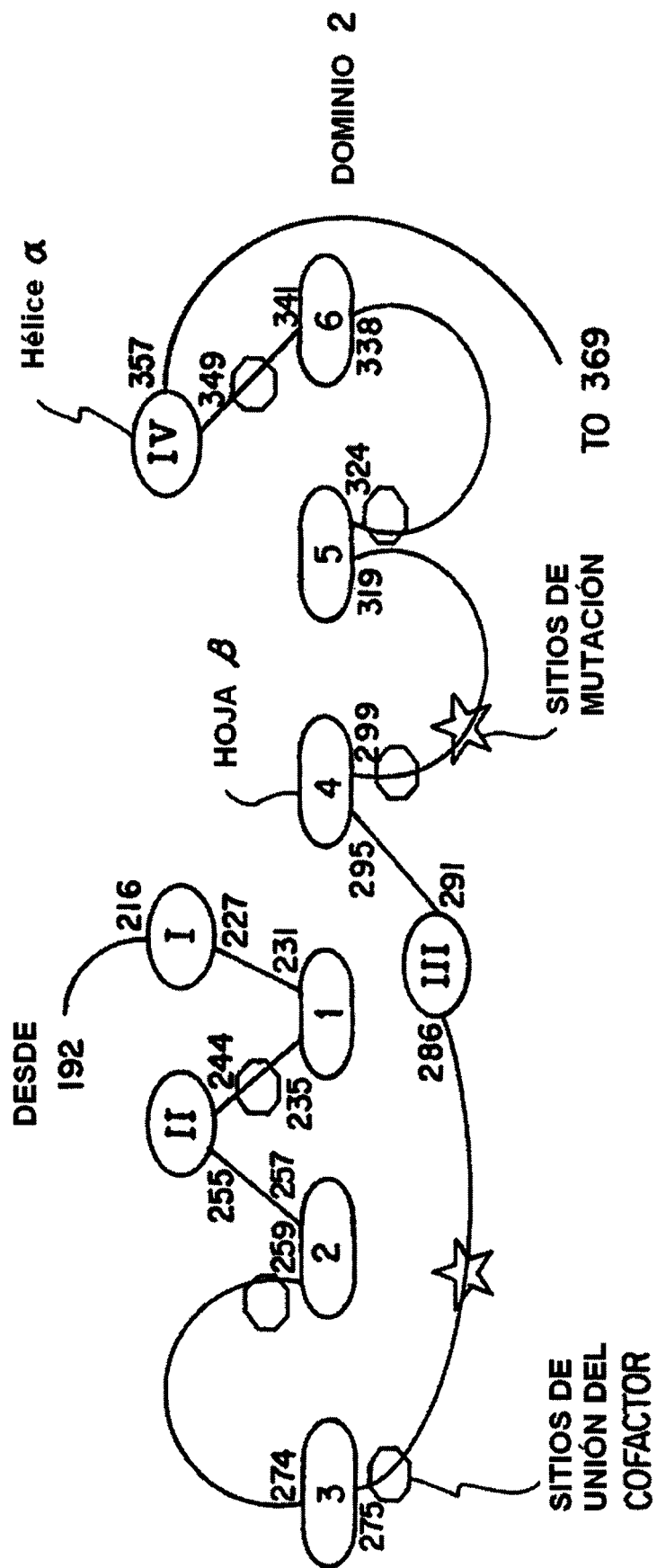


FIG. 3C

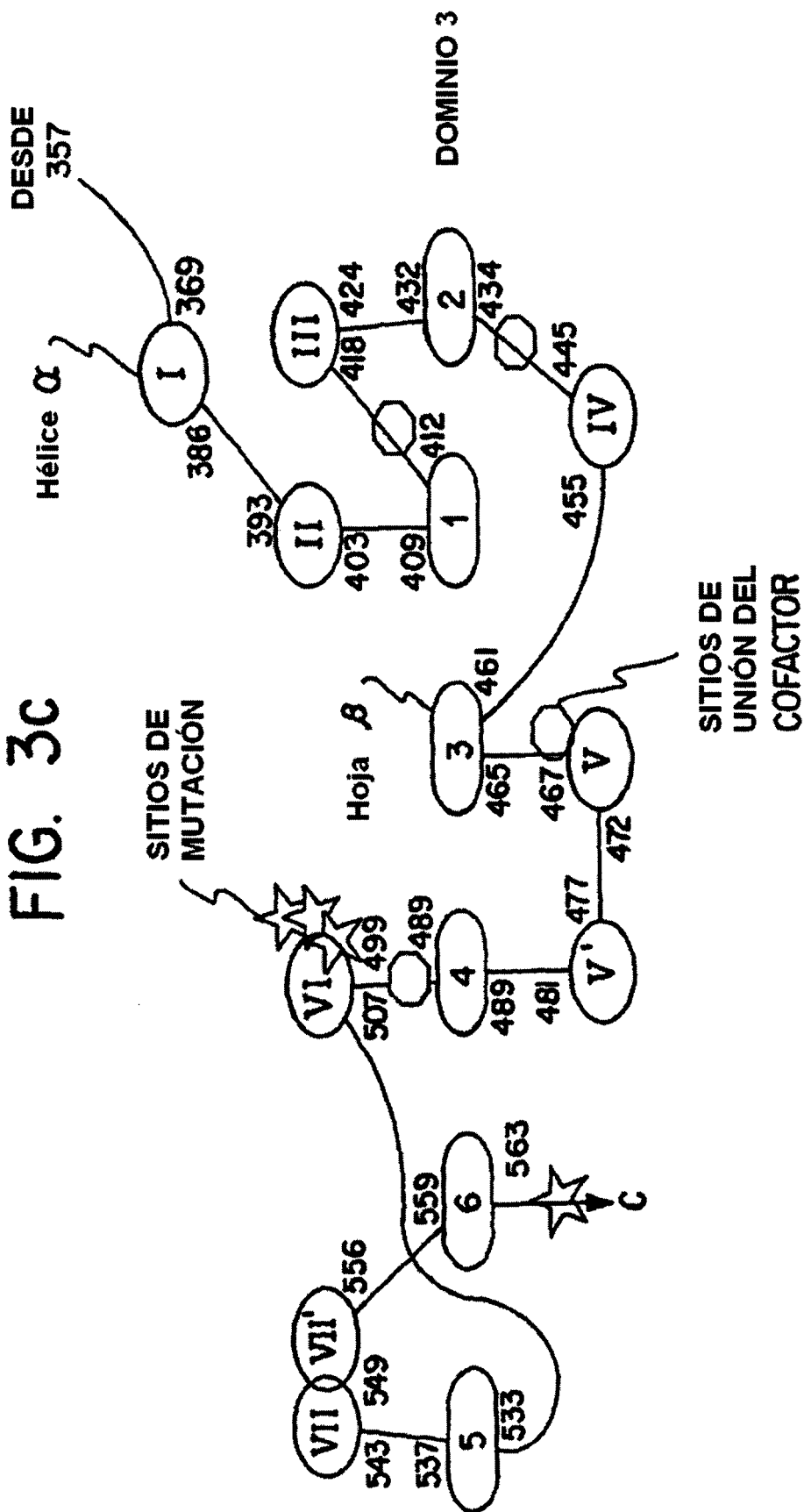


FIG. 4

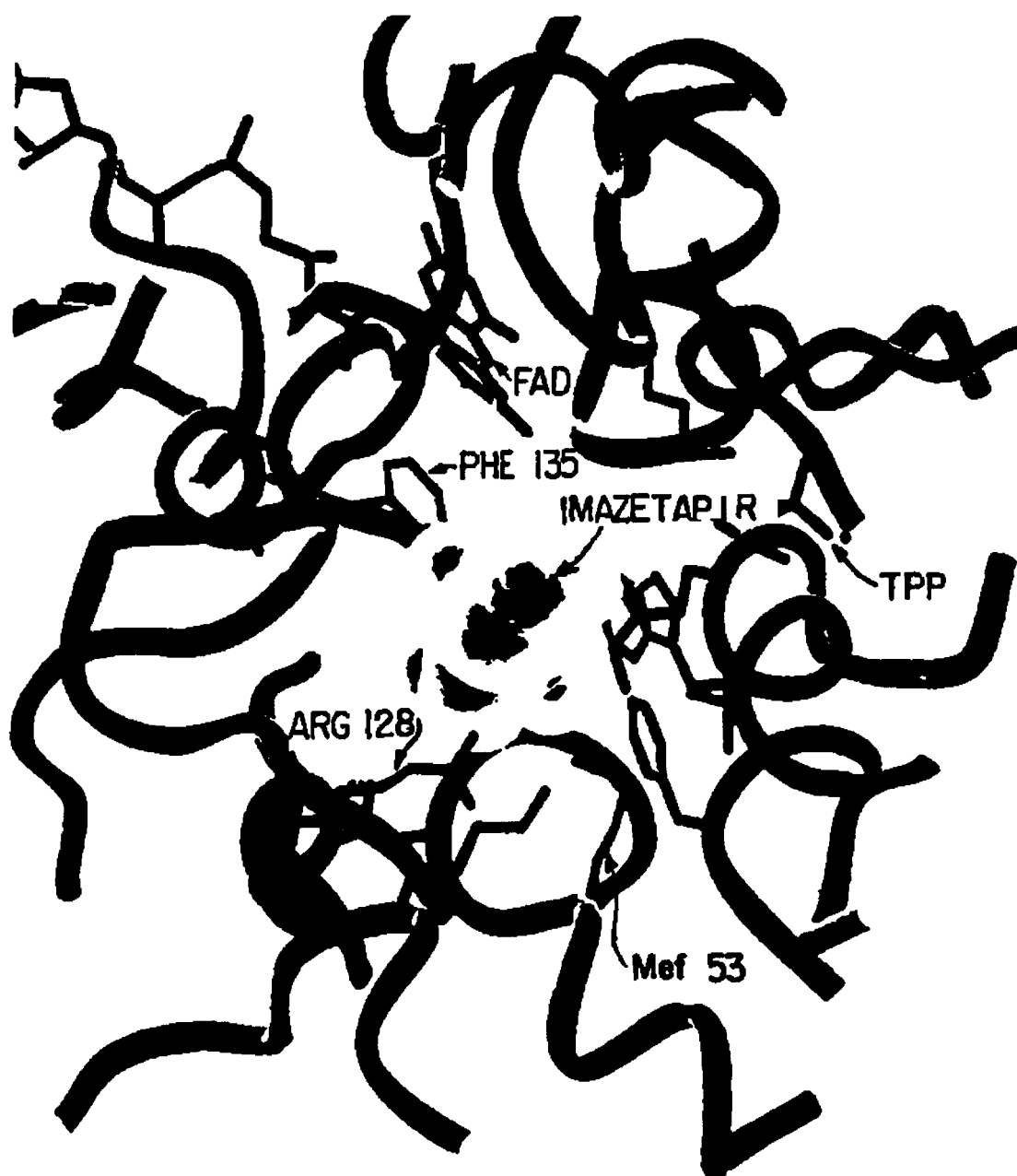


FIG. 50

1		50
Pac751TALTGATTAA
als2 de MaízMATAAAS AALTGATTAT
als1 de MaízMATAATAA AALTGATTAT
Tobac 1	MAAA...APS PSSSAFSKTL	SPSSSTSSTL LPRSTFPFPH HPHKTTPPPL
Tobac 2	MAAA...AAA PPS.FSKTL	SSSSKSSTL LPRSTFPFPH HPHKTTPPPL
Athcsr12	MAAATTTT	SPSSKSPLP ISRFSLPFSL NPNKSSSSSR
Bnaa13	MAAA...TS SSPISLTAKP	..SSKSPLP ISRFSLPFSL TPQKPSRRLH
Bnaa12M ASEFFGTIP	S.....SPTK ASVFSLPVSV TTLPSFPRRR
Consenso	MAAA--ATS -S-SSFS--P	SPSSKSPT- -SRFTLPFS- TPLK--P--

51		100
Pac751GSAASPAMP MAPPATPLRP WGPTDPRKGA
als2 de Maíz	PKARRRAHLL ATRRALAAPRCSAASPAMP MAPPATPLRP WGPTDPRKGA
als1 de Maíz	PKSRRRAHLL ATRRALAAPRCSALSATP TAPPATPLRP WGPNEPRKGS
Tobac 1	HLTHTHIH SQRRTISN	VISTNQVSO TEKTETFSR FAPDEPRKGS
Tobac 2	HLTPT..HIH SQRRTISN	VISTQKVE TOKAETFVSR FAPDEPRKGS
Athcsr12	RRGIKSSPS SISAVLNTT	NVTTPSPK PTKPETFISR FAPDQPRKGA
Bnaa13	R.....PL AISAVLNSPV	NV...APEK TDKIKTFISR YAPDEPRKGA
Bnaa12AT RVSVANSKK DQDRTAS..R	RENSTFSSK YAPNVPRSGA
Consenso	--TR-RAH-L -IRR-LN-PI	--S-TS-A-P T-KP-TF-SR -APDEPRKGA

A _____ A

FIG. 5c

EQUIVALENTE A MAIZ PHE 135			
	201	250	
Pac751	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVLDVDD	IPRVQEAFF LASSGRP GPV
als2 de Maíz	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVLDVDD	IPRVQEAFF LASSGRP GPV
als1 de Maíz	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVLDVDD	IPRVQEAFF LASSGRP GPV
Tobac 1	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVMDVED	IPRVREAFF LARSGRP GPV
Tobac 2	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVMDVED	IPRVREAFF LARSGRP GPV
Achcsr12	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVMDVED	IPRIIEAFF LATSGRP GPV
Bnaa13	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVMDVDD	IPRIVQEAFF LATSGRP GPV
Bnaa12	IGTMAFQETP	VVEVTRITK HNYLVMEVDD	IPRIVREAFF LATSVRP GPV
Consenso	IGTDAFQETP	IVEVTRSITK HNYLVMDVDD	IPRVQEAFF LA-SGRP GPV
	251	300	
Pac751	LVDIPKDIQQ	QMAVPVNDKP MSLPGYIARL	PKPPATELLE QVLR LVGESR
als2 de Maíz	LVDIPKDIQQ	QMAVPVNDKP MSLPGYIARL	PKPPATELLE QVLR LVGESR
als1 de Maíz	LVDIPKDIQQ	QMAVPVNDTP MSLPGYIARL	PKPPATEFLE QVLR LVGESR
Tobac 1	LIDVPKDIQQ	QLVIPDNDQP MRLPGYMSRL	PKLPNEMLLE QIVRLISESK
Tobac 2	LIDVPKDIQQ	QLVIPDNDQP MRLPGYMSRL	PKLPNEMLLE QIVRLISESK
Achcsr12	LVDVPKDIQQ	QLAIPNWEQA MRLPGYMSRM	PKPPEDSHLE QIVRLISESK
Bnaa13	LVDVPKDIQQ	QLAIPNNDQP MRLPGYMSRL	POPPEVSQ LG QIVRLISESK
Bnaa12	LIDVPKDVQQ	QFAIPNWEQP MRLPLYMSTM	PKPPKVVSHLE QILRLVSESK
Consenso	LVDVPKDIQQ	QLAIPNNDQP MRLPGYMSRL	PKPPA - - LLE QI - RL - SE SK

FIG. 5f

E		550	F		
Pac751	RPRQWLSSAG	LGAMGFLPA	AAGASVANPG	VTVVDIDGDG	SFLMNVQELA
