



(51) МПК
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008107302/10, 28.07.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.07.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.07.2005 US 60/703,999

(43) Дата публикации заявки: **10.09.2009** Бюл. № 25

(45) Опубликовано: **20.06.2011** Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **THE PLANT JOURNAL (2003) 35, 476-489, US 6087175 A, 11.07.2000. US 6710227 B1, 23.03.2004.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **29.02.2008**

(86) Заявка РСТ:
US 2006/029349 (28.07.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/016319 (08.02.2007)

Адрес для переписки:

**107061, Москва, Преображенская площадь,
 д.6, ООО Фирма патентных поверенных
 "ИННОТЭК", пат.пов. А.М.Вахнину,
 рег.№ 1051**

(72) Автор(ы):

**ОЛИВЕР Пол (US),
 ДЕРОЧЕР Джей (US)**

(73) Патентообладатель(и):

ТАРГИТИД ГРОУС, ИНК. (US)

(54) ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОМИНАНТНО-НЕГАТИВНОГО МУТАНТНОГО БЕЛКА KRP ОТ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА ЦИКЛИН-CDK KRP ДИКОГО ТИПА

(57) Реферат:

Экспрессия в растении мутантного полипептида ингибитора CDK (SKI), имеющего доминантно-негативную антагонистическую активность в отношении белков SKI дикого

типа, обеспечивает увеличение мощности растений, массы их корней и размера семян, а также усиление роста растения на раннем этапе. 13 н. и 55 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008107302/10, 28.07.2006**

(24) Effective date for property rights:
28.07.2006

Priority:

(30) Priority:
29.07.2005 US 60/703,999

(43) Application published: **10.09.2009 Bull. 25**

(45) Date of publication: **20.06.2011 Bull. 17**

(85) Commencement of national phase: **29.02.2008**

(86) PCT application:
US 2006/029349 (28.07.2006)

(87) PCT publication:
WO 2007/016319 (08.02.2007)

Mail address:
**107061, Moskva, Preobrazhenskaja ploshchad', d.6,
OOO Firma patentnykh poverennykh
"INNOTEhK", pat.pov. A.M.Vakhninu, reg.№ 1051**

(72) Inventor(s):
**OLIVER Pol (US),
DEROChER Dzhej (US)**

(73) Proprietor(s):
TARGETID GROUS, INK. (US)

(54) **PROTECTIVE ACTION OF DOMINANT-NEGATIVE MUTANT PROTEIN KRP FROM INHIBITING WILD-TYPE ACTIVE COMPLEX CYCLIN-CDK KRP**

(57) Abstract:
FIELD: chemistry.
SUBSTANCE: described is expression in plants of the mutant polypeptide of the CDK (CKI) inhibitor, having dominant-negative antagonistic activity

towards wild-type CKI proteins.
EFFECT: high plant vigour, root mass and size of seeds, enhancement of plant growth at an early stage.
68 cl, 4 dwg, 3 tbl, 13 ex

RU 2 4 2 1 4 6 2 C 2

RU 2 4 2 1 4 6 2 C 2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] По данной заявке заявляется приоритет по заявке Соединенных Штатов United States Application No. 60/703,999, поданной 29 июля 2005. и включенной полностью в описание изобретения путем ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10
15 У растений существует такой же основной клеточный цикл, что и у эукариот. Не удивительно, что растения имеют общие с эукариотами киназы, называемые циклин-зависимыми киназами (CDK), которые регулируют переходы между различными фазами клеточного цикла. Арабидопсис, модельное растение, используемое для изучения
20 клеточного цикла, имеет несколько подгрупп CDK. CDKA является наиболее похожей на cdc2 (CDK1) животных и содержит высококонсервативную аминокислотную последовательность Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu (PSTAIRE) (SEQ ID NO:1) в области, которая опосредует взаимодействие со своим циклиновым партнером. Арабидопсис
25 также имеет специфическую для растений группу CDK, именуемую CDKB, которая не существует у высших животных. Однако у растений действительно отсутствует аналог CDKs-CDK4 и CDK6 G₁ млекопитающих. Было предложено, что CDKA является G₁ CDK (которая активируется циклинами растений D-типа), в то же время было
30 продемонстрировано, что CDKB преимущественно экспрессируется в S-фазе и позже и, вероятно, поэтому идентифицирована в виде G₂/M-специфической CDK.

35 [0003] Активация/инактивация этих CDKs управляет клетками на протяжении всего клеточного цикла, а также определяет время завершения у клеток клеточного цикла. Арабидопсис содержит вплоть до 49 циклинов, сгруппированных в 10 подклассов (смотри, Wang et al., *Plant Physiol.* 135:1084-1099, 2004). По-видимому, только A, B и D-
40 классы играют роль в клеточном цикле и активируют CDKs (Wang et al., *Plant Physiol.* 135:1084-1099, 2004). CDKA активируются циклинами D-типа, тогда как CDKB активируются циклинами A- и B-типа.

45 [0004] У животных CDKs отрицательно регулируются двумя семействами ингибиторов CDK (CKIs). Один класс, называемый ингибитором CDK4 (INK4), состоит из 4 членов (p15, p16, p18 и p19), которые связываются с G₁ CDKs и ингибируют G₁ CDKs, а именно CDK4

и CDK6, от связывания циклина. Другая группа ингибиторов называется белками-ингибиторами киназ (KIPs) или белками CIP (белок, взаимодействующий с CDK), и они являются высококонсервативными у всех животных. Семейство CIP/KIP преимущественно ингибирует киназную активность циклин А- и Е-CDK2. У растений были идентифицированы предполагаемые CKIs (Wang *et al.*, *Nature* 386:451-452, 1997; Wang *et al.*, *Plant J.*, 15:501-510, 1998; De Veylder *et al.*, *Plant Cell* 13:1653-1667, 2001; Jasinski *et al.*, *Plant Physiol* 130: 1871-1882, 2002) и показано, что они ингибируют киназную активность очищенного циклин/CDK *in vitro* (Wang *et al.*, 1997, *выше*; Wang *et al.*, *Plant J.* 24:613-623, 2000; Lui *et al.*, *Plant J.* 21:379-385, 2000). Экспрессия растительных CKIs обнаружила сниженный рост вместе с более мелкими органами, содержащими крупные клетки (смотри, Wang *et al.*, 2000, *выше*; Jasinski *et al.*, *J. Cell Sci.* 115:973-982, 2001; De Veylder *et al.*, *выше*; Zhou *et al.*, *Plant Cell Rep.* 20:967-975, 2002; Zhou *et al.*, *Plant J.* 35:476-489, 2003; Schnittger *et al.*, *Plant Cell* 15:303-315, 2003). У арабидопсиса эти CKIs называются ингибиторами CDK (ICKs) или KIP-родственными белками (KRPs). Были идентифицированы семь членов семейства ICK, которые обладают наибольшим сходством с семейством CIP/KIP CKIs. Каждый из этих членов семейства ICK/KRP имеет высокую степень идентичности аминокислотной последовательности с p27^{KIP1}, но идентичность ограничивается большей частью С-концевыми 30 аминокислотами. До настоящего времени не идентифицировано INK-родственных CKIs ни в одном из растений.

[0005] Сверхэкспрессия циклинов или выключение CKI иллюстрирует, что хорошо сбалансированный механизм клеточного цикла может быть легко нарушен у животных. Этот дисбаланс может, в конечном счете, привести к ускоренным клеточным циклам, увеличенному размеру животных и/или развитию опухоли. Снижение или полное устранение "активности" CKI приводит к повышенной киназной активности циклин/CDK. Такая повышенная активность приводит к фосфорилированию нижестоящих мишеней, необходимых для последовательности событий клеточного цикла, и у животных, в конечном счете, возникает гиперпролиферация клеток (Coats *et al.*, *Science* 272:877-880, 1996). Делеция гена p27^{KIP1} у мышей приводит к укрупнению мышей вследствие чрезмерной активности циклин/cdk, которая приводит к чрезмерной пролиферации клеток (Fero *et al.*, *Cell* 85:733-744, 1996; Kiyokawa *et al.*, *Cell* 85:721-732, 1996; Nakayama *et al.*, *Cell* 85:707-720, 1996).

[0006] Существуют механизмы подавления экспрессии различных членов семейства KRP. Посттранскрипционное молчание генов (PTGS) у растений представляет механизм деградации РНК сходный с интерференцией РНК (RNAi) у животных. RNAi приводит к специфической деградации двухцепочечной РНК (dsRNA) до коротких фрагментов dsRNA длиной 21-23 п.о., которые в конечном счете играют роль в деградации популяции

гомологичных РНК. У растений PTGS использует стратегию инвертированных повторов (IR) для подавления экспрессии генов у многих видов растений, в том числе хлебных злаков, таких как зерновые, соя и канولا, для примера приведены немногие. Однако технология IR имеет несколько недостатков, таких как эффективность последовательности IR, неэффективная регуляция генов (Jackson *et al.*, *Nature Biotech.* 21:635-637, 2003), временное молчание, полная стабильность IR и тому подобное. Эти недостатки оставляют в данном случае при необходимости молчания более чем одного гена одновременно.

[0007] В течение последних 75 лет принципиальной движущей силой традиционной селекции растений было повышение урожайности (J. Fernandez-Cornejo, *Agriculture Information Bulletin No. (AIB786)* 81 pp, February 2004). Совсем недавно стали доступными трансгенные зерновые культуры, которые, например, обладают устойчивостью к насекомым-вредителям и гербицидам. Однако эти трансгенные зерновые действительно обладают ухудшением урожая (Elmore *et al.*, *Agron. J.* 93:408-412, 2001; Elmore *et al.*, *Agron. J.* 93:404-407, 2001). До настоящего времени не существует известной коммерчески доступной трансгенной сельскохозяйственной культуры, которая обладает увеличенным размером семян или повышенной урожайностью.

[0008] В данной области существует необходимость в усовершенствованных способах модификации свойств конкретных коммерчески ценных зерновых в том числе, например, но без ограничения, увеличивающих урожай зерновых, увеличивающих размеры семян зерен, увеличивающих скорость прорастания, увеличивающих массу корней и тому подобное. Изобретение, как описывают здесь, удовлетворяет этим и другим требованиям.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Изобретение предоставляет вариантный полипептид ингибитора циклинзависимой киназы (СК1) растений, имеющий по меньшей мере, одну модификацию относительно полипептида СК1 дикого типа. В конкретных вариантах, модификация (модификации) находится внутри CDK-связывающей области, для придания, относительно белка СК1 дикого типа, модифицированной аффинности связывания для белка CDK при существенном сохранении аффинности связывания для белка циклина. Вариантные полипептиды СК1 изобретения обладают доминантной отрицательной антагонистической активностью в отношении функции СК1 дикого типа. При экспрессии варианта внутри клетки, экспрессирующей соответствующий белок СК1 дикого типа, или внутри клетки, экспрессирующей СК1 дикого типа, гетерологичного соответствующему белку дикого типа, но имеющем существенно эквивалентную функцию дикого типа в отношении, между

прочим, связывания циклина и CDK, биологическая активность SKI дикого типа ингибируется, приводя к ускоренному прохождению через клеточный цикл и повышенной пролиферации клеток.

5

[0010] В других аспектах изобретение предоставляет рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую вариантный полипептид SKI или вектор, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту. Вариантная нуклеиновая кислота, кодирующая SKI, или вектор могут быть внедрены внутрь клетки-хозяина для амплификации или экспрессии нуклеиновой кислоты. Клетки хозяина могут быть использованы, например, в способах изобретения для получения вариантных полипептидов SKI. Дополнительно экспрессия вариантного полипептида SKI в клетке может быть использована в способах изобретения для модуляции клеточного деления. Например, экспрессия в клетке вариантного полипептида SKI может приводить к ускоренному прохождению по клеточному циклу и усиленной клеточной пролиферации.

10

15

20

[0011] Опять же в других аспектах предоставляют трансгенное растение, содержащее трансген, кодирующий вариантный полипептид SKI. Экспрессия вариантного полипептида SKI в трансгенных растениях может быть использована в способах изобретения, например, с целью увеличения мощности растений, увеличения массы корней, увеличения размера растений или усиления роста на раннем этапе и тому подобное.

25

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

30

[0012] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют тот же самый смысл, в виде широко понимаемого любым специалистом в данной области, к которому это изобретение имеет отношение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные таковым, описанным здесь, могут быть использованы при применении или испытании изобретения, описывают только примеры способов и материалов. В целях изобретения ниже дают определения следующим терминам.