als2 de Maíz	RPRQWLSSAG	LGAMGFLPA	AAGASVANPG	VTVVDIDGDG	SFLMNVQELA
als1 de Maíz	RPRQWLSSAG	LGAMGFLPA	AAGAAVANPG	VTVVDIDGDG	SFLMNIQELA
Tobac 1	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AIGAAVGRPD	EVVVDIDGDG	SFIMNVQELA
Tobac 2	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AIGAAVGRPD	EVVVDIDGDG	SFIMNVQELA
Athcsr12	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AIGASVANPD	AIVVDIDGDG	SFIMNVQELA
Bnaa13	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AIGASVANPD	AIVVDIDGDG	SFIMNVQELA
Bnaa12	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AMGAAIANPG	AVVVDIDGDG	SFIMNIQELA
Consenso	KPRQWLSSGG	LGAMGFLPA	AIGA - VANP -	-VVVDIDGDG	SFIMNVQELA
E		551	F		
Pac751	MIRIENLPVK	VFVLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG	NPENESEIYP
als2 de Maíz	MIRIENLPVK	VFVLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG	NPENESEIYP
als1 de Maíz	MIRIENLPVK	VFVLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTFLG	NPENESEIYP
Tobac 1	TIKVENLPVK	IMLLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG	NPSNEAEIYP
Tobac 2	TIKVENLPVK	IMLLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG	NPSNEAEIYP
Athcsr12	TIRVENLPVK	VLLNNQHLG	MVMQWEDRFY	KANRAHTFLG	DPAQEDEIYP
Bnaa13	TIRVENLPVK	ILLNNQHLG	MVMQWEDRFY	KANRAHTYLG	DPARENEIYP
Bnaa12	TIRVENLPVK	VLLINNQHLG	MVLQWEDHFY	AANRADSEFLG	DPANPEAVFP
Consenso	TIRVENLPVK	V - LLNNQHLG	MVVQWEDRFY	KANRAHTYLG	NP - NESEIYP
E		600	F		

FIG. 5g

F	601	Paç751	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML	ETPGPYLLDI	IVPHQEHVLP	650
		als2 de Maíz	DFVTIAKGFN	IPAVRVTKKN	EVRAAIKKML	ETPGPYLLDI	IVPHQEHVLP	
		als1 de Maíz	DFVALAKGFN	IPAVRVTKKS	EVHAAIKKML	EAPGPYLLDI	IVPHQEHVLP	
		Tobac 1	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHVLP	
		Tobac 2	NMLKFAEACG	VPAARVTHRD	DLRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHVLP	
		Athcsr12	NMLLFAAACG	IPAARVTKKA	DLREAIQTML	DTPGPYLLDV	ICPHQEHVLP	
		Bnaa13	NMLQFAGACG	IPAARVTKKE	ELREAIQTML	DTPGPYLLDV	ICPHQEHVLP	
		Bnaa12	DMLLFAASC	IPAARVTRRE	DLREAIQTML	DTPGPFLLDV	VCPHQDHLVLP	
		Consenso	-ML-FAKACG	IPAARVTKK-	-LRAAIQKML	DTPGPYLLDV	IVPHQEHVLP	
		651	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y..			673
		Pac751	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.			
		als2 de Maíz	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.			
		als1 de Maíz	MIPSGGAFKD	MILDGDGRTV	Y*.			
		Tobac 1	MIPSGGAFKD	VITEGDRSS	Y*.			
		Tobac 2	MIPSGGAFKD	VITEGDRSS	Y*.			
		Athcsr12	MIPNGGTFND	VITEGDGRK	Y*E			
		Bnaa13	MIPSGGTFKD	VITEGDGRK	Y*.			
		Bnaa12	LIPSGGTFKD	IIV*.....	...			
		Consenso	MIPSGGAFKD	VITEGDGRTV	Y--			
F								G