35

40

[0013] Термины "a", "an" и "the", как используют здесь, включают в себя множественное число того, к чему относятся, если контекст ясно не указывает иначе.

45

[0014] Как используют здесь, термин "ингибитор циклин-зависимой киназы" (также именуемый здесь в виде "CDK-ингибитор" или "SKI") относится к классу белков, которые негативно регулируют циклин-зависимые киназы (CDKs). SKIs, подлежащие изобретению, являются ингибиторами, имеющими отдельные области полипептида, обеспечивающими независимое связывание циклина и CDK. Такие SKIs включают в себя, например, идентифицированные семейства растительных SKIs (семь идентифицированных SKIs арабидопсиса), имеющих гомологию с белками-ингибиторами

50

киназ (KIPs) у животных, называемых KIP-родственными белками (KIPs) (также известных как ингибиторы "CDKs," или "ICKs").

5 [0015] Поочередно используемые здесь термины "полипептид" и "белок" относятся к полимеру аминокислотных остатков.

[0016] Термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам или
10 рибонуклеотидам и их полимерам или в одноцепочечной или в двухцепочечной форме. Если специально не лимитировано, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают
15 аналогичными связывающими свойствами, как и референсная нуклеиновая кислота и метаболизируются способом, аналогичным природным нуклеотидам. Если не отмечено иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также полностью охватывает ее консервативные модифицированные варианты (например, замены в
20 вырожденных кодонах). В частности, замены в вырожденных кодонах могут быть получены созданием последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких кодонов, или большего количества выбранных (или всех) кодонов заменяют на смешанные основания и/или дезоксиинозиновые остатки (смотри, например, Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994). Термин нуклеиновая кислота употребляют
25 наравне с термином ген, кДНК и мРНК, кодируемые геном.

[0017] Термин "природный" в контексте полипептидов SKI и нуклеиновых кислот означает
30 полипептид или нуклеиновую кислоту, имеющих аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которую обнаруживают в природе, то есть аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая может быть выделена из природного
35 источника (организма), и которая не была преднамеренно модифицирована вмешательством человека. Используемый здесь термин лабораторные линии растений, которые могли быть селекционно выведены в соответствии с классической генетикой, считают природными растениями.
40

[0018] Используемый здесь термин, "ген SKI дикого типа" или "нуклеиновая кислота SKI
45 дикого типа" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей генетическому локусу SKI в геноме организма, которая кодирует продукт гена, выполняющего нормальную функцию белка SKI, кодируемого природной нуклеотидной последовательностью, соответствующей генетическому локусу. Генетический локус может иметь более чем одну последовательность или аллель в популяции индивидуумов, и термин "дикий тип" охватывает все такие природные аллели, которые кодируют
50 продукт гена, выполняющего нормальную функцию. Также "дикий тип" охватывает

последовательности генов, которые не обязательно являются природными, но, тем не менее, кодируют продукт гена с нормальной функцией (например, гены, имеющие молчащие мутации, или кодирующие белки с консервативными заменами).

5

[0019] Термин "полипептид SKI дикого типа" или "белок SKI дикого типа" относится к полипептиду SKI, кодируемому геном дикого типа. Генетический локус может иметь более чем одну последовательность или аллель в популяции индивидуумов, и термин "дикий тип" охватывает все такие природные аллели, которые кодируют продукт гена, выполняющего нормальную функцию.

10

[0020] Термин "мутант" или "вариант" в контексте полипептидов и нуклеиновых кислот SKI изобретения, означает полипептид или нуклеиновую кислоту, которую является модифицированной относительно соответствующего полипептида или нуклеиновой кислоты дикого типа.

15

[0021] Термин "ссылочный полипептид SKI" является термином, используемым здесь в целях определения мутантного или вариантного полипептида SKI: термин относится к полипептиду SKI, с которым сравнивают мутантный полипептид SKI в целях определения модификаций в аминокислотной последовательности. Таким образом, мутантный полипептид SKI "содержащий аминокислотную последовательность SKI, имеющую, по меньшей мере, одну модификацию относительно ссылочного полипептида SKI", означает, что за исключением одной или нескольких модификаций (модификации) аминокислотных остатков, мутантный полипептид SKI в остальном содержит аминокислотную последовательность ссылочного полипептида. При выполнении изобретения, как описывают здесь, ссылочные полипептиды SKI предопределяют заранее. Ссылочный полипептид SKI может быть, например, полипептидом дикого типа и/или а природным полипептидом SKI или полипептидом SKI, который специально был модифицирован.

20

25

30

35

[0022] Термин "модифицированное связывание" или "измененное связывание" относится к мутантному полипептиду SKI, кодируемому геном дикого типа, ссылочный SKI-полипептид которого связывает комплекс циклин/CDK. Термин "модифицированное связывание" или "измененное связывание" здесь относится к связыванию мутантного SKI с киназным комплексом циклин/CDK. Термин "модифицированное связывание" или "измененное связывание" относится к относительному связыванию мутантного полипептида SKI по сравнению со ссылочным полипептидом SKI. "Модифицированное связывание" или "измененное связывание" может относиться к мутантному полипептиду SKI, который имеет равноценное связывание, пониженное связывание или эквивалентное связывание с комплексом циклин/CDK по сравнению со ссылочным полипептидом SKI.

40

45

50

[0023] Как используют здесь, "рекомбинантная" относится к аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, которая была специально модифицирована рекомбинантными методами. Термин "рекомбинантная нуклеиновая кислота" здесь означает нуклеиновую кислоту, изначально образованную *in vitro*, обычно обработкой нуклеиновой кислоты эндонуклеазами, в форме, не обнаруживаемой обычно в природе. Таким образом, выделенная мутантная или вариантная нуклеиновая кислота SKI в линейной форме, или экспрессионный вектор, образованные *in vitro* лигированием молекул ДНК, которые обычно не соединяются, обе считают рекомбинантными в целях данного изобретения. Разумеется, что как только рекомбинантную нуклеиновую кислоту делают и вновь вводят в клетку хозяина или организм, она будет реплицироваться нереккомбинантно, то есть с использованием клеточного механизма клетки-хозяина *in vivo*, скорее, чем манипуляции *in vitro*; однако такие нуклеиновые кислоты, если только получены в результате рекомбинации, даже если впоследствии реплицировались нереккомбинантно, все же в целях изобретения считают рекомбинантными. "Рекомбинантный белок" означает белок, изготовленный с использованием рекомбинантных методов, то есть посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты как показано выше. Рекомбинантный белок отличается от природного белка, по меньшей мере, одним или несколькими свойствами.

[0024] Что касается аминокислот, "неконсервативная" модификация означает модификацию, в которой остаток дикого типа и мутантный остаток существенно отличаются по одному или нескольким физическим свойствам, в том числе гидрофобности, заряду, размеру и форме. Например, модификации полярного остатка на неполярный остаток или наоборот, модификации положительно заряженных остатков на отрицательно заряженные остатки, или наоборот и модификации крупных остатков до мелких остатков, или наоборот являются неконсервативными модификациями. Например, могут быть сделаны замещения, которые более существенно затрагивают: структуру полипептидного остова в области изменения, например, альфа-спиральную или бета-складчатую структуру; заряд или гидрофобность молекулы в участке-мишени; или величину боковой цепи. Замещения, которые в основном ожидают для создания наибольших изменений в свойствах полипептидов, являются замещения, при которых (а) гидрофильный остаток, например, серил или треонил, замещают на гидрофобный остаток (или гидрофобным остатком), например, лейцил, изолейцил, фенилаланил, валил или аланил; (b) цистеин или пролин замещают на любой другой остаток (или любым другим остатком); (c) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например, лизил, аргинил или гистидил замещают на электроотрицательный остаток (или электроотрицательным остатком), например, на глутамил или аспартил; или (d) остаток,

имеющий объемную боковую цепь, например, фенилаланин, замещают на остаток (или остатком), не имеющим боковой цепи, например, глицин.

5 [0025] Консервативными модификациями обычно являются модификации, показанные ниже, однако, как известно в данной области, другие замещения могут считаться консервативными.

10

Ala: Ser

Arg: Lys

15

Asn: Gln, His

Asp: Glu

20

Cys: Ser

Gln: Asn

25

Glu: Asp

Gly: Pro

30

His: Asn, Gln

Ile: Leu, Val

Leu: Ile, Val

35

Lys: Arg, Gln, Glu

Met: Leu, Ile

40

Phe: Met, Leu, Tyr

Ser: Thr

45

Thr: Ser

Trp: Tyr

50

Tyr: Trp, Phe

Val: Ile, Leu

5 [0026] Термин "доминантно-негативный" в контексте механизма действия белка или фенотипа гена относится к мутантному или модифицированному белку или гену, кодирующему мутантный или модифицированный белок, который существенно предохраняет соответствующий белок, имеющий функцию дикого типа, от выполнения функции дикого типа.

10 [0027] Фраза "антагонист СК1 дикого типа" как используют здесь, означает, что мутантный полипептид СК1 существенно снижает (ингибирует) способность полипептида СК1 дикого типа ингибировать киназную активность комплексов CDK/циклин по сравнению с ингибированием киназной активности полипептидом СК1 дикого типа в отсутствие антагониста.

20 [0028] Нуклеиновая кислота является "функционально присоединенной" в тех случаях, когда ее помещают в функциональную зависимость от другой последовательности нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер является функционально присоединенным к кодирующей последовательности, если это присоединение влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы является функционально присоединенным к кодирующей последовательности, если он располагается так, чтобы облегчить трансляцию.

30 [0029] Термин "растение" включает в себя целые растения, органы растений (например, листья, стебли, цветки, корни и тому подобное), семена и растительные клетки (в том числе клетки культуры тканей) и их потомство. Класс растений, который может быть использован в способах изобретения является вообще таким же обширным, как и класс высших растений, подлежащих методам трансформации, в том числе голосемянные и покрытосемянные, как однодольные, так и двудольные растения, а также конкретные низшие растения, такие как водоросли. Этот класс включает в себя растения различных уровней пloidности, в том числе полиплоидные, диплоидные и гаплоидные. Примеры однодольных покрытосемянных включают в себя, например, спаржу, полевою и сахарную кукурузу, ячмень, пшеницу, рис, сорго, сахарный тростник, лук, просо, рожь и овес и другие зерновые злаки. Примеры двудольных покрытосемянных включают в себя, но не ограничиваются, томаты, табак, хлопок, рапсовые (канола), камелину, конские бобы, соевые бобы, перцы, салат-латук и тому подобное. Примеры древесных пород 45 включают в себя тополь, сосну, кедр, дуб, пихту и тому подобное.

50 [0030] "Гетерологичная последовательность" означает последовательность, которая происходит из различных видов или в случае происхождения из тех же видов, является

существенно измененной исходя из ее первоначальной формы. Например, гетерологичный промотор, функционально присоединенный к структурному гену, является промотором видов отличных от тех, из которых получали структурный ген, или является существенно модифицированным по отношению к его исходной форме при получении из тех же самых видов.

[0031] Термин "вектор" относится к отрезку ДНК, типично двунитевой, который может иметь встроенный в него отрезок чужеродной ДНК. Вектор или репликон может быть, например, плазмидного или вирусного происхождения. Векторы содержат "репликон", полинуклеотидные последовательности, которые обеспечивают автономную репликацию вектора в клетке хозяина. Термин "репликон" в контексте раскрытия этого изобретения также включает в себя участки полинуклеотидной последовательности, которые направляют или другим способом способствуют рекомбинации векторных последовательностей в хромосоме хозяина. Кроме того, при возможном исходном встраивании чужеродной ДНК, например, в ДНК вирусного вектора, трансформация ДНК вирусного вектора в клетку хозяина может приводить к превращению вирусной ДНК в векторную молекулу вирусной РНК. Чужеродную ДНК определяют в виде гетерологичной ДНК, которая является ДНК, не обнаруживаемой в естественных условиях в клетке хозяина, которая, например, реплицирует векторную молекулу, кодирует селективируемый маркер или маркер для скрининга или трансген. Вектор применяют для переноса чужеродной или гетерологичной ДНК внутрь подходящей клетки-хозяина. Поскольку в клетке хозяина вектор может реплицироваться автономно или одновременно с хромосомной ДНК хозяина, то может быть синтезировано несколько копий вектора и встроенной в него ДНК. Альтернативно вектор может направить инсерцию чужеродной или гетерологичной ДНК в хромосому клетки-хозяина. Кроме того вектор также может содержать необходимые элементы, которые обеспечивают транскрипцию встроенной ДНК в молекулу мРНК или иным способом осуществляют репликацию встроенной ДНК в множественные копии РНК. Некоторые экспрессионные векторы дополнительно содержат элементы последовательностей, расположенные рядом с встроенной ДНК, что обеспечивает трансляцию мРНК в молекулу белка. Таким образом, многие молекулы мРНК и полипептида, кодируемого встроенной ДНК, могут быть быстро синтезированы.