FIG. 5 h

G ————— G

Pac751 - Isozima de AHAS als2 de maiz como se expresa del vector de expresión

pAC751 de E. coli (como en la figura 1)

als2 de Maíz - Isozima de AHAS als2 de maíz (planta)

als1 de Maíz - Isozima de AHAS als1 de maíz (planta)

Tobac1 - Isozima SuRA de AHAS de tabaco (planta)

Tobac2 - Isozima SuRB de AHAS de tabaco (planta)

Athcsr12 - gen Csr 1.2 de AHAS de Arabidopsis thaliana (planta)

Bnaal3 - Isozima AHAS III de Brassica napus (planta)

Bnaal2 - Isozima AHAS II de Brassica napus (planta)

FIG. 6

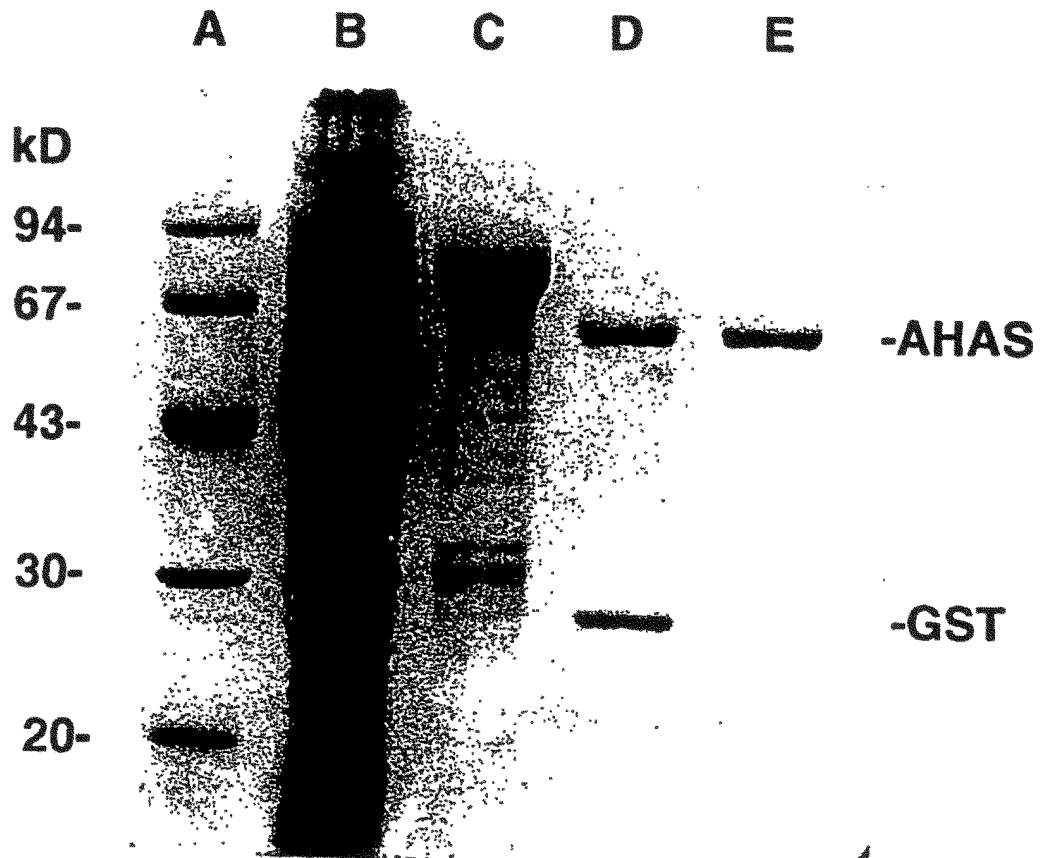


FIG. 7

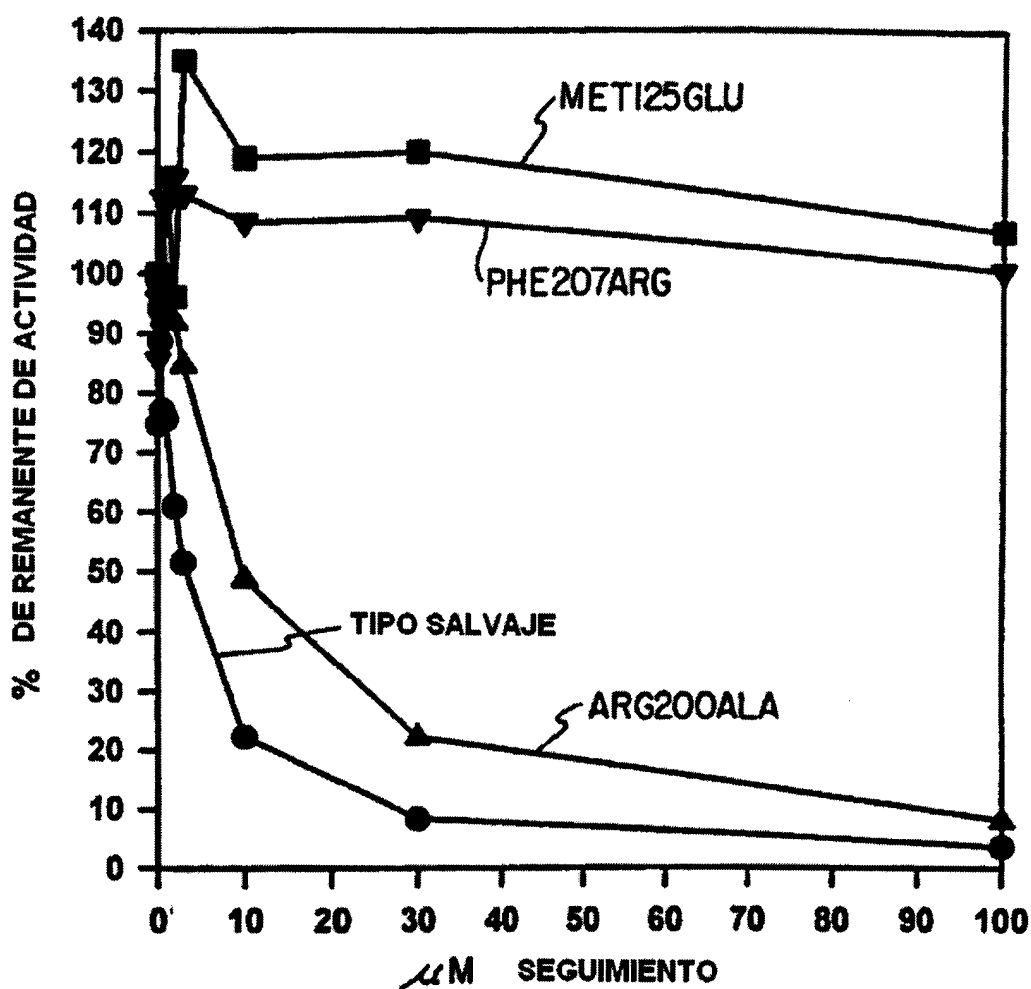


FIG. 8

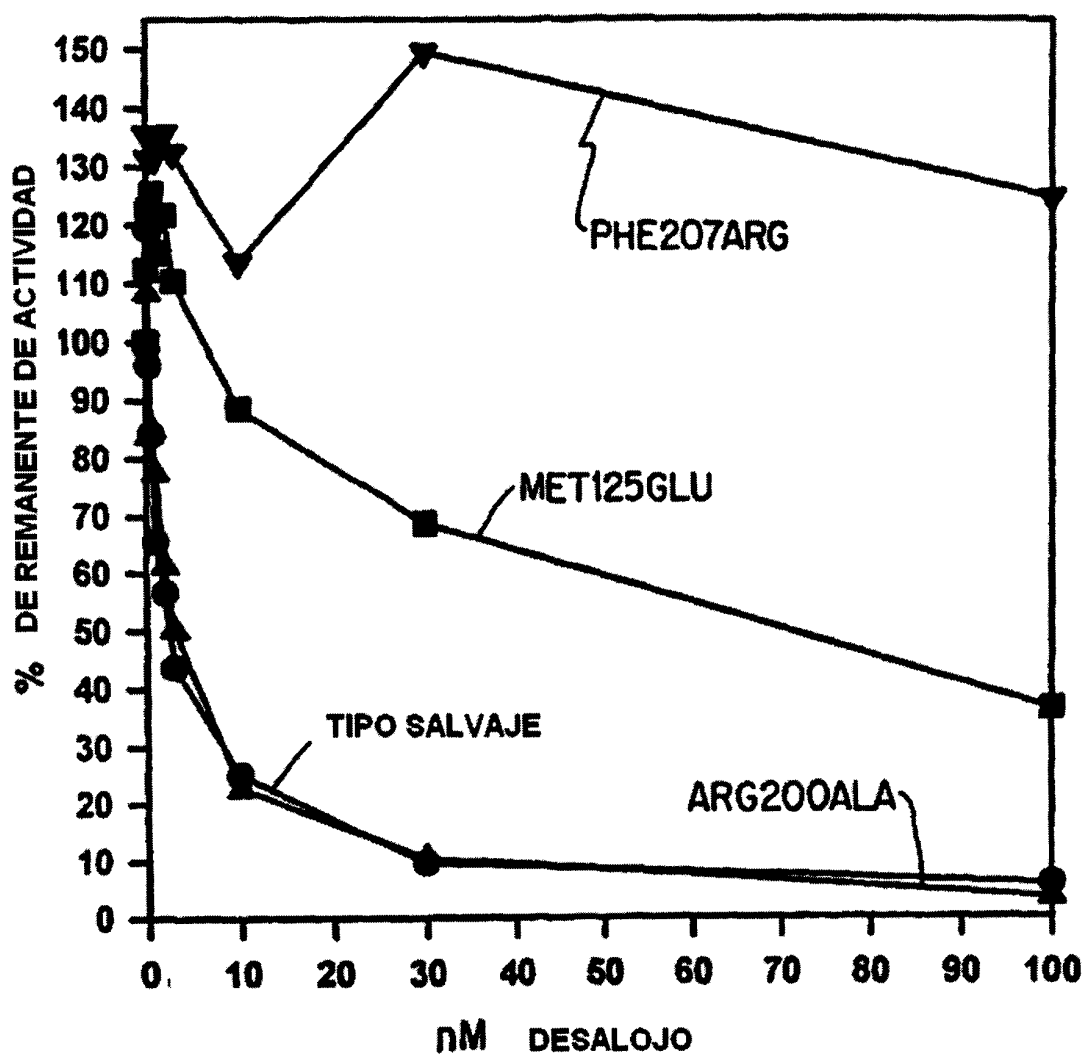


FIG. 9

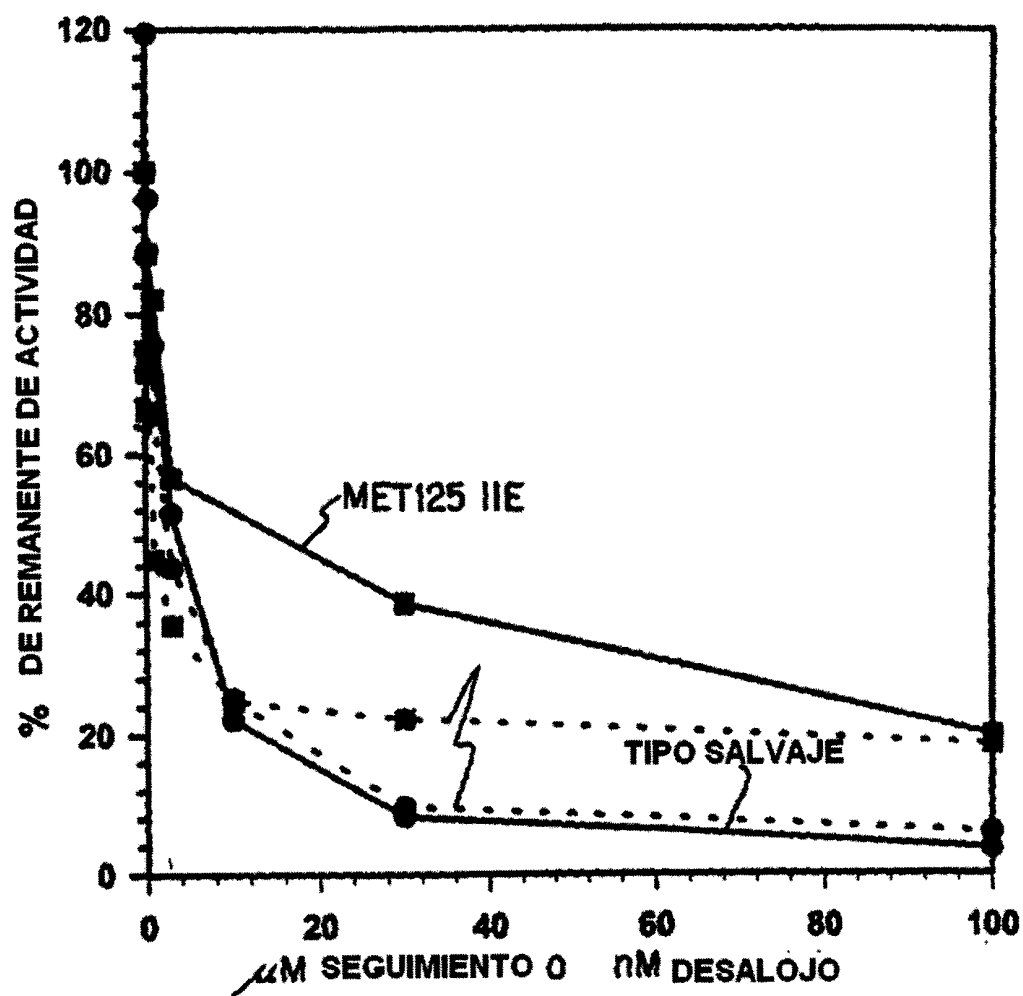


FIG. 10

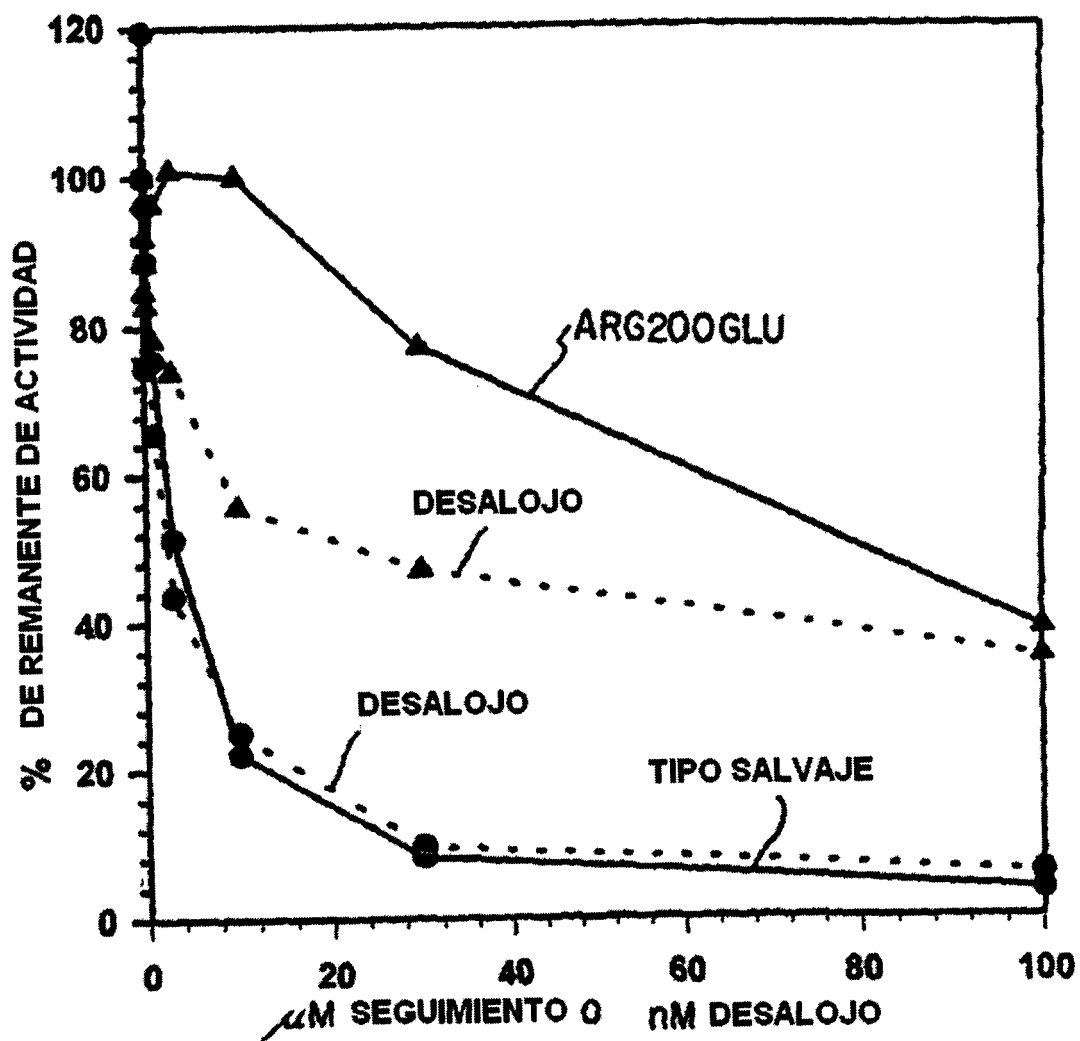


FIG. II

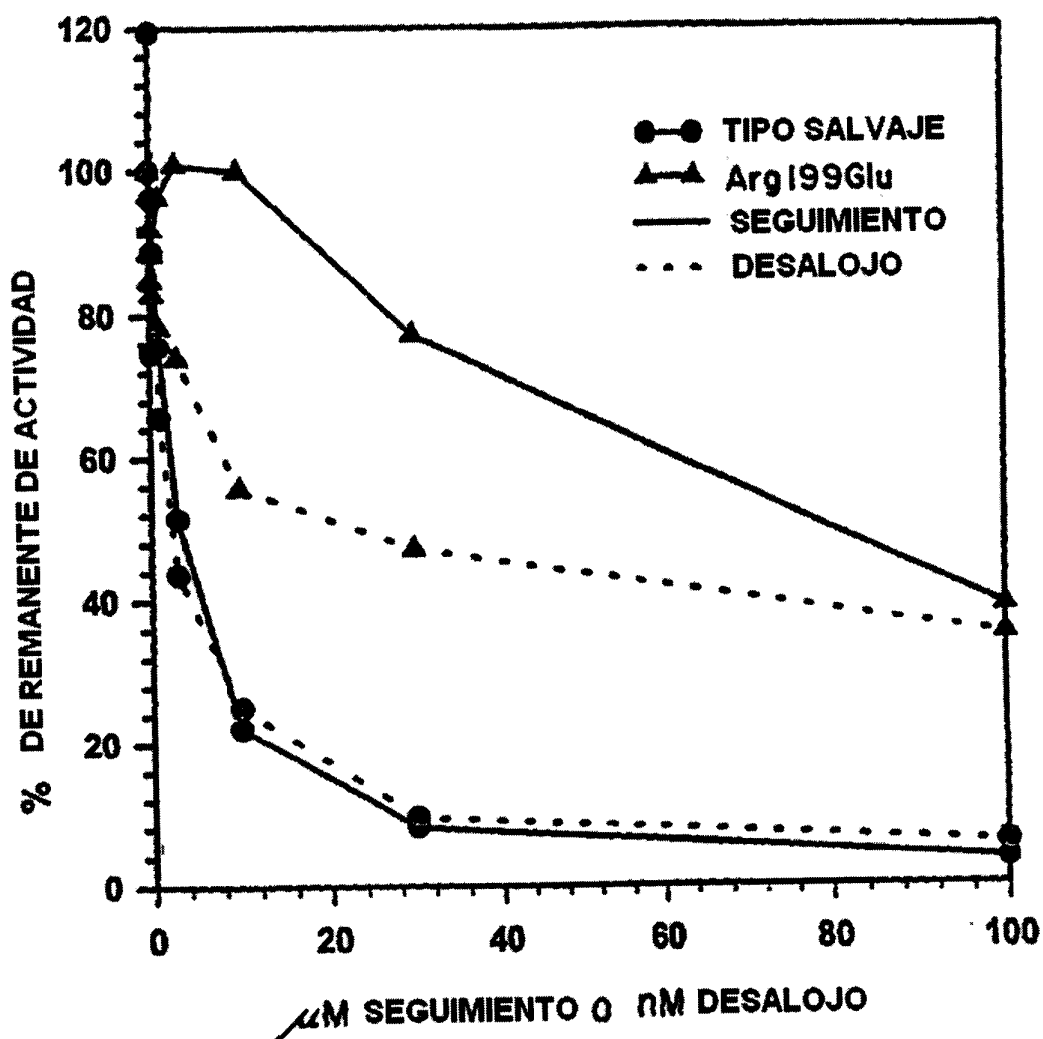


FIG. 12

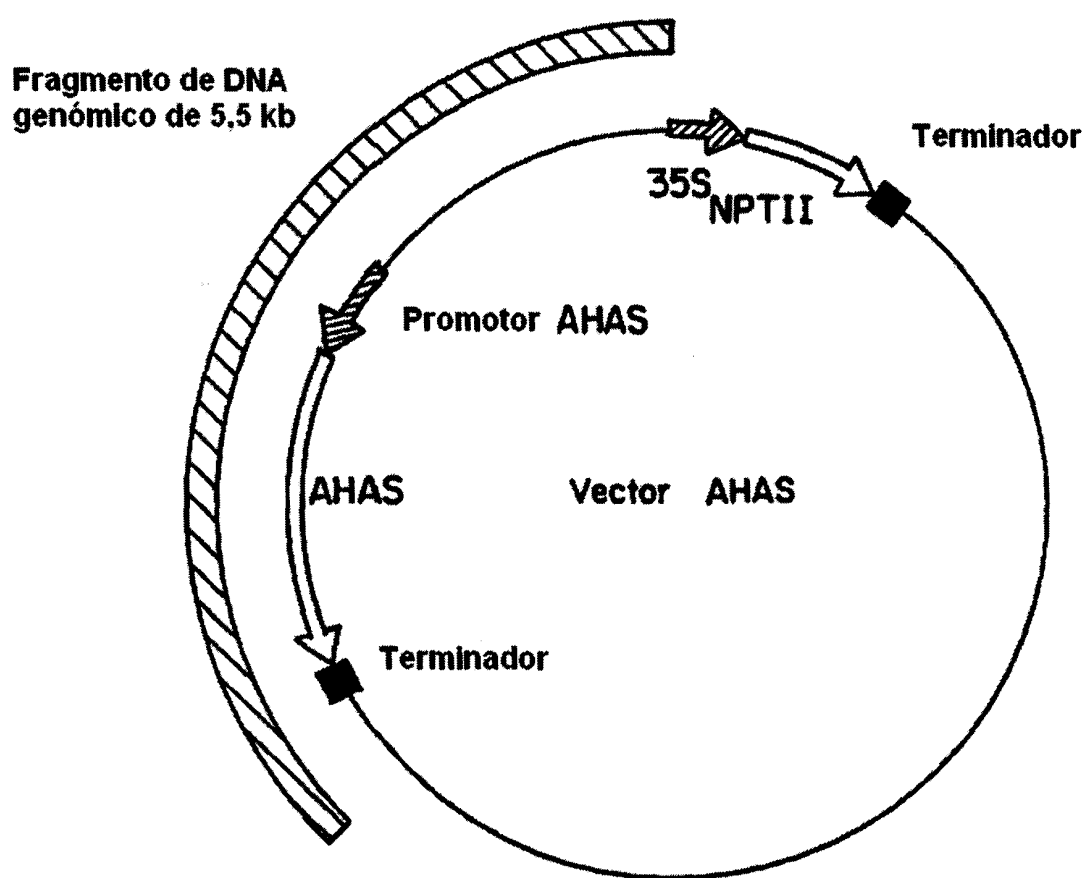


FIG. 13

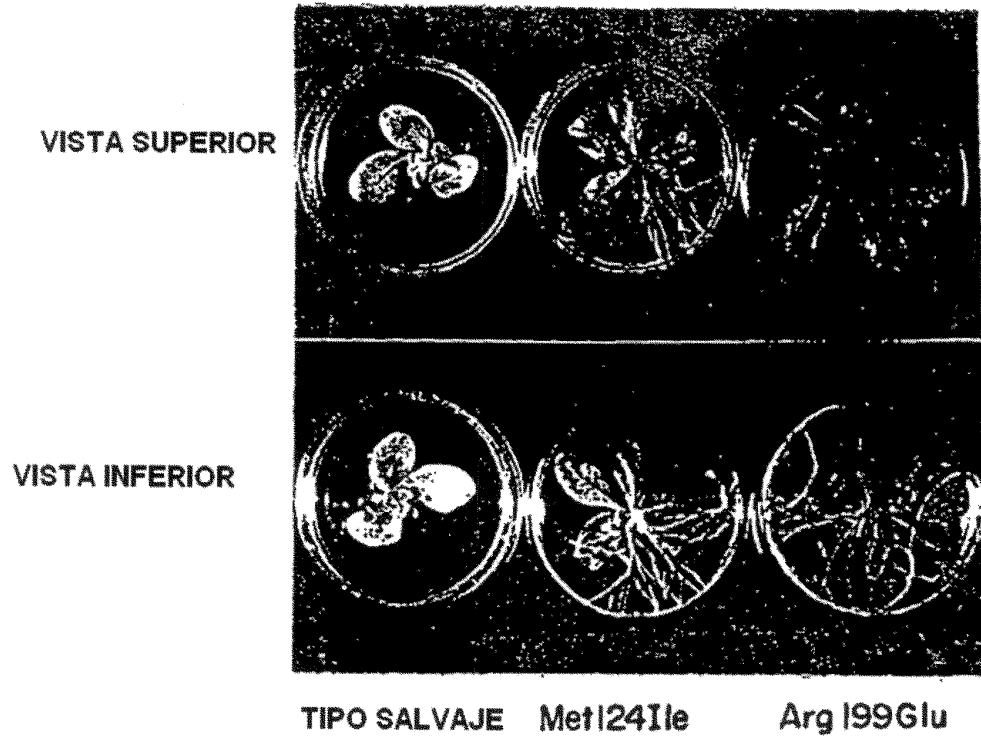


FIG. 14

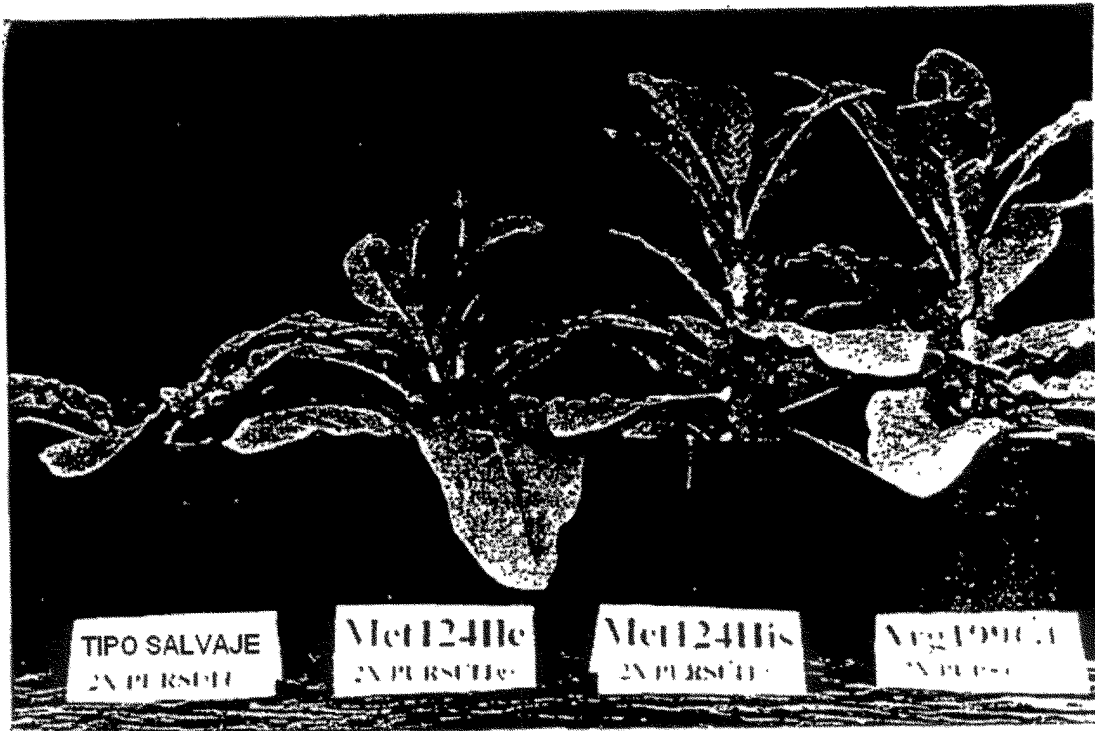
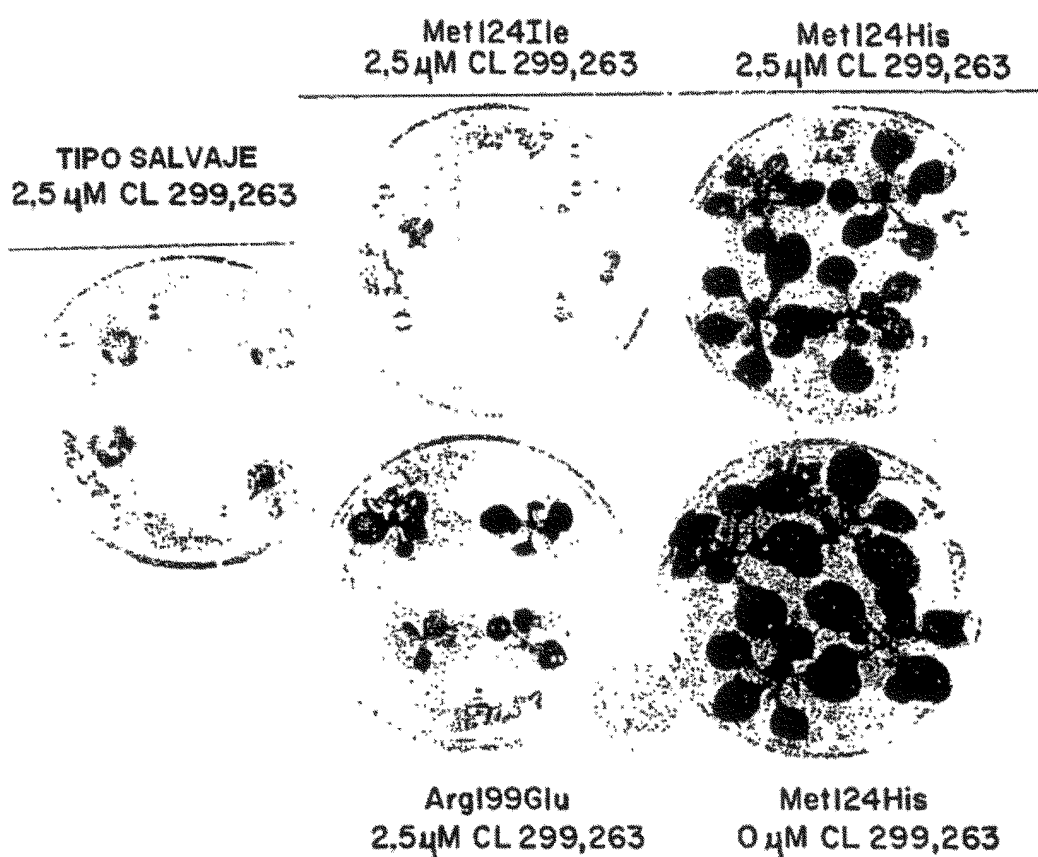


FIG. 15



ES 2 275 275 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Kakefuda, Genichi
Ott, Karl-Heinz
Kwagh, Jae-Gyu
Stockton, Gerald W.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: productos resistentes a herbicidas diseñados sobre la base de la estructura
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 10
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) CONSIGNATARIO: Darby & Darby
(B) CALLE: 805 Third Avenue
(C) CIUDAD: Nueva York
20 (D) ESTADO: Nueva York
(E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
(F) CÓDIGO: 10022-7513