[0032] Термин "трансгенный вектор" относится к вектору, который содержит встроенный сегмент ДНК, "трансген", который транскрибируется в мРНК или реплицируется в виде РНК в клетке хозяина. Термин "трансген" относится не только к той части встроенной ДНК, которая преобразуется в РНК, но также к тем частям вектора, которые являются необходимыми для транскрипции или репликации РНК. Кроме того, трансген не обязательно должен содержать полинуклеотидную последовательность, которая содержит открытую рамку считывания, обеспечивающую синтез белка.

[0033] Термины "трансформированная клетка-хозяин" "трансформированный" и "трансформация" относятся к введению ДНК в клетку. Клетку называют "клетка-хозяин", и она может быть прокариотической или эукариотической клеткой. Типичные прокариотические клетки хозяина включают в себя различные штаммы *E. coli*. Типичными эукариотическими клетками-хозяевами являются клетки растений (например, клетки канолы, сои, риса или кукурузы и тому подобное), клетки дрожжей, клетки насекомых или клетки животных. Введенная ДНК обычно находится в форме вектора, содержащего введенный фрагмент ДНК. Встроенная последовательность ДНК может быть тех же самых видов, что и клетка-хозяин или видов, отличных от клетки-хозяина, или она может быть гибридной последовательностью ДНК, содержащей часть чужеродной ДНК и часть ДНК, полученной из видов хозяина.

[0034] В контексте относительно полипептидов SKI и нуклеиновых кислот "соответствие" другой последовательности (например, областям, фрагментам, положениям нуклеотидов или аминокислот и тому подобное) основывают на условном обозначении цифрового обозначения в соответствии с номером позиции нуклеотида или аминокислоты и затем выравнивание последовательностей способом, который максимизирует число нуклеотидов или аминокислот, которые совпадают в каждом положении, то есть способом, который максимизирует процентное содержание идентичности последовательности. Поскольку не все положения с данной "соответствующей областью" должны быть идентичными, несоответствие положений в пределах соответствующей области могут считаться в качестве "соответствующих позиций". Таким образом, как используют здесь, ссылка на "позицию аминокислоты, соответствующую позиции X аминокислоты" указанного полипептида SKI представляет ссылку на множество эквивалентных позиций в других признанных полипептидах SKI и структурных гомологах и семействах.

[0035] В типичном воплощении варианта изобретения, имеющего отношение к суперсемейству KRP полипептидов и нуклеиновых кислот SKI, "соответствие" положения аминокислот или нуклеотидов типично определяют относительно аминокислот внутри CDK-связывающей области или нуклеотидов, кодирующих CDK-связывающую область. В целом, по сравнению с другими областями полипептидов KRP, CDK-связывающие области SKIs KRP имеют общую существенную идентичность последовательности или сходство. Таким образом, одним существенным способом определения CDK-связывающей области полипептида SKI KRP является идентификация аминокислотного участка, имеющего общую существенную идентичность последовательности или сходство с известной CDK-связывающей областью встроеного SKI KRP (например, позиции аминокислот, начиная приблизительно с 145-168, *Brassica napus* Krp1 (Bn Krp1)). (Смотри, например, фигуру 1, демонстрирующую выравнивание аминокислотных

последовательностей нескольких членов семейства СК1 с BnKrp1.) Как только последовательность, соответствующая CDK-связывающей области, была определена путем выравнивания последовательностей, следовательно, могут быть определены соответствующие позиции аминокислот или нуклеотидов.

[0036] Как используют здесь, "процент идентичности последовательности" определяют сравнением двух оптимально выровненных последовательностей с помощью окна сравнения, где часть последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (то есть, бреши) по сравнению со ссылочной последовательностью (которая не содержит вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентное содержание вычисляют определением числа позиций, при которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях для образования ряда выровненных позиций, делением числа выровненных позиций на общее число позиций в окне сравнения и умножением результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

[0037] Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или нескольких нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или нескольким последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (например, идентичность 60%, избирательно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% идентичности по сравнению с точно установленной областью) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения, или обозначенной области, в виде измеренной с использованием одного из нескольких следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или путем выравнивания вручную и визуального контроля. Последовательности являются "существенно идентичными" друг другу при их идентичности, по меньшей мере, приблизительно на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 55%. Эти определения также относятся к комплементу тестируемой последовательности. Избирательно, идентичность существует на протяжении области полипептида, которая составляет, по меньшей мере, приблизительно 6 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 15 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 25 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 35 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 50 аминокислотных остатков в длину или, по меньшей мере, приблизительно 100 или более аминокислотных остатков в длину, или на протяжении участка нуклеиновой кислоты, кодирующего такую область

полипептида. В конкретных предпочтительных аспектах данного изобретения, обозначенной областью сравнения является CDK-связывающая область полипептида SKI, область полипептида, содержащая часть такой CDK-связывающей области или область полипептида, содержащая такую CDK-связывающую область.

[0038] Термины "идентичность" или "степень сходства" в контексте двух или нескольких полипептидных последовательностей относится к двум или нескольким последовательностям или субпоследовательностям, которые имеют указанный процент аминокислотных остатков, которые являются или одинаковыми, или сходными, как определено консервативной заменой аминокислоты (например, 60% идентичности, избирательно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности на протяжении установленной области) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения, или обозначенной области, в виде измеренной с использованием одного из нескольких следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или путем выравнивания вручную и визуального контроля. Последовательности являются "существенно идентичными" друг другу при их идентичности, по меньшей мере, приблизительно на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50% или, по меньшей мере, на 55%. Избирательно, эта идентичность существует на протяжении области, которая составляет по меньшей мере, приблизительно 6 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 15 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 25 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 35 аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере, приблизительно 50 аминокислотных остатков в длину, или по меньшей мере, приблизительно 100 или более аминокислотных остатков в длину.

[0039] В конкретных аспектах данного изобретения для определения идентичности последовательности или сходства, обозначенной областью сравнения является CDK-связывающая область полипептида SKI, область полипептида, содержащая часть такой CDK-связывающей области, или область полипептида, содержащая такую CDK-связывающую область.

[0040] Для сравнения последовательностей типично одна последовательность действует в качестве ссылочной последовательности, с которой сравнивают тестируемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и ссылочную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательности, и определяют параметры и алгоритм программы для последовательностей. Могут быть использованы параметры программы

по умолчанию или могут быть определены альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процент идентичности последовательностей или сходства тестируемых последовательностей относительно референсной последовательности на основе параметров программы.

[0041] Как используют здесь термин "окно сравнения" включает в себя эталон к сегменту непрерывных аминокислотных или нуклеотидных позиций, в котором последовательность может быть сравнена со ссылочной последовательностью с тем же самым числом непрерывных позиций после оптимального выравнивания двух последовательностей. Что касается сравнения полипептидов СК1 в соответствии с данным изобретением окно сравнения типично составляет от около 6 до около 200 или более аминокислот непрерывной последовательности, типично приблизительно от 6 до приблизительно 50, приблизительно от 6 до приблизительно 25, приблизительно от 15 до приблизительно 100, приблизительно от 15 до приблизительно 50, приблизительно от 15 до приблизительно 30, приблизительно от 20 до приблизительно 50 или приблизительно от 25 до приблизительно 50 аминокислот непрерывной последовательности. Методы выравнивания последовательностей для сравнения являются хорошо известными в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть выполнено, например, путем алгоритма Смита-Ватермана (Smith and Waterman) поиска локальной гомологии (*Adv. Appl Math.* 2:482, 1970), путем алгоритма поиска гомологии и выравнивания Нидльмана-Вунша (Needleman and Wunsch) (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), поиском сходства методом Липмана и Пирсона (Pearson and Lipman) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), компьютеризированной реализацией этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в виде пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), или выравниванием вручную и визуальным контролем (смотри, например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 приложение)).

[0042] Одним примером пригодного алгоритма является алгоритм PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательности из группы родственных последовательностей с использованием последовательных попарных выравниваний для обнаружения родства и процента идентичности последовательности. Он также строит дерево или дендрограмму, показывающую кластерные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение метода прогрессивного выравнивания Фенга и Дулиттл (Feng and Doolittle) (*J Mol. Evol.* 35:351-360, 1987). Используемый метод является аналогичным методу, описанному Хиггинсом и Шарпом (Higgins and Sharp) (*CABIOS* 5:151-153, 1989). Программа может выравнивать до 300 последовательностей, каждая с максимальной длиной 5000 нуклеотидов или аминокислот. Процедура множественного выравнивания начинается с парного

выравнивания двух наиболее сходных последовательностей с образованием кластера двух выровненных последовательностей. Затем этот кластер выравнивают со следующей наиболее сходной последовательностью или кластером выровненных последовательностей. Два кластера или последовательности выравнивают простым расширением попарного выравнивания двух индивидуальных последовательностей. Окончательное выравнивание достигают сериями прогрессивных, попарных выравниваний. Программу выполняют определением специфических последовательностей и координат их аминокислот или нуклеотидов для областей сравнения последовательности определением параметров программы. С использованием PILEUP сравнивают ссылочную последовательность с другими тестируемыми последовательностями для определения процентного соотношения идентичности последовательностей с использованием следующих параметров: вес разрыва, используемый по умолчанию (3,00), вес длины делеции, используемый по умолчанию (0,10) и взвешенные концевые делеции. PILEUP может быть получен из программного обеспечения GCG sequence analysis software package (например, версия 7.0 (Devereaux *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:387-395, 1984).

[0043] Другим примером алгоритма, который является подходящим для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описывают у Altschul *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977) и Altschul *et al.* (*J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), соответственно. Программное обеспечение для выполнения анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию сегментов совпадения наибольшего веса (HSPs) путем идентификации коротких слов длины W в последовательности поиска, которые или совпадают или удовлетворяют некоторым положительным значениям пороговой оценки T при выравнивании со словом той же самой длины базе данных последовательностей. T относится к окрестностной пороговой оценке слова (Altschul *et al.*, выше). Эти начальные удары окрестностей слова действуют в качестве заправки для инициации поисков для обнаружения более длинных HSPs, содержащих их. Удары слова расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько совокупная оценка выравнивания может быть увеличена. Совокупные оценки вычисляют с помощью, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (оценка поощрения для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (оценка штрафа несовпадающих остатков; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей используют количественную оценку матриц для подсчета совокупного показателя. Расширение ударов слова в каждом направлении останавливаются при: резком падении совокупной оценки выравнивания в количественном значении X от его максимально достигнутого значения; движении

совокупной оценки к нулю или ниже, вследствие накапливания одного или нескольких выравниваний остатков с негативной оценкой; или при достижении конца любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T , и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует в качестве значений по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) или 10, $M = 5$, $N = -4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует в качестве значений по умолчанию длину слова 3 и ожидание (E) 10 и количественную оценку матриц BLOSUM62 (смотри, Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992) выравнивания (B) 50, ожидание (E) f 10, $M = 5$, $N = -4$ и сравнение обеих цепей.

[0044] Также алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (смотри, например, Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5887, 1993). Один показатель сходства, представленный алгоритмом BLAST, является наименьшей суммой вероятностей ($P(N)$), которая предоставляет показатель вероятности, согласно которому совпадение между двумя нуклеотидами или аминокислотными последовательностями произошло бы случайно. Например, считается, что нуклеиновая кислота сходна со ссылочной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении испытуемой нуклеиновой кислоты со ссылочной нуклеиновой кислотой составляет менее чем около 0,2, типично менее чем около 0,01 и более типично менее чем около 0,001.