- (v) FORMA LEGIBLE DE ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC - DOS/MS - DOS
30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release n° 1.0, Versión n° 1.30
- (vi) FECHA DE SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: ESTADOS UNIDOS 08/426.125
35 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20 de abril de 1995
(C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: Robinson, Joseph
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.448
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 0646/0A674
- 45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: (212)- 527-7783
(B) TELEFAX: (212)- 753-6237
50 (C) TELEX: 236687
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 599 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA:
- 60
- 65

ES 2 275 275 T3

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

ES 2 275 275 T3

Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala
 225 230 235 240
 5 Arg Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro
 245 250 255
 Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro
 10 260 265 270
 Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr
 275 280 285
 15 Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp
 290 295 300
 Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile
 20 305 310 315 320
 Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro
 325 330 335
 25 His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn
 340 345 350
 Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser
 30 355 360 365
 Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr
 370 375 380
 35 Lys Tyr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln
 40 405 410 415
 His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln
 420 425 430
 45 Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala
 435 440 445
 Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile
 450 455 460
 50 Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Met Ile
 465 470 475 480
 Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Phe Val Leu Asn Asn Gln His
 55 485 490 495
 Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg

60

65

ES 2 275 275 T3

5 Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro
515 520 525

Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val
530 535 540

10 Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr
545 550 555 560

15 Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val
565 570 575

Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp
580 585 590

20 Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
595

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 585 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: linear

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Lactobacillus plantarum*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

45 Thr Asn Ile Leu Ala Gly Ala Ala Val Ile Lys Val Leu Glu Ala Trp
1 5 10 15

Gly Val Asp His Leu Tyr Gly Ile Pro Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ile
20 25 30

50 Met Asp Ala Leu Ser Ala Glu Arg Asp Arg Ile His Tyr Ile Gln Val
35 40 45

55 Arg His Glu Glu Val Gly Ala Met Ala Ala Ala Ala Asp Ala Lys Leu
50 55 60

Thr Gly Lys Ile Gly Val Cys Phe Gly Ser Ala Gly Pro Gly Gly Thr

60

65

ES 2 275 275 T3

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

60

65

ES 2 275 275 T3

Ala Ser Leu Glu Asp Lys Gln Glu Gly Pro Leu Gln Ala Tyr Gln Val
 355 360 365

5 Leu Arg Ala Val Asn Lys Ile Ala Glu Pro Asp Ala Ile Tyr Ser Ile
 370 375 380

10 Asp Val Gly Asp Ile Asn Leu Asn Ala Asn Arg His Leu Lys Leu Thr
 385 390 395 400

15 Pro Ser Asn Arg His Ile Thr Ser Asn Leu Phe Ala Thr Met Gly Val
 405 410 415

Gly Ile Pro Gly Ala Ile Ala Ala Lys Leu Asn Tyr Pro Glu Arg Gln
 420 425 430

20 Val Phe Asn Leu Ala Gly Asp Gly Gly Ala Ser Met Thr Met Gln Asp
 435 440 445

25 Leu Val Thr Gln Val Gln Tyr His Leu Pro Val Ile Asn Val Val Phe
 450 455 460

Thr Asn Cys Gln Tyr Gly Phe Ile Lys Asp Glu Gln Glu Asp Thr Asn
 465 470 475 480

30 Gln Asn Asp Phe Ile Gly Val Glu Phe Asn Asp Ile Asp Phe Ser Lys
 485 490 495

Ile Ala Asp Gly Val His Met Gln Ala Phe Arg Val Asn Lys Ile Glu
 500 505 510

35 Gln Leu Pro Asp Val Phe Glu Gln Ala Lys Ala Ile Ala Gln His Glu
 515 520 525

40 Pro Val Leu Ile Asp Ala Val Ile Thr Gly Asp Arg Pro Leu Pro Ala
 530 535 540

Glu Lys Leu Arg Leu Asp Ser Ala Met Ser Ser Ala Ala Asp Ile Glu
 545 550 555 560

45 Ala Phe Lys Gln Arg Tyr Glu Ala Gln Asp Leu Gln Pro Leu Ser Thr
 565 570 575

50 Tyr Leu Lys Gln Phe Gly Leu Asp Asp
 580 585

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 3:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 599 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 60 (C) TIPO DE CADENA: individual
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 65 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) DE POLARIDAD OPUESTA: NO