[0045] Гены-гомологи и гены-ортологи также могут быть идентифицированы с помощью ресурса HomoloGene от Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Гомолог или ортолог первого гена может кодировать продукт гена, который имеет ту же или сходную функцию в качестве продукта гена, кодируемого первым геном. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептиды являются ортологами является то, что гетерологичный ген может дополнить (например, спасти) нулевой аллель эндогенного гена в экспрессирующей системе эукариотической клетки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

[0046] Фигура 1 (A,B) демонстрирует выравнивание аминокислотной последовательности членов семейства KRP *Arabidopsis* с членами семейства Krp *Brassica*.

Последовательности KRPs *Arabidopsis* получали из общедоступной базы данных: AtKrp1 (Genbank # U94772) (SEQ ID NO:2); AtKrp2 (Genbank#CAB76424) (SEQ ID NO:3); AtKrp3 (Genbank # CAC41617) (SEQ ID NO:4); AtKrp4 (Genbank # CAC41618) (SEQ ID NO:5); AtKrp5 (Genbank # CAC41619) (SEQ ID NO:6); AtKrp6 (Genbank # CAC41620) (SEQ ID

NO:7) и AtKrp7 (Genbank # CAC41621) (SEQ ID NO:8). Последовательности KRPs *Brassica* (BnKrp1(SEQ ID NO:68), BnKrp3 (SEQ ID NO:69), BnKrp4 (SEQ ID NO:70), BnKrp5 (SEQ ID NO:71) и BnKrp6 (SEQ ID NO:72)) получали в виде описанной в примере 1, ниже. Также демонстрируют аминокислотную последовательность p27 (SEQ ID NO:73).

[0047] Фигура 2 демонстрирует выравнивание аминокислотной последовательности циклин-связывающего и CDK-связывающего доменов кукурузы (SEQ ID NO:9), канолы, сои (SEQ ID NO:11), тополя (SEQ ID NO:12), табака (SEQ ID NO:13), пшеницы, риса (SEQ ID NO:15) и картофеля (SEQ ID NO:16), иллюстрирующее высокую степень идентичности последовательностей в рамках CDK-связывающего домена.

[0048] Фигура 3 демонстрирует мутантные последовательности нуклеиновых кислот BnKrpI, в которых кодон был оптимизирован для экспрессии в кукурузе, кодирующие или BnKrp1 F151A;153A (SEQ ID NO:74), или BnKrp1 Y149A; F151A; F153A (SEQ ID NO:75).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0049] Данное изобретение содержит композиции и способы модуляции деления растительных клеток. В частности, предоставляют полипептиды, которые противодействуют функции белка SKI дикого типа через доминантно-негативный механизм, а также родственные полинуклеотиды, клетки хозяина, трансгенные растения и способы их применения. Широкое разнообразие трансгенных векторов, содержащих полинуклеотид, кодирующий вариантный доминантно-негативный полипептид SKI, может быть применено для осуществления на практике данного изобретения. При введении трансгенов SKI изобретения в растения и экспрессии модулируется деление клеток растений. Модуляция клеточного деления может происходить по всему растению или ткане-специфичным или органо-специфичным образом в зависимости от типа промоторной последовательности, функционально присоединенной к варианту трансгена SKI. В частности, композиции и способы, представленные здесь, могут быть применены для ускорения развития растительных клеток на протяжении клеточного цикла вместе с сопровождающимся усилением пролиферации клеток. Применение композиций и способов таким образом обеспечивает, например, производство любого из широкого ряда растений с повышенной урожайностью и/или размером семян. Повышение урожайности может включать в себя, например, увеличенную ткань листа, увеличенный плод, усиленное образование цветков, повышенную массу корней и тому подобное.

[0050] В конкретных вариантах изобретения вариантный полипептид SKI является членом семейства KRP. Этот аспект изобретения базируется, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что CDK-связывающая область членов семейства KRP является в

первую очередь ответственной за ингибирование комплексов циклин-CDK. Таким образом, целенаправленное изменение CDK-связывающей области у членов KRP-семейства (в отличие от циклин-связывающей области) обеспечивает создание мутантных белков, которые являются конкретно эффективными доминантно-негативными антагонистами функции SKI дикого типа.

Мутантные полипептиды SKI, нуклеиновые кислоты и векторы

[0051] Полипептиды SKI изобретения являются мутантными или вариантными белками отличимыми от естественных или SKIs дикого типа. Вариантные полипептиды SKI содержат, по меньшей мере, одну модификацию относительно ссылочного полипептида SKI (например, белок SKI дикого типа) в CDK-связывающей или циклин-связывающей области белка. Типичные модификации включают в себя замещения аминокислот, инсерции и/или делеции по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа. Конкретно подходящие модификации означают аминокислотные замены. В конкретных воплощениях изобретения вариантный полипептид SKI содержит, по меньшей мере, одну неконсервативную модификацию (например, замену).

[0052] Мутантные полипептиды SKI изобретения представляют собой доминантно-негативные белки. Доминантно-негативный подход является конкретно пригодным для полипептидов SKI, имеющих две области полипептида, по отдельности вовлеченных в связывание с CDK и связывание с циклином. Общий подход создания доминантно-негативных мутантов изобретения включает в себя модифицирование одной из отдельных CDK-связывающей или циклин-связывающей областей с тем, чтобы модифицировать связывание «дикого типа» с CDK или с циклином. Такая модифицированная CDK-связывающая или циклин-связывающая область может приводить или к эквивалентному, пониженному или элиминированному связыванию с циклином или CDK по сравнению с полипептидом дикого типа. В другом случае мутация снизила бы или элиминировала ингибирующую киназную активность SKIs. Для конструирования доминантно-негативного полипептида SKI, который может препятствовать функции дикого типа мутантный полипептид должен (1) существенно связываться с комплексами циклин/CDK; (2) не существенно ингибировать комплекс циклин/CDK даже при высоких концентрациях; и (3) конкурировать с полипептидом SKI дикого типа за связывание с комплексом циклин/CDK. *In vivo*, мутантные полипептиды SKI, которые соответствуют всем этим требованиям, в результате дают повышенную киназную активность циклин/CDK в клетке, которая в свою очередь, приводит к повышенной клеточной пролиферации и более высокому митотическому индексу, что в конечном счете ведет к растениям с повышенной урожайностью, с более крупными

семенами и/или с несколько другим характерным признаком, ассоциированным с повышенной киназной активностью циклин/CDK в одной или нескольких зонах растения.

5 [0053] В конкретном случае полипептидов KRP, CDK-связывающая область, которая несет основную ответственность за ингибирование киназной активности циклин/CDK в этом семействе полипептидов CKI, предназначена для модификации.

10 [0054] Конкретно подходящие модификации включают в себя замещения аминокислот, инсерции или делеции. Например, замещения аминокислот могут быть созданы в виде модификаций в CDK-связывающей или циклин-связывающей области, что приводит к снижению или устранению связывания. Аналогично замещения аминокислот могут быть
15 созданы в виде модификаций CDK-связывающей или циклин-связывающей области, что приводит к снижению или устранению ингибирующей активности CKI. В типичных вариантах воплощения изобретения, делают, по меньшей мере, одну неконсервативную аминокислотную замену, инсерцию или делецию в CDK-связывающей или циклин-связывающей области для нарушения или модификации связывания полипептида CKI с CDK или циклиновым белком.

25 [0055] Существенные мутанты полипептида CKI представляют собой мутанты, которые имеют, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, удаленный из ссылочного полипептида CKI, и другую аминокислоту, встроенную на его место в том же самом положении. Замещения могут быть единичными, в тех случаях, когда замещалась
30 только одна аминокислота в молекуле, или замещения могут быть множественными, в тех случаях, когда замещались две или несколько аминокислот в той же самой молекуле. Существенные изменения в активности молекул белка CKI изобретения могут быть получены замещением аминокислоты другой аминокислотой, боковая цепь которой
35 является существенно отличной по заряду и/или структуре от боковой цепи нативной аминокислоты, аминокислотой с зарядом, противоположным заряду нативной аминокислоты, или аминокислотой с гидрофильностью, противоположной гидрофильности нативной аминокислоты и тому подобное. Было бы ожидаемым, что эти типы замещений окажут влияние на структуру остова полипептида и/или на заряд или гидрофобность молекулы в области замещения. В конкретных примерах осуществления изобретения мутант CKI для замещения включает в себя замену неаланинового остатка
40 на аланин. В других вариантах CKI замещения включает в себя замену аминокислотного остатка, например, на противоположно заряженную аминокислоту, аминокислотный остаток с более длинной боковой цепью, на аминокислоту с противоположной гидрофильностью, малую неполярную аминокислоту (например, Cys, Thr, Ser, Ala или Gly), или полярную аминокислоту (например, Pro, Glu, Asp, Asn, или Gln).

[0056] Инсерционными мутантами полипептидов СКІ являются полипептиды с одной или несколькими аминокислотами, встроенными непосредственно рядом с аминокислотой в конкретном положении в молекуле ссылочного белка СКІ. Непосредственно рядом с аминокислотой означает присоединенный или к α -карбокси- или α -амино-функциональной группе аминокислоты. Инсерцией могут быть одна или несколько аминокислот. Инсерция может состоять, например, из одной или двух консервативных аминокислот. Аминокислоты, сходные по заряду и/или структуре с аминокислотами, расположенными рядом с сайтом инсерции, определяют как консервативные. Альтернативно мутантный СКІ включает в себя инсерцию аминокислоты с зарядом и/или структурой, которая является существенно отличной от аминокислот, расположенных рядом с сайтом инсерции.

[0057] Делеционными мутантными полипептидами СКІ являются такие, у которых удалили одну или несколько аминокислот, относительно молекул ссылочного белка СКІ. В некоторых вариантах изобретения делеционные мутанты будут иметь одну, две или несколько аминокислот, делетированные в конкретной области молекулы белка СКІ. Делеционные мутанты могут включать в себя, например, мутанты, имеющие укороченные амино- или карбокси-концы.

[0058] Способы изобретения могут быть применимы к любому общепризнанному члену семейства белков СКІ, у которых индивидуальные области вовлечены в связывание CDK и циклиновых белков для ингибирования функции CDK. В одном варианте мутантные белки СКІ представляют собой мутанты или варианты белков, принадлежащих к семейству KRP СКІs. Как отмечают выше, CDK-связывающая область членов семейства KRP в первую очередь является ответственной за ингибирование киназ. Таким образом, CDK-связывающая область является предпочтительно предназначенной для модификации при создании вариантных KRP-полипептидов СКІ. CDK-связывающая область KRP-белков в основном соответствует аминокислотам 145-168 Krp1 *Brassica napus* (BnKrp1) (SEQ ID NO:17). В конкретных вариантах модификация CDK-связывающей области члена семейства KRP содержит модификацию, по меньшей мере, одного положения аминокислоты, двух положений аминокислоты или нескольких внутри области, соответствующей положениям 145-168 BnKrp1. (Соответствующая область Krp1 у *Arabidopsis thaliana* содержит аминокислоты 167-190.) Конкретно подходящие положения аминокислот для модификации включают в себя такие положения, соответствующие аминокислотам 145, 148, 149, 151, 153, 155, 163, 164, 165 и/или 167 Krp1 *Brassica napus* (BnKrp1). Соответствующие аминокислотные остатки в другом полипептиде СКІ являются легко определяемыми путем выравнивания последовательностей с использованием известных методов и как описывают здесь далее.

[0059] В каждом случае вышеуказанные аминокислоты являются консервативными р27 у млекопитающих и все контактируют с CDK, в кристаллической структуре р27 образовывал комплекс с циклином А и CDK2. В одном варианте изобретения модификация CDK-связывающей области KRP содержит модификацию аминокислот, соответствующим положениям аминокислот 151 и 153 ВnKrp1 (например, замена аминокислоты, например, на аланин или противоположно заряженную аминокислоту в каждом из этих положений). В других примерах осуществления изобретения в дополнение к модификации аминокислот, соответствующим положениям 151 и 153 ВnKrp1, модификация CDK-связывающей области KRP дополнительно включает в себя модификацию (модификации) в положении (положениях), соответствующему (соответствующим) аминокислоте (амнокислотам) 149, 164 и/или 165 ВnKrp1 (например, дополнительная замена аминокислоты в положении, соответствующем аминокислоте 149 ВnKrp1; или две дополнительные аминокислотные замены в положениях, соответствующих как аминокислоте 164, так и аминокислоте 165 ВnKrp1). Такая модификация (модификации) в полипептиде SKI KRP модифицируют аффинность связывания CDK-белка при существенном сохранении способности вариантного белка связывать циклиновый белок.