ES 2 275 275 T3

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Zea mays*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

5

Gly Ser Ala Ala Ser Pro Ala Met Pro Met Ala Pro Pro Ala Thr Pro
1 5 10 15

10

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

15

Val Glu Ser Leu Glu Arg Cys Gly Val Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro
35 40 45

20

Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val
50 55 60

Ile Ala Asn His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala
65 70 75 80

25

Ser Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Ile Ala Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu
100 105 110

30

Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg
115 120 125

35

Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr
130 135 140

Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Asp Asp Ile
145 150 155 160

40

Pro Arg Val Val Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro
165 170 175

45

Gly Pro Val Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala
180 185 190

Val Pro Val Trp Asp Lys Pro Met Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg
195 200 205

50

55

60

65

ES 2 275 275 T3

5 Leu Pro Lys Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu
 210 215 220
 Val Gly Glu Ser Arg Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ala
 225 230 235 240
 10 Ala Ser Gly Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro
 245 250 255
 Val Thr Thr Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro
 260 265 270
 15 Leu Ser Leu Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr
 275 280 285
 20 Ala Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp
 290 295 300
 Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile
 305 310 315 320
 25 Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro
 325 330 335
 His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn
 340 345 350
 30 Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser
 355 360 365
 35 Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr
 370 375 380
 40 Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln
 405 410 415
 45 His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln
 420 425 430
 50 Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala
 435 440 445
 Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile
 450 455 460
 55 Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Met Ile
 465 470 475 480
 60 Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Phe Val Leu Asn Asn Gln His

65

ES 2 275 275 T3

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

60

65

ES 2 275 275 T3

Ala Leu Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala
 340 345 350

5 Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Val Asp Ile Asp Pro Ala Glu
 355 360 365

10 Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys
 370 375 380

Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn Ala Leu Leu Glu Gly Ser Thr Ser Lys
 385 390 395 400

15 Lys Ser Phe Asp Phe Gly Ser Trp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Gln Lys
 405 410 415

20 Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Ser Asn Glu Glu Ile Gln Pro
 420 425 430

Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile
 435 440 445

25 Ile Gly Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr
 450 455 460

30 Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala
 465 470 475 480

Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro
 485 490 495

35 Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn
 500 505 510

40 Val Gln Glu Leu Ala Met Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val
 515 520 525

Phe Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp
 530 535 540

45 Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu
 545 550 555 560

50 Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe
 565 570 575

Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Asn Glu Val Arg Ala Ala
 580 585 590

55 Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile
 595 600 605

60 Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala
 610 615 620

65 Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr
 625 630 635

ES 2 275 275 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 638 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Zea mays*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Met Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Leu Thr Gly Ala Thr Thr
1 5 10 15
Ala Thr Pro Lys Ser Arg Arg Arg Ala His His Leu Ala Thr Arg Arg
20 25 30
Ala Leu Ala Ala Pro Ile Arg Cys Ser Ala Leu Ser Arg Ala Thr Pro
35 40 45
Thr Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro Asn Glu Pro
50 55 60
Arg Lys Gly Ser Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val
65 70 75 80
Arg Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
85 90 95
Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Ala Asn His Leu Phe Arg His Glu
100 105 110
Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Ala Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Arg
115 120 125
Val Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val
130 135 140
Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met Val Ala Ile

ES 2 275 275 T3

	145				150					155					160	
5	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu
					165					170					175	
	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu
				180					185					190		
10	Val	Leu	Asp	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Arg	Val	Val	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe
			195					200					205			
	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys
15		210					215					220				
	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	Pro	Ala	Trp	Asp	Thr	Pro	Met	Ser
	225					230					235					240
20	Leu	Pro	Gly	Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Phe
					245					250					255	
	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	Ser	Arg	Arg	Pro	Val	Leu
25				260					265					270		
	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Glu	Leu	Cys	Arg	Phe
			275					280					285			
30	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly
		290					295						300			
	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Met	Leu	Gly	Met	His
35		305				310					315					320
	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu
					325					330					335	
40	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala
				340					345					350		
	Phe	Ala	Gly	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu
45			355					360					365			
	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys
		370					375					380				
50	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Met	Asn	Thr	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Thr	Ser	Lys
		385				390					395					400
	Lys	Ser	Phe	Asp	Phe	Gly	Ser	Trp	His	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Lys
55					405					410					415	
	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Ile	Phe	Asn	Glu	Glu	Ile	Gln	Pro
				420					425					430		

60

65

ES 2 275 275 T3

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

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 667 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

ES 2 275 275 T3

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

ES 2 275 275 T3

	260					265					270					
5	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro	Lys	Leu	Pro	Asn	Glu	Met	Leu	Leu	Glu	Gln
			275					280					285			
	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly
		290					295					300				
10	Gly	Gly	Cys	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu
	305				310							315				320
	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ala	Phe	Pro
15					325					330					335	
	Thr	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val
			340						345					350		
20	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly
			355					360					365			
	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser
25		370					375					380				
	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys
	385				390					395						400
30	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	Ile	Cys	Ala	Asp	Ile	Lys	Leu	Ala	Leu
					405					410					415	
	Gln	Gly	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu
35				420					425					430		
	Asp	Phe	Ser	Ala	Trp	Arg	Gln	Glu	Leu	Thr	Glu	Gln	Lys	Val	Lys	His
			435					440					445			
40	Pro	Leu	Asn	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Asp	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala
		450					455					460				
	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Asn	Gly	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser	Thr
	465				470						475					480
45	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Arg
					485					490					495	
	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe
50				500					505					510		
	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Arg	Pro	Asp	Glu	Val
			515					520					525			
55	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu
					530		535					540				

60

65

ES 2 275 275 T3

5 Leu Ala Thr Ile Lys Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu
 545 550 555 560
 10 Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr
 565 570 575
 15 Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Asn Glu Ala
 580 585 590
 20 Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Gly Val Pro
 595 600 605
 25 Ala Ala Arg Val Thr His Arg Asp Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys
 610 615 620
 30 Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His
 625 630 635
 35 Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp
 645 650 655
 40 Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Ser Ser Tyr
 660 665

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 664 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

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

ES 2 275 275 T3

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

60

65

ES 2 275 275 T3

Tyr Ala Val Asp Ser Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe
 355 360 365
 5 Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys
 370 375 380
 Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln
 385 390 395 400
 10 Pro His Val Ser Ile Cys Ala Asp Ile Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu
 405 410 415
 15 Asn Ser Ile Leu Glu Ser Lys Glu Gly Lys Leu Lys Leu Asp Phe Ser
 420 425 430
 Ala Trp Arg Gln Glu Leu Thr Val Gln Lys Val Lys Tyr Pro Leu Asn
 435 440 445
 20 Phe Lys Thr Phe Gly Asp Ala Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val
 450 455 460
 25 Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Ser Ala Ile Ile Ser Thr Gly Val Gly
 465 470 475 480
 Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Lys Tyr Arg Lys Pro Arg
 485 490 495
 30 Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro
 500 505 510
 35 Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Gly Arg Pro Asp Glu Val Val Val Asp
 515 520 525
 Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr
 530 535 540
 40 Ile Lys Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Met Leu Leu Asn Asn Gln
 545 550 555 560
 45 His Leu Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn
 565 570 575
 Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Ser Asn Glu Ala Glu Ile Phe
 580 585 590
 50 Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Glu Ala Cys Gly Val Pro Ala Ala Arg
 595 600 605
 55 Val Thr His Arg Asp Asp Leu Arg Ala Ala Ile Gln Lys Met Leu Asp
 610 615 620
 Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Val Pro His Gln Glu His
 625 630 635 640
 60 Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Val Ile Thr
 645 650 655
 65 Glu Gly Asp Gly Arg Ser Ser Tyr
 660

ES 2 275 275 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 671 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Arabidopsis thaliana*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

```

Met Ala Ala Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ser Ile Ser Phe
 1          5          10          15
Ser Thr Lys Pro Ser Pro Ser Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser
 20          25          30
Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser Leu Asn Pro Asn Lys Ser Ser Ser
 35          40          45
Ser Arg Arg Arg Gly Ile Lys Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ile Ser Ala
 50          55          60
Val Leu Asn Thr Thr Thr Asn Val Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Lys
 65          70          75          80
Pro Thr Lys Pro Glu Thr Phe Ile Ser Arg Phe Ala Pro Asp Gln Pro
 85          90          95
Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val
100          105          110
Glu Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln
115          120          125
Ala Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu

```

ES 2 275 275 T3

	130		135		140											
5	Gln 145	Gly	Gly	Val	Phe	Ala 150	Ala	Glu	Gly	Tyr	Ala 155	Arg	Ser	Ser	Gly	Lys 160
	Pro	Gly	Ile	Cys	Ile 165	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro 170	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu 175	Val
10	Ser	Gly	Leu	Ala 180	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp 185	Ser	Val	Pro	Leu	Val 190	Ala	Ile
15	Thr	Gly	Gln 195	Val	Pro	Arg	Arg	Met 200	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala 205	Phe	Gln	Glu
	Thr 210	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr 215	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys 220	His	Asn	Tyr	Leu
20	Val 225	Met	Asp	Val	Glu	Asp 230	Ile	Pro	Arg	Ile	Ile 235	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe 240
25	Leu	Ala	Thr	Ser	Gly 245	Arg	Pro	Gly	Pro	Val 250	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Lys 255
	Asp	Ile	Gln	Gln 260	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro 265	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala 270	Met	Arg
30	Leu	Pro	Gly 275	Tyr	Met	Ser	Arg	Met 280	Pro	Lys	Pro	Pro	Glu 285	Asp	Ser	His
35	Leu 290	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu 295	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys 300	Lys	Pro	Val	Leu
	Tyr 305	Val	Gly	Gly	Gly	Cys 310	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp 315	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe 320
40	Val	Glu	Leu	Thr	Gly 325	Ile	Pro	Val	Ala	Ser 330	Thr	Leu	Met	Gly	Leu 335	Gly
45	Ser	Tyr	Pro	Cys 340	Asp	Asp	Glu	Leu	Ser 345	Leu	His	Met	Leu	Gly 350	Met	His
	Gly	Thr	Val 355	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala 360	Val	Glu	His	Ser	Asp 365	Leu	Leu	Leu
50	Ala 370	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp 375	Asp	Arg	Val	Thr	Gly 380	Lys	Leu	Glu	Ala
55	Phe 385	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys 390	Ile	Val	His	Ile	Asp 395	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu 400
60	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys 405	Thr	Pro	His	Val	Ser 410	Val	Cys	Gly	Asp	Val 415	Lys
65																

ES 2 275 275 T3

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Brassica napus*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

5

Met Ala Ala Ala Thr Ser Ser Ser Pro Ile Ser Leu Thr Ala Lys Pro
1 5 10 15

10

Ser Ser Lys Ser Pro Leu Pro Ile Ser Arg Phe Ser Leu Pro Phe Ser
20 25 30

15

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

Ser Ala Val Leu Asn Ser Pro Val Asn Val Ala Pro Glu Lys Thr Asp
50 55 60

20

Lys Ile Lys Thr Phe Ile Ser Arg Tyr Ala Pro Asp Glu Pro Arg Lys
65 70 75 80

25

Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val Glu Thr
85 90 95

Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu
100 105 110

30

Thr Arg Ser Ser Thr Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly
115 120 125

35

Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys Pro Gly
130 135 140

Ile Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Gly
145 150 155 160

40

Leu Ala Asp Ala Met Leu Asp Ser Val Pro Leu Val Ala Ile Thr Gly
165 170 175

45

Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro
180 185 190

Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met

50

55

60

65

ES 2 275 275 T3

	195					200					205					
5	Asp	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Val	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala
	210						215					220				
	Thr	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Ile
	225					230					235				240	
10	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro	Asn	Trp	Asp	Gln	Pro	Met	Arg	Leu	Pro
					245					250					255	
	Gly	Tyr	Met	Ser	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Gly
15				260					265					270		
	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Val
			275					280					285			
20	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe	Val	Glu
	290					295						300				
	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Ser	Tyr
25	305					310					315					320
	Pro	Cys	Asn	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Gln	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr
					325					330					335	
30	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe
				340					345					350		
	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	Phe	Ala
35			355					360					365			
	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly
		370					375					380				
40	Lys	Asn	Lys	Thr	Pro	His	Val	Ser	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Ala
	385					390					395					400
	Leu	Gln	Gly	Met	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys
					405					410					415	
45	Leu	Asp	Phe	Gly	Val	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Glu	Gln	Lys	Gln	Lys
				420					425					430		
	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr
50			435					440					445			
	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gln	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile	Ser
		450					455					460				
55	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	Ala	Gln	Phe	Tyr	Lys	Tyr
	465					470					475					480

ES 2 275 275 T3

Arg Lys Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ser Gly Leu Gly Ala Met Gly
 485 490 495
 5 Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Asp Ala
 500 505 510
 10 Ile Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Val Gln
 515 520 525
 Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val Lys Ile Leu Leu
 530 535 540
 15 Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Met Gln Trp Glu Asp Arg Phe
 545 550 555 560
 20 Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asp Pro Ala Arg Glu
 565 570 575
 Asn Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Gln Phe Ala Gly Ala Cys Gly Ile
 580 585 590
 25 Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Glu Glu Leu Arg Glu Ala Ile Gln
 595 600 605
 30 Thr Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Val Ile Cys Pro
 610 615 620
 His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Thr Phe Lys
 625 630 635 640
 35 Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Lys Tyr
 645 650

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 637 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Brassica napus*

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

ES 2 275 275 T3

1 Met Ala Ser Phe Ser Phe Phe Gly Thr Ile Pro Ser Ser Pro Thr Lys
 5 Ala Ser Val Phe Ser Leu Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Pro Ser Phe
 10 Pro Arg Arg Arg Ala Thr Arg Val Ser Val Ser Ala Asn Ser Lys Lys
 15 Asp Gln Asp Arg Thr Ala Ser Arg Arg Glu Asn Pro Ser Thr Phe Ser
 20 Ser Lys Tyr Ala Pro Asn Val Pro Arg Ser Gly Ala Asp Ile Leu Val
 25 Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gly Val Asp Val Val Phe Ala Tyr Pro Gly
 30 Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Asn Thr Ile
 35 Arg Asn Val Leu Pro Arg His Glu Gln Gly Gly Ile Phe Ala Ala Glu
 40 Gly Tyr Ala Arg Ser Ser Gly Lys Pro Gly Ile Cys Ile Ala Thr Ser
 45 Gly Pro Gly Ala Met Asn Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Phe
 50 Asp Ser Val Pro Leu Ile Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met
 55 Ile Gly Thr Met Ala Phe Gln Glu Thr Pro Val Val Glu Val Thr Arg
 60 Thr Ile Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Met Glu Val Asp Asp Ile Pro
 65 Arg Ile Val Arg Glu Ala Phe Phe Leu Ala Thr Ser Val Arg Pro Gly
 70 Pro Val Leu Ile Asp Val Pro Lys Asp Val Gln Gln Gln Phe Ala Ile
 75 Pro Asn Trp Glu Gln Pro Met Arg Leu Pro Leu Tyr Met Ser Thr Met
 80 Pro Lys Pro Pro Lys Val Ser His Leu Glu Gln Ile Leu Arg Leu Val
 85

ES 2 275 275 T3

Ser Glu Ser Lys Arg Pro Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Leu Asn
 275 280 285
 5 Ser Ser Glu Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val
 290 295 300
 10 Ala Ser Thr Phe Met Gly Leu Gly Ser Tyr Pro Cys Asp Asp Glu Glu
 305 310 315 320
 Phe Ser Leu Gln Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr
 325 330 335
 15 Ala Val Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp
 340 345 350
 20 Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile
 355 360 365
 Val His Ile Asp Ile Asp Ser Thr Glu Ile Gly Lys Asn Lys Thr Pro
 370 375 380
 25 His Val Ser Val Cys Cys Asp Val Gln Leu Ala Leu Gln Gly Met Asn
 385 390 395 400
 30 Glu Val Leu Glu Asn Arg Arg Asp Val Leu Asp Phe Gly Glu Trp Arg
 405 410 415
 Cys Glu Leu Asn Glu Gln Arg Leu Lys Phe Pro Leu Arg Tyr Lys Thr
 420 425 430
 35 Phe Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Leu Leu Asp Glu
 435 440 445
 40 Leu Thr Asp Gly Lys Ala Ile Ile Thr Thr Gly Val Gly Gln His Gln
 450 455 460
 Met Trp Ala Ala Gln Phe Tyr Arg Phe Lys Lys Pro Arg Gln Trp Leu
 465 470 475 480
 45 Ser Ser Gly Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Met
 485 490 495
 50 Gly Ala Ala Ile Ala Asn Pro Gly Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly
 500 505 510
 Asp Gly Ser Phe Ile Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val
 515 520 525
 55 Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Leu Leu Ile Asn Asn Gln His Leu Gly
 530 535 540

60

65

ES 2 275 275 T3

	Met	Val	Leu	Gln	Trp	Glu	Asp	His	Phe	Tyr	Ala	Ala	Asn	Arg	Ala	Asp
	545					550					555					560
5	Ser	Phe	Leu	Gly	Asp	Pro	Ala	Asn	Pro	Glu	Ala	Val	Phe	Pro	Asp	Met
				565						570					575	
	Leu	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Ile	Pro	Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Arg
10			580					585						590		
	Arg	Glu	Asp	Leu	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	Thr	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly
			595					600					605			
15	Pro	Phe	Leu	Leu	Asp	Val	Val	Cys	Pro	His	Gln	Asp	His	Val	Leu	Pro
		610					615					620				
	Leu	Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Lys	Asp	Ile	Ile	Val			
20	625				630						635					
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																