[0060] Модификация особенно интересной CDK-связывающей области Krp включает в себя, помимо прочего, модификации, соответствующие любой из следующих аминокислотных замен:

ВnKrp1 F145A;Y149A

ВnKrp1 F145A;Y149A;F151A

ВnKrp1 F145A;Y149A;F151A;F153A

ВnKrp1 Y149A;F151A

ВnKrp1 Y149A;F153A

ВnKrp1 F151A;F153A

ВnKrp1 F151A;F153A;Y149A

ВnKrp1 F151A;F153A;E164A

ВnKrp1 F151A;F153A;W165A

ВnKrp1 F151A;F153A;E164A;W165A

VnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A

VnKrp1 F151A;F153A;Y149A;W165A

5

VnKrp1 F151A;F153A;Y149A;E164A;W165A

VnKrp1 E164A;W165A

10

В конкретных вариантах изобретения, SKI-полипептид, модифицированный как указано выше, означает VnKrp1. В других вариантах SKI, модифицированный как указано выше, не является VnKrp1 (например, *Arabidopsis thaliana*) с замещенными аминокислотами, соответствующими вышеизложенным аминокислотам.

15

[0061] Другие модификации (например, замены, инсерции, делеции), которые влияют на CDK или связывание циклина, в том числе дополнительные модификации среди членов семейства KRP могут быть идентифицированы с использованием множества способов, в том числе структурных методов выравнивания, методов выравнивания последовательностей и тому подобное. Мутантные или варианты белки могут быть произведены, например, с помощью системы PDA™, ранее описанной в патентах США №№ 6188965; 6296312 и 6403312; сканирования аланином (смотри, патент США N 5506107), перетасовки генов ((WO 01/25277), насыщающего мутагенеза генных участков, метода среднего поля, гомологии последовательностей или другими методами, известными специалистам в данной области, которые определяют выбор участков точечных мутаций и типы, как описывают здесь далее.

20

25

30

[0062] Вариантные SKI-полипептиды изобретения могут быть созданы мутацией последовательностей ДНК, которые кодируют соответствующий SKI дикого типа, или другого соответствующего SKI, из которого получают вариант, например, при помощи методов, обычно называемых сайт-направленный мутагенез. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие SKI-белки могут быть подвергнуты мутагенезу разнообразными способами полимеразной цепной реакции (ПЦР), хорошо известными любому обычному специалисту в данной области (смотри, например, *PCR Strategies* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky eds., 1995, Academic Press, San Diego, CA) at Chapter 14); *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds., Academic Press, NY, 1990). Дополнительно хорошо известные методы химического и/или радиационного мутагенеза являются хорошо известными в данной области могут быть использованы для индукции мутаций в кодирующих областях белков, членов семейства KRP. Скрининг может быть выполнен для обнаружения таких

35

40

45

50

растений, которые могут содержать желаемую нуклеотидную последовательность, кодирующую мутантный или вариантный K_{tr} изобретения. Растения могут быть подвергнуты скринингу на предмет изменений в аминокислотной последовательности SKI, изменений в киназной активности или ожидаемых изменений в фенотипе с последующим анализом последовательности.

[0063] С целью неограничивающего примера, система двух пар праймеров, используемая в наборе Transformer Site-Directed Mutagenesis kit (Clontech), может быть применена для введения сайт-направленных мутаций в ген, кодирующий SKI-белок. После денатурации плазмиды-мишени в этой системе, два праймера одновременно подвергаются отжигу с плазмидой; один из этих праймеров содержит желаемую сайт-направленную мутацию, другой содержит мутацию в другой точке плазмиды, приводящей к элиминации рестрикционного сайта. Затем проводят синтез второй цепи, прочно связывающей эти две мутации, и получаемые плазмиды трансформируют в штамм mutS *E. coli*. Плазмидную ДНК выделяют из трансформированной бактерии, подвергают рестрикции с помощью подходящего фермента рестрикции (таким образом линеаризуя немутировавшие плазмиды) и затем подвергают повторной трансформации в *E. coli*. Эта система предусматривает создание мутаций непосредственно в экспрессирующей плазмиде без необходимости субклонирования или получения одноцепочечных фагемид. Прочное сцепление двух мутаций и последующая линеаризация немутированных плазмид приводит к высокой эффективности мутаций и делает возможным минимальный скрининг. После синтеза исходного праймера сайта рестрикции этот метод требует использование только одного нового типа праймера на сайт мутации. Вместо приготовления каждого позиционного мутанта отдельно может быть синтезирован набор "сконструированных вырожденных" олигонуклеотидных праймеров для одновременного введения всех желаемых мутаций в данном сайте. Трансформанты могут быть подвергнуты скринингу секвенированием плазмидной ДНК всей мутагенизированной области для идентификации и сортировки мутантных клонов. Затем каждая мутантная ДНК может быть подвергнута рестрикции и проанализирована при помощи электрофореза, например, в геле Mutation Detection Enhancement gel (J. T. Baker) для подтверждения того, что никакие другие изменения в последовательности не произошли (сравнением замедления подвижности в геле с контролем без мутагенеза). Альтернативно, полная область ДНК может быть секвенирована для подтверждения того, что никакие мутационные события не произошли за пределами области-мишени.

[0064] Подтвержденные мутантные дуплексы в сверх-экспрессирующем векторе pET (или другом) могут быть использованы для трансформации *E. coli*, например, штамма BL21 (DE3) pLysS *E. coli* для высокого уровня образования мутантного белка, и очистки стандартными методами. Метод картирования с помощью FAB-MS может быть

использован для быстрой проверки правильности экспрессии мутанта. Этот метод предусматривает секвенирование сегментов по всему белку и предоставляет необходимую достоверность относительно назначения последовательности. В эксперименте такого типа по картированию белок подвергают расщеплению с помощью протеазы (выбор протеазы будет зависеть от специфической области, которая будет модифицирована, поскольку этот участок представляет первостепенный интерес, а остальная карта должна быть идентичной карте белка без мутагенеза). Набор фрагментов после расщепления подвергают фракционированию, например, микроколоночной ВЭЖХ (обращённо-фазовой или ионообменной, снова зависит от специфической области, которая будет модифицирована) для получения нескольких пептидов в каждой фракции, и молекулярные массы пептидов определяют стандартными методами, например, FAB-MS. Затем установленные массы каждого фрагмента сравнивают с молекулярными массами пептидов, ожидаемых после расщепления предсказанной последовательности, и быстро устанавливают правильность последовательности. Поскольку этот подход мутагенеза для модификации белка является направленным, то секвенирование измененного пептида не должен быть необходимым при согласовании данных MS с предсказанием. При необходимости подтверждения измененного остатка может быть применен тандем CAD-MS/MS для секвенирования пептидов в изучаемой смеси, или пептид-мишень может быть очищен для последовательного отщепления по Эдману или расщепления карбоксипептидазой Y в зависимости от локализации модификации.

[0065] При проектировании конкретного сайт-направленного мутагенеза вообще желательно сначала сделать неконсервативную замену и определить (а) что повреждается целевая CDK- или циклин-связывающая активность и (б) что любая нецелевая активность (например, связывание циклина при нацеливании в CDK-связывающую область) вследствие этого сильно повреждается. Если обнаруживают, что в результате этого остаток является важным для биологической активности, для которой не предназначается, тогда могут быть сделаны консервативные замены.

[0066] Другие способы сайт-направленного мутагенеза также могут быть использованы для нуклеотидных последовательностей CKI. Например, расщепление ДНК рестриктазой, за которым следует лигирование, может быть использовано для создания делеционных вариантов CKIs, как описывают в целом, в разделе 15.3 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY). Похожая стратегия может быть использована конструирования инсерционных вариантов, как описывают в разделе 15.3 of Sambrook *et al.*, *выше*. Совсем недавно Zhu *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8768-8773, 1999) разработали метод

направленных мутаций в генах растений *in vivo* с помощью химерных олигонуклеотидов РНК/ДНК.

5 [0067] Мутантные полипепитды с более чем одной замещенной аминокислотой могут
быть созданы одним из нескольких способов. При локализации аминокислот близко друг
к другу в полипептидной цепи они могут быть подвергнуты мутагенезу одновременно с
10 помощью одного олигонуклеотида, который кодирует все желаемые аминокислотные
замены. Однако, при локализации аминокислот на некотором расстоянии друг от друга
(например, разделенные более чем десятью аминокислостами) более трудным является
создание одного олигонуклеотида, который кодирует все желаемые изменения. Вместо
15 этого может быть применен один из двух альтернативных методов. В первом методе,
создают отдельный олигонуклеотид для каждой аминокислоты, которая должна быть
замещена. Затем олигонуклеотиды подвергают отжигу совместно с одноцепочечной
матричной ДНК, и вторая цепь ДНК, которая синтезируется на матрице, будет кодировать
20 все желаемые аминокислотные замены. Альтернативный метод заключается в двух или
нескольких раундах мутагенеза для получения желаемого мутанта. Первый раунд, как
описывают для одиночных мутантов, означает: ДНК СК1 дикого типа используют в
качестве матрицы, олигонуклеотид, кодирующий первую желаемую аминокислотную
25 замену (замены), подвергают отжигу с этой матрицей, и затем образуется
гетеродуплексная молекула ДНК. Второй раунд мутагенеза использует в качестве
матрицы мутировавшую ДНК, образованную в первом раунде мутагенеза. Таким
образом, эта матрица уже содержит одну или несколько мутаций. Затем олигонуклеотид,
30 кодирующий дополнительную желаемую аминокислотную замену (замены), подвергают
отжигу с этой матрицей, и образующаяся нить ДНК поэтому кодирует мутации и первого
и второго раундов мутагенеза. Эта получаемая ДНК может быть использована в качестве
матрицы в третьем раунде мутагенеза и так далее.

[0068] Один конкретно подходящий метод проведения идентификации подходящих
модификаций включает в себя выравнивание белков СК1 выравниванием
40 последовательностей. Существует ряд методологий выравнивания
последовательностей рассмотренных выше, которые использованы. Программы
выравнивания, основанные на последовательности, включают в себя, например,
алгоритм Смита-Ватермана (Smith-Waterman), Нидельмана-Вунша (Needleman-Wunsch),
45 Double Affine Smith-Waterman, поиск по рамке считывания, поиск по профилю
Gribbskov/GCG profile search, сканирование профиля (Gribbskov/GCG profile scan, поиск по
профилю рамки, генерализованные профили Bucher, скрытые марковские модели (Hidden
Markov models), Hframe, Double Frame, Blast, Psi-Blast, Clustal и GeneWise. (смотри,
50 например, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990; Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*
25:3389-3402, 1997, обе включены в качестве ссылок).

[0069] Аминокислотные последовательности полипептидов родственных SKI могут быть выровнены, например, в множественном выравнивании последовательности (MSA). (Смотри, например, Фигура 1.). MSA также может быть использовано для расширения структурной информации, известной для одного или нескольких полипептидов SKI для дополнительных полипептидов SKI (типично для полипептидов SKI, имеющих существенную идентичность последовательностей), которые еще не могут быть идентифицированы. Вследствие высокой протяженности структурной гомологии между различными полипептидами SKI MSA может быть использовано в качестве надежного предсказателя эффектов модификаций в различных положениях в течение выравнивания. Таким образом, в отношении членов семейства KRP, например, последовательность SKI и нумерация, показанная на фигуре 1, могут быть использованы в качестве исходной точки MSA для любой другой последовательности белка члена семейства KRP. Как отмечалось ранее, конкретно подходящие аминокислотные положения для модификации включают в себя те положения, соответствующие положениям аминокислот 145, 148, 149, 151, 153, 155, 163, 164, 165 и/или 167 KRP1 *Brassica napus* (BnKrp1). С помощью выравнивания, изображенного на фигуре 1, и/или с помощью программ для выравнивания, известных в данной области, например, программ описанных здесь, специалист может использовать в качестве точки отсчета систему нумерации программы выравнивания и может соотнести рассматриваемые положения полипептида SKI с аналогичными положениями в других обнаруженных членах SKIs или структурных гомологах и семействах. Похожие методы могут быть используемы для выравнивания аминокислотной последовательности (аминокислотных последовательностей) полипептида SKI, который еще должен быть секвенирован.

[0070] В конкретных случаях аминокислоты в SKI-полипептиде, который взаимодействует с CDK или циклиновым белком, могут быть идентифицированы непосредственно из трехмерной структуры комплексов SKI/CDK или SKI/циклин. Аналогичная информация может быть получена анализом комплекса SKI/CDK или SKI/циклин родственного полипептида SKI. Таким образом, выравнивания структур могут быть применены для создания вариантных полипептидов SKI изобретения. Существует широкий выбор программ выравнивания структур, известных в данной области. *Смотри, например*, VAST веб-сайт NCBI; SSAP (Orengo and Taylor, *Methods Enzymol.* 266:617-635, 1996); SARF2 (Alexandrov, *Protein Eng.* 9:727-732, 1996) CE (Shinydyalov and Bourne, *Protein Eng.* 11:739-747, 1998); (Orengo *et al.*, *Structure* 5:1093-108, 1997; Dali (Holm *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 26:316-9, 1998, все из которых включены в виде ссылки).

[0071] Таким образом, пригодные модификации в участках взаимодействия SKI/CDK или SKI/циклин могут быть отобраны с помощью алгоритмов структуры белка или алгоритмов моделирования, например, PDA™ способ (смотри, например, патенты США: 6188965;

6269312 и 6403312, включенные сюда в виде ссылки). Алгоритмы этого класса в основном используют оценочные функции на атомарном уровне или на уровне аминокислот для оценки совместимости аминокислотных последовательностей с общей третичной или четвертичной структурой белка. Таким образом, алгоритмы этого класса могут быть использованы для отбора модификаций и/или нарушений связывания CDK или циклина, которые не нарушают существенно способность вариантных белков SKI к правильному фолдингу и взаимодействию с природными мишенями, соответствующих немодифицированным участкам белка. Эти технологии типично используют в качестве вводной информации структурных данных высокого разрешения относительно белка-мишени. В одном варианте воплощения изобретения экспериментально определенную структуру подходящего белка SKI используют в качестве вводной информации. В альтернативных вариантах может быть использовано (пер., множественное выравнивание последовательности) MSA для формирования на атомарном уровне конструкции моделей гомологов членов SKI на основе субпопуляции семейства, трехмерные структуры которых были определены с помощью кристаллографических или родственных методов. Еще в другом варианте изобретения структурная модель взаимодействия p27/циклин млекопитающих может быть использована для прогнозирования связывающего аминокислотного остатка SKI растений.

[0072] Модифицированные мутантные полипептиды SKI, например, с редуцированным связыванием с CDK или циклиновым белком, также могут быть идентифицированы с помощью широкого разнообразия других методов, в том числе, например, направленной эволюции (например, подверженной ошибкам ПЦР, перетасовки ДНК и тому подобное), моносайтового насыщающего мутагенеза, сканирующего мутагенеза аланина. В случае SKIs KRP, например, использование этих и/или других методов может обеспечить идентификацию дополнительных модификаций, которые снижают CDK-связывающую активность и которые находятся за пределами CDK-связывающей области, описанной здесь.

[0073] Также, вычисления молекулярной динамики могут быть использованы для проведения скрининга последовательностей по вычислениям, путем индивидуально вычисленных оценок мутантной последовательности и составления списка. Также парные потенциалы остатков могут быть использованы для оценки последовательностей (Miyazawa *et al.*, *Macromolecules* 18: 534-552, 1985, включена сюда в виде ссылки) во время компьютерного скрининга.

[0074] Альтернативно библиотеки вариантных белков SKI могут быть изготовлены для тестирования. Например, библиотека вариантных аминокислотных последовательностей SKI может быть использована для конструирования нуклеиновых кислот, кодирующих

вариантные последовательности СК1, и которые затем могут быть клонированы в клетки хозяина, экспрессированы и проанализированы. Подбор кодонов, подходящих экспрессионных векторов и подходящих клеток хозяина типично будет варьировать в зависимости от ряда факторов и может быть легко оптимизирован при необходимости.

[0075] В одном конкретно подходящем методе скрининга библиотек мутантов, тестируемых на доминантно-негативную антагонистическую активность и/или другие желаемые активности как уже указано здесь, выполняют многократные ПЦР-реакции с помощью объединенных олигонуклеотидов. Синтезируют перекрывающиеся олигонуклеотиды, которые соответствуют полноразмерному гену. Такие олигонуклеотиды могут представлять собой все различные аминокислоты в каждом различном положении или субпопуляции. Эти олигонуклеотиды могут быть объединены в равных пропорциях, и многократные ПЦР-реакции выполнены для создания полноразмерных последовательностей, содержащих комбинации мутаций, определенных библиотекой. Кроме того, это может быть сделано с помощью методов ошибочно-направленной ПЦР.

[0076] Типично, каждый перекрывающийся олигонуклеотид содержит только одно положение, которое должно быть изменено. Альтернативно, варианты положения находятся слишком близко друг от друга, чтобы обеспечить использование этого и многих вариантов в нуклеотиде, чтобы обеспечить полную рекомбинацию всех возможностей (то есть, каждый олигонуклеотид может содержать кодон для одного мутируемого положения, или для более чем одного мутируемого положения). Множественные мутируемые положения являются предпочтительно близко расположенными в последовательности для предохранения олигонуклеотида стать непригодным для использования. Для множественных мутирующих положений на олигонуклеотиде конкретные комбинации могут быть включены в библиотеку или исключены путем включения или исключения олигонуклеотида, кодирующего такую комбинацию. Например, как обсуждают здесь, могут существовать корреляции между переменными участками; то есть в тех случаях, когда положение X означает конкретный остаток, положение Y должно (или не должно) быть конкретным остатком. Такие семейства переменных положений иногда называют "кластерами". Когда кластеры содержат остатки близко расположенные друг к другу и таким образом могут находиться на одном олигонуклеотидном праймере, кластеры могут быть семейством для "хороших" корреляций и элиминировать плохие комбинации, которые могут снижать эффективность библиотеки. Однако если остатки кластера находятся на большом расстоянии друг от друга в последовательности и соответственно будут находиться на разных олигонуклеотидах для синтеза, это может быть желательным или для семейства остатков для "хорошей" корреляции, или для их полного элиминирования как переменных

остатков. Альтернативно, библиотека может быть создана в несколько этапов, чтобы только мутации в кластере возникали вместе. Эта процедура, то есть процедура идентификации мутаций в кластере и или размещение их в тех же самых олигонуклеотидах, или элиминирование их из библиотеки, или создание библиотеки в несколько этапов, сохраняющих кластеры, может значительно обогатить библиотеку в отношении белков с правильной конформацией. Идентификация кластеров может быть выполнена рядом способом, например, с помощью известных методов узнавания образца, сравнений частоты возникновения мутаций или энергетическим анализом последовательностей, которые создают экспериментальным путем (например, при высокой энергии взаимодействия положения коррелированы). Такие корреляции могут быть позиционными корреляциями (например, переменные положения 1 и 2 всегда изменяются вместе или никогда не меняются вместе) или корреляциями последовательностей (например, при существовании остатка А в положении 1, всегда существует остаток В в положении 2). (Смотри, *Pattern Discovery in Biomolecular Data: Tools, Techniques, and Applications*; (Jason T. L. Wang, Bruce A. Shapiro, Dennis Shasha eds., New York, Oxford University, 1999); Andrews, *Introduction to Mathematical Techniques in Pattern Recognition* (New York, Wiley-Interscience, 1972); *Applications of Pattern Recognition* (K. S. Fu ed., Boca Raton, FL, CRC Press, 1982); *Genetic Algorithms for Pattern Recognition* (Sankar K. Pal and Paul P. Wang eds., Boca Raton, FL, CRC Press, 1996); Pandya, *Pattern Recognition with Neural Networks in C++* (Boca Raton, FL, CRC Press, 1996; *Handbook of Pattern Recognition & Computer Vision* (C. H. Chen, L. F. Pau, and P. S. P. Wang, eds., 2nd ed. Singapore; River Edge, N. J., World Scientific, 1999); Friedman, *Introduction to Pattern Recognition: Statistical, Structural, Neural, and Fuzzy Logic Approaches* (River Edge, NJ., World Scientific, 1999, Series title: *Series in machine perception and artificial intelligence*; vol. 32); все их которых специально включены в виде ссылки. Кроме того, программы, используемые для поиска консенсусных мотивов, также могут быть использованы.

[0077] Олигонуклеотиды с инсерциями или делециями кодонов могут быть использованы для создания библиотеки, экспрессирующей белки различной длины. В частности, компьютерный скрининг последовательности для поиска инсерций или делеций может дать в результате вторичные библиотеки, определяющие белки различной длины, которые могут быть экспрессированы библиотекой суммарных олигонуклеотидов различной длины.

[0078] В другом варианте воплощения изобретения, мутантные полипептиды СК1 изобретения создают перетасовкой семейства (например, набора мутантов); то есть, некоторый набор самых важных последовательностей (при использовании упорядоченного списка) может быть перетасован, или с помощью ошибочно-направленной ПЦР или без нее. "Перетасовка" в этом контексте означает рекомбинацию

родственных последовательностей, в основном случайным образом. Она может включать в себя "перетасовку" как определяют и представляют на примере в патентах США NN 5830721; 5811238; 5605793; 5837458 и PCT US/19256, все из которых приведены здесь в виде ссылки. Этот набор последовательностей также может быть искусственно созданным набором; например, из вероятностной таблицы (например, созданной с помощью SCMF) или метода Монте-Карло. Аналогично, "семейством" может быть верх из 10 и основание из 10 последовательностей, верх из 100 последовательностей и тому подобное. Набор также может быть создан с помощью ошибочно-направленной ПЦР.

[0079] Таким образом, перетасовка *in silico* может быть выполнена с помощью компьютерных методов, описанных здесь (например, начиная с двух библиотек или двух последовательностей, могут быть созданы и оценены случайные рекомбинации последовательностей).

[0080] Ошибочно-направленная ПЦР может быть осуществлена для создания библиотеки вариантных полипептидов SKI. Смотри, патенты США NN: 5605793, 5811238 и 5,830,721, которые внесены в текст в виде ссылки. Она может быть выполнена на оптимальной последовательности или на лучших элементах библиотеки, или на некотором другом искусственном наборе или семействе. В этом методе может быть синтезирован ген из оптимальной последовательности, найденной в ходе компьютерного скрининга первичной библиотеки. Затем ошибочно-направленную ПЦР осуществляют на оптимальной последовательности гена в присутствии олигонуклеотидов, которые кодируют мутации в различных положениях библиотеки (олигонуклеотиды искажения). Добавление олигонуклеотидов создаст ошибку, способствующую включению мутаций в библиотеку. Альтернативно только олигонуклеотиды для определенных мутаций могут быть использованы для искажения библиотеки.

[0081] Перетасовка генов может быть выполнена с помощью ошибочно-направленной ПЦР на гене для оптимальной последовательности в присутствии олигонуклеотидов искажения для создания библиотеки последовательностей ДНК, которая отражает относительное содержание мутаций, обнаруженных в библиотеке SKI. Выбор олигонуклеотидов искажения может быть сделан различными путями; они могут быть выбраны исходя из их повторяемости, например, могут быть использованы олигонуклеотиды, кодирующие широко распространенные мутационные положения; альтернативно, могут быть использованы олигонуклеотиды, содержащие наиболее переменные положения, при которых увеличивается многообразие; если вторичная библиотека является упорядоченной, то может быть использовано некоторое число верхних оценочных положений для создания олигонуклеотидов искажения; могут быть выбраны случайные положения; может быть выбрано несколько верхних оценочных и

несколько нижних оценочных положений и тому подобное. Важным, является создание новых последовательностей на основе предпочтительных переменных положений и последовательностей.

5

[0082] В другом варианте изобретения может быть применена ПЦР с использованием гена дикого типа или другого гена. В этом варианте воплощения используют исходный ген (например, ген дикого типа, ген, кодирующий глобальную оптимизированную последовательность, или консенсусную последовательность, полученную, например, из выравненных гомологичных последовательностей различных организмов). В этом варианте воплощения, используют олигонуклеотиды, которые соответствуют вариантным положениям и содержат различные аминокислоты библиотеки. ПЦР осуществляют с помощью праймеров для ПЦР на концах. Это приносит две пользы. Первая, это вообще требует меньшего количества олигонуклеотидов и может привести к меньшему числу ошибок. Вторая, это имеет экспериментальные преимущества в том, что при использовании гена дикого типа, он не должен быть синтезирован.

10

15

20

[0083] Мутантные полипептиды SKI могут быть из любого числа организмов, конкретно предпочитаемыми полипептидами SKI растений. Подходящие растения включают в себя, например, класс высших растений пригодных для методов трансформации, в том числе как однодольные, так и двудольные растения, а также определенные низшие растения, например, водоросли. Он включает в себя растения различных уровней пloidности, в том числе полиплоиды, диплоиды и гаплоиды. В специфических вариантах воплощения изобретения растение означает *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, кукурузу, рис, пшеницу, люцерну, хлопок, тополь и тому подобное.

25

30

[0084] Как описывают выше, мутантные полипептиды SKI изобретения являются доминантно-негативными антагонистами полипептидов SKI дикого типа. В конкретных вариантах воплощения, мутантный полипептид SKI физически взаимодействует только с одним из соответствующих ему или обоими, циклиновым белком или CDK-белком (то есть, с эндогенным, природным CDK-белком или циклиновым белком видов, из которых получали мутантный), так что комплекс CDK/циклин, содержащий мутантный SKI, защищается от киназного ингибирования CDK/циклина белком SKI дикого типа.

35

40

[0085] В альтернативном, не взаимно исключаемом варианте, мутантный полипептид SKI физически взаимодействует только с одним или обоими гетерологичными белками CDK или циклина (то есть, природный CDK или циклиновый белок видов, которые отличаются от видов, из которых получали мутантный SKI), так что комплекс гетерологичного CDK/циклина, содержащий мутантный SKI, защищается от киназного ингибирования

45

50

CDK/циклин белком SKI дикого типа, который соответствует белкам CDK и циклина в комплексе (то есть, белком SKI дикого типа эндогенным к белкам CDK и циклина).

5 [0086] В некоторых вариантах, мутантные полипептиды SKI изобретения являются высокоспецифичными антагонистами по отношению к соответствующему белку SKI дикого типа. В альтернативных вариантах, мутантные полипептиды SKI изобретения являются специфичными антагонистами для более чем одного полипептида SKI.
10 Например, мутантные полипептиды SKI *Arabidopsis* могут быть специфическими антагонистами только в отношении полипептида SKI дикого типа *Arabidopsis*, или специфическими для полипептидов SKI дикого типа *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Glycine max*, кукурузы, риса, хлопка и/или тополя. Также мутантный полипептид SKI *Brassica*
15 может быть специфическим антагонистом только в отношении полипептида SKI дикого типа *Brassica*, или являться специфическим антагонистом для дикого типа *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Glycine max*, кукурузы, риса, пшеницы, люцерны, хлопка и/или тополя.

20 [0087] Мутантные полипептиды SKI обнаруживают существенно сниженную биологическую активность по сравнению с полипептидами SKI дикого типа, в том числе, например, модифицированное связывание с одним из белков CDK или циклина и
25 пониженное ингибирование киназных комплексов CDK/циклин. Такая сниженная биологическая активность может быть протестирована и подтверждена с помощью анализов *in vivo* и/или *in vitro*. Подходящие анализы включают в себя, но не ограничиваются, анализы киназной активности CDK/циклин; анализы связывания CDK
30 или циклина и анализы клеточной пролиферации. Существенное снижение биологической активности по сравнению с полипептидами SKI дикого типа означает, что биологическая активность вариантного полипептида SKI составляет менее чем 80%, или
35 менее чем 70%, типично менее чем 60 %, или менее чем 50%, более типично, менее чем 40%, или менее чем 30% и предпочтительно менее 20%, или менее чем 10% активности соответствующего полипептида SKI дикого типа.

40 [0088] В некоторых вариантах мутантные полипептиды SKI включают в себя модификацию по сравнению с полипептидом SKI дикого типа в дополнение к модификациям, перечисленным в этом изобретении (то есть, мутантные белки SKI могут
45 содержать дополнительные модификации по сравнению с соответствующим белком дикого типа SKI помимо тех, использованных для создания доминантно-негативных белков). Примеры включают в себя, но не ограничиваются этим, аминокислотные замены,
50 введенные для обеспечения разрешимой экспрессии в *E. coli*, и аминокислотные замены, введенные для оптимизации свойства раствора. Кроме того, как указано здесь, любая из мутаций, показанных здесь, может быть скомбинирована любым путем для образования
дополнительных вариантных полипептидов SKI. Кроме того, могут быть сделаны

мутантные полипептиды SKI, которые являются более длинными, чем соответствующий белок дикого типа, например, путем присоединения эпитопа или метки для очистки, присоединения других слитых последовательностей и тому подобное, или мутантные белки могут быть более короткими.

[0089] Мутантные полипептиды SKI также могут быть идентифицированы в виде кодируемых мутантными нуклеиновыми кислотами SKI. В случае нуклеиновой кислоты, полная идентичность последовательности нуклеиновой кислоты является сопоставимой с идентичностью аминокислотной последовательности, но принимает во внимание вырожденность генетического кода и характерное для организма статистическое отклонение от равномерности в использовании кодонов различных организмов. Таким образом, идентичность аминокислотной последовательности может быть или ниже, или выше, чем идентичность белковой последовательности, с более низкой идентичностью последовательности, являющуюся типичной.

[0090] Как будет оценено специалистами в данной области, вследствие вырожденности генетического кода, может быть сделано чрезвычайно большое число нуклеиновых кислот, все из которых кодируют мутантные полипептиды SKI данного изобретения. Таким образом, идентифицировав конкретную аминокислотную последовательность, любое число различных нуклеиновых кислот, кодирующих мутантный белок, может быть изготовлено простой модификацией последовательности одного или нескольких кодонов, способом, который не меняет аминокислотную последовательность мутантного полипептида SKI.

[0091] Мутантные полипептиды SKI и нуклеиновые кислоты изобретения предпочтительно являются рекомбинантными (если не получены искусственно). Как отмечают *выше*, мутанты являются типично изготовленными путем сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей соответствующий белок SKI, с помощью касетного мутагенеза или мутагенеза с помощью ПЦР, или другим способом, хорошо известным в данной области для получения ДНК, кодирующей мутант, и затем экспрессии ДНК в рекомбинантной культуре клеток. Мутанты с измененными аминокислотными последовательностями отличаются предопределенной природой мутации, особенность, которая ставит их отдельно от естественных аллельных или межвидовых вариаций аминокислотной последовательности мутантного белка SKI. Как сказано выше, варианты типично демонстрируют аналогичное связывание или CDK, или циклинового белка (следовательно, по сравнению с соответствующим белком SKI дикого типа, мутант демонстрирует существенное снижение в его ингибирующей активности; хотя также могут быть отобраны варианты, которые обладают дополнительными иными характеристиками.

[0092] Когда сайт или область для введения вариантной аминокислотной последовательности устанавливаются заранее, то мутация *per se* (пер., как таковая) не должна быть предопределена. Например, для того, чтобы оптимизировать выполнение мутации в данном сайте может быть проведен случайный мутагенез в кодоне-мишени или области-мишени и проведен скрининг экспрессированных вариантных белков SKI на оптимальную комбинацию желаемой активности. Способы получения мутаций замещения в предопределенных сайтах ДНК, имеющих известную последовательность, являются хорошо известными, например, мутагенез с использованием пары праймеров и ПЦР-мутагенез на основе M13. Скрининг мутантов делают с помощью анализов активностей мутантного белка SKI на предмет нахождения оптимальных характеристик.

[0093] В некоторых вариантах воплощения, аминокислотные замены означают одиночные остатки. В других вариантах воплощения, множественные аминокислотные замены являются замещенными (например, могут быть замещены 2, 3, 4 или более аминокислот). Инсерции типично являются порядка около от 1 до приблизительно 20 аминокислот, хотя значительно большее количество может быть переносимым. Диапазон делеций от около 1 до приблизительно 20 остатков, или от приблизительно 1 до около 30 остатков, хотя в некоторых случаях делеций может быть намного большее число. В конкретных вариантах, мутантные полипептиды SKI являются химерами, произведенными из двух или нескольких белков SKI дикого типа с, по меньшей мере, одной модификацией CDK-связывающей области или циклин-связывающей области, как указывают здесь.

[0094] Замещения, делеции, инсерции или любую их комбинацию применяют для достижения конечного мутанта. В основном модификацию (модификации) выполняют по отношению немногим аминокислотам для минимизации изменения молекулы. Однако большее число изменений может быть переносимым при определенных обстоятельствах.

[0095] С помощью нуклеиновой кислоты изобретения, кодирующей мутантный полипептид SKI, может быть сделан ряд векторов. Любой вектор, содержащий репликон и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином, может быть использован в применении изобретения. Векторы могут быть или самореплицирующимися экстрахромосомными векторами, или векторами, которые интегрируют в геном хозяина. В целом, экспрессионные векторы включают в себя транскрипционную и трансляционную регуляторные области нуклеиновых кислот, функционально присоединенные к нуклеиновой кислоте, кодирующей мутантный полипептид SKI. Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально присоединенной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине.

Контрольные последовательности, которые являются подходящими для прокариотов, например, включают в себя промотор, избирательно операторную последовательность и участок связывания рибосомы. Транскрипционные и трансляционные регуляторные области нуклеиновых кислот в основном будут соответствовать клетке-хозяину, используемой для экспрессии полипептида.

[0096] В конкретных вариантах, нуклеиновые кислоты СК1 являются модифицированными для усиления экспрессии гена в клетке хозяина с помощью оптимизации кодона, которая заключается в замещении последовательности кодона трансляционным кодоном (соответствующему той же самой аминокислоте), который является сильно используемым в разновидностях клеток, в которых экспрессируется молекула ДНК. Примеры кодирующих последовательностей мутантного BnKrp1 (BnKrp1 F151A; F153A и Y149A; F151A; F153A), которые были оптимизированы для экспрессии в кукурузе показывают на фигуре 3. Процедуры оптимизации кодонов являются вообще хорошо известными в данной области и могут быть использованы специалистами в данной области для получения других последовательностей мутанта Krp1 с оптимизированным кодоном в соответствии с настоящим изобретением.

[0097] Многочисленные типы подходящих экспрессионных векторов и подходящих регуляторных последовательностей являются хорошо известными в данной области для множества клеток хозяина. Вообще, транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности могут включать в себя, например, промоторные последовательности, рибосомальные связывающие сайты, последовательности начала и остановки транскрипции, последовательности начала и остановки трансляции или энхансерные или активаторные последовательности. В типичных вариантах воплощения изобретения, регуляторные последовательности включают в себя промотор и последовательности начала и остановки транскрипции. Также векторы типично включают в себя полилинкерную область, содержащую несколько сайтов рестрикции для инсерции чужеродной ДНК. Конструкцию подходящих векторов, содержащих ДНК, кодирующую последовательности репликации, регуляторные последовательности, гены отбора по фенотипу и интересующую ДНК вариантного СК1, получают с помощью стандартных процедур рекомбинантной ДНК. Изолированные плазмиды, вирусные векторы и фрагменты ДНК расщепляют, сшивают и лигируют друг с другом в специальном порядке для создания желаемых векторов, как это хорошо известно в данной области (*смотри, например, Maniatis, выше, и Sambrook et al., выше*).

[0098] Промоторные последовательности кодируют или конститутивные или индуцибельные промоторы. Промоторы могут быть или природными промоторами, или гибридными промоторами. Гибридные промоторы, которые соединяют элементы более

чем одного промотора, также известны в данной области и являются пригодными в данном изобретении. В типичном варианте изобретения промоторы являются сильными промоторами, обеспечивающими высокую экспрессию в клетках, конкретно в растительных клетках. Промоторы, конкретно подходящие для применения в соответствии данным изобретением описывают ниже.

[0099] Кроме того, экспрессионный вектор может содержать дополнительные элементы. Например, экспрессионный вектор может иметь две системы репликации, таким образом, позволяя ему быть поддержанным в двух организмах, например, в растительных клетках или клетках насекомых для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации. Дополнительно, интегрирующие экспрессионные векторы, экспрессионный вектор содержит по меньшей мере, одну последовательность, гомологичную геному клетки-хозяина и предпочтительно две гомологичных последовательности, которые фланкируют экспрессионную конструкцию. Интегрирующий вектор может быть направлен в специфический локус в клетке хозяина путем селекции подходящей гомологичной последовательности для включения в вектор. Конструкции интегрирующих векторов хорошо известны в данной области.

[0100] В конкретных вариантах экспрессионный вектор содержит селектируемый маркерный ген для обеспечения селекции трансформированных клеток хозяина. Селективные гены являются хорошо известными в данной области и будут варьировать с используемой клеткой-хозяином. Подходящие селективные гены могут включать в себя, например, гены, кодирующие устойчивости к ампициллину и/или тетрациклину, которые дают возможность клеткам, трансформированным с помощью этих векторов, расти в присутствии этих антибиотиков.

[0101] В одном аспекте изобретения, нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантный СК1 вводят в клетку или одну, или в сочетании с вектором. С помощью "введенные в" или его грамматического эквивалентов здесь обозначают, что нуклеиновые кислоты вводят в клетки способом, подходящим для последующей интеграции, амплификации и/или экспрессии нуклеиновой кислоты. Способ введения в значительной степени диктуется типом клетки-мишени. Типичные методы включают в себя осаждение с помощью $CaPO_4$, слияние липосом, липофектин[®], электропорацию, инфицирование вирусом и тому подобное. Методы, конкретно подходящие для введения в растительные клетки хорошо известны в данной области и их также описывают ниже (смотри, Section II, "Transgenic Plants"). Такие методы включают в себя, например, бомбардировку клеток с помощью микрочастиц, нагруженных ДНК. Нуклеиновые кислоты, кодирующие мутантный СК1, могут устойчиво интегрировать в геном клетки-хозяина или могут существовать или кратковременно или стабильно в цитоплазме (например, с помощью использования

традиционных плазмид, использующих классические регуляторные последовательности, селективные маркеры и тому подобное).

5 [0102] Прокариоты могут быть использованы в качестве клеток-хозяина на начальных
этапах клонирования изобретения. Прокариоты являются конкретно пригодными для
быстрого получения больших количеств ДНК, для получения одноцепочечных ДНК-
матриц, служащих для сайт-направленного мутагенеза, для скрининга многих мутантов
10 одновременно и для секвенирования ДНК созданных мутантов. Подходящие
прокариотические клетки-хозяина включают в себя штамм 94 *E. coli* K12 (ATCC No.
31446), штамм *E. coli* W3110 (ATCC No. 27325), *E. coli* X1776 (ATCC No. 31537) и *E. coli* B;
однако другие штаммы *E. coli*, такие как HB101, JM101, NM522, NM538, NM539 и многие
15 другие штаммы и виды прокариот, в том числе палочковидные бактерии, например,
Bacillus subtilis, другие кишечные бактерии, например, *Salmonella typhimurium* или
Serratia marcesans и различные виды *Pseudomonas* все могут быть использованы в
качестве хозяина. Прокариотические клетки-хозяина или другие клетки-хозяина с
20 жесткими клеточными стенками типично трансформируют с помощью метода с
применением хлорида кальция как описывают в разделе 1.82 Sambrook *et al.*, *выше*.
Альтернативно, может быть использована электропорация для трансформации этих
клеток. Методы трансформации прокариот, изложены например, у Dower, в *Genetic*
Engineering, Principles and Methods 12:275-296 (Plenum Publishing Corp., 1990); Hanahan *et*
25 *al.*, *Meth. Enzymol.*, 204:63, 1991. Плазмиды, типично используемые для трансформации, *E.*
coli, включают в себя pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 и Bluescript M13, все из
которых описывают в разделах 1.12-1.20 of Sambrook *et al.*, *выше*. Однако, многие другие
30 подходящие векторы также могут быть использованы.

[0103] Мутантные полипептиды СК1 изобретения типично производят культивированием
35 клетки-хозяина, трансформированной с помощью экспрессионного вектора, содержащего
нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантный полипептид СК1, при условиях,
подходящих для индукции или осуществления экспрессии мутантного полипептида СК1.
Для модуляции клеточного деления СК1-белок экспрессируется в его нормальной
40 внутриклеточной форме. Для заявок данного изобретения, которые включают в себя сбор
клеток, выросших в культуре или выделение мутантного полипептида СК1, мутант СК1
может быть экспрессирован в виде внутриклеточного белка или альтернативно в форме,
которая секретируется из клетки-хозяина. Многие эукариотические белки, обычно
45 секретируемые из клетки, содержат эндогенную секреторную сигнальную
последовательность в виде части аминокислотной последовательности. Таким образом,
белки обычно обнаруживаемые в цитоплазме, могут быть направлены на секрецию путем
присоединения сигнальной последовательности к белку. Это является легко выполнимым
50 путем лигирования ДНК, кодирующей сигнальную последовательность, к 5'-концу ДНК,

5 кодирующей белок, и затем экспрессирующей этого слитого белка в подходящей клетке-хозяине. ДНК, кодирующая сигнальную последовательность может быть получена в виде рестрикционного фрагмента из любого гена, кодирующего белок с сигнальной последовательностью. Таким образом, прокариотические, дрожжевые и эукариотические сигнальные последовательности могут быть применены здесь в зависимости от типа клетки-хозяина применяемой в практике изобретения. Известны ДНК, кодирующая участок сигнальной последовательности, и аминокислотная последовательность нескольких эукариотических генов, в том числе, например, гормон роста человека, проинсулин и преальбумин (смотри, Stryer, *Biochemistry* (W.H. Freeman and Company, New York, NY, 1988, p.769)), и могут быть использованы в виде сигнальных последовательностей в подходящих эукариотических клетках-хозяина. Сигнальные последовательности дрожжей, например, кислая фосфатаза (Arima *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 11:1657, 1983), α -фактор, щелочная фосфатаза и инвертаза могут быть использованы для прямой секреции из дрожжевых клеток-хозяина. Прокариотические сигнальные последовательности генов, кодирующих, например, LamB или OmpF (Wong *et al.*, *Gene* 68:193, 1988), MalE, PhoA или бета-лактамазу, а также другие гены могут быть использованы для направления белков, экспрессированных в прокариотических клетках, в культуральную среду.

25 [0104] Условия, подходящие для экспрессии мутантного полипептида SKI, будут меняться с выбором экспрессионного вектора и клетки-хозяина и легко будут установлены любым специалистом в данной области путем рутинного эксперимента. Например, использование конститутивных промоторов в экспрессионном векторе потребует оптимизации роста и пролиферации клетки-хозяина, в то время как использование индуцибельного промотора требует подходящие условия роста для индукции. Кроме того, в некоторых вариантах изобретения важным является выбор времени сбора выросших клеток. Например, бакуловирусные системы, применяемые для экспрессии клеток насекомых, являются литическими вирусами и таким образом, выбор времени сбора выросших клеток может быть важным для выхода готового продукта.

45 [0105] Промоторы, наиболее часто используемые в прокариотических векторах, включают в себя промоторные системы р-лактамазы (пенициллиназы) и лактозы (Chang *et al.*, *Nature* 375:615, 1978; Itakura *et al.*, *Science* 198:056, 1977; Goeddel *et al.*, *Nature* 281:544, 1979) и промоторную систему триптофана (*trp*) (Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; EPO Appl. Publ. No. 36,776) и системы щелочной фосфатазы. Несмотря на то, что эти промоторы используются чаще всего, были использованы другие промоторы микроорганизмов и были опубликованы детали относительно их нуклеотидных последовательностей, давая возможность квалифицированному специалисту их

функционально лигировать в плазмидные векторы (смотри, Siebenlist *et al.*, *Cell* 20:269, 1980).

5 [0106] Иллюстративный пример системы чувствительного промотора, который может
быть применен в практическом применении изобретения является системой глутатион-
S-трансферазы (GST) кукурузы. GSTs представляет семейство ферментов, которое
10 может детоксифицировать ряд гидрофобных электрофильных соединений, которые
часто используют в виде довсходовых гербицидов (Weigand *et al.*, *Plant Molecular Biology*
7:235- 243, 1986). Исследования показали, что GSTs напрямую вовлечены в порождение
этой повышенной устойчивости к гербицидам. Это действие первоначально
15 опосредуется через специфический продукт транскрипции мРНК 1,1 т.п.н. Вкратце, у
кукурузы уже обнаружен природный молчащий ген, который может отзываться на
внешние стимулы, и который может быть индуцирован для получения генного продукта.
Этот ген ранее был идентифицирован и клонирован. Таким образом, в одном варианте
20 данного изобретения, промотор удаляют из GST-чувствительно гена и присоединяют к
последовательности, кодирующей мутантный SKI. При получении мутантного гена SKI из
источника геномной ДНК существует необходимость удаления нативного промотора в ходе
конструирования химерного гена. Данный генно-инженерный ген является комбинацией
25 промотора, который реагирует на внешние химические стимулы, и гена, ответственного
за успешную наработку мутантного белка SKI.

[0107] Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который обеспечивает
30 прямо или косвенно активацию транскрипции одной или нескольких
последовательностей ДНК или генов в ответ на индуктор. В отсутствие индуктора ДНК-
последовательности или гены не будут транскрибироваться. Типично белковый фактор,
который связывается специфически с индуцибельным промотором для активации
35 транскрипции, находится в неактивной форме, которая затем прямо или косвенно под
влиянием индуктора переходит в активную форму. Индуктор может быть химическим
агентом, таким как белок, метаболит, регулятор роста, гербицид или фенольное
соединение или физиологический стресс, непосредственно приложенный путем
40 нагревания, холодом, засолением или токсическими элементами, или косвенно
посредством действия патогенного или болезнетворного агента, такого как вирус.
Растительная клетка, содержащая индуцибельный промотор, может быть подвергнута
45 действию индуктора путем внешнего нанесения индуктора на клетку или растение,
например, опрыскиванием, поливом, нагревом или похожими способами. При
существовании необходимости активации экспрессии гена-мишени к конкретному
периоду во время развития растения, индуктор таким же образом может быть применен в
50 тоже время.

[0108] Примеры таких индуцибельных промоторов включают в себя промоторы теплового шока, например, индуцибельный промотор белка теплового шока 70 кДа *Drosophila melanogaster* (Freeling *et al.*, *Ann. Rev. of Genetics* 19:297-323); холодовой индуцибельный промотор, например, холодовой индуцибельный промотор *B. napus* (White *et al.*, *Plant Physiol.* 106, 1994); и промотор алкогольдегидрогеназы, который индуцируется этанолом (Nagao *et al.*, *Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* Vol. 3, p 384-438 (B.J. Mifflin ed., Oxford University Press, Oxford, 1986).

[0109] Конститутивный промотор означает промотор, который обеспечивает прямо или косвенно активацию транскрипции одной или нескольких ДНК-последовательностей или генов во всех тканях трансгенного растения. Типично используют конститутивный промотор такой как 35S промотор CaMC (Odell, *Nature* 313:810-812, 1985). Другие примеры конститутивных промоторов, используемых в растениях, включают в себя актиновый промотор риса (Elroy *et al.*, *Plant Cell* 2:163-171, 1990), гистона HE кукурузы (Lepetit *et al.*, *Mol Gen. Genet.* 231:276-285, 1992) и тому подобное.

[0110] Трансгены СК1 изобретения могут быть экспрессированы с помощью промотора, такого как промотор BCEA (*B. campestris* embryo), который, было показано, приводит к высоким уровням экспрессии на очень ранних стадиях развития семени (то есть транскрибируется раньше напинавого промотора). Этот период является периодом до накопления запасных веществ, но периодом быстрого биосинтеза пигментов в семенах *Brassica* (получено от Johnson-Flanagan *et al.*, *J. Plant Physiol.* 136:180, 1989; Johnson-Flanagan *et al.*, *Physiol. Plant* 81:301, 1991). Также было показано, что промоторы запасных белков семян приводят к высокому уровню экспрессии в семя-специфичной манере (Voelker *et al.*, *Plant Cell* 1:95, 1989; Altenbach *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 13:513, 1989; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6181, 1991; Russell *et al.*, *Transgenic Res.* 6:157-68, 1997). Было показано, что напинавый промотор направляет экспрессию олеозинового гена в трансгенной *Brassica*, так, что олеозин накапливается приблизительно до 1 % общего белка семени (Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6181, 1991). При выборе промотора желательным может быть применение тканеспецифического промотора или промотора, регуляции которого связана с развитием, что обеспечит супрессию или сверхэкспрессию в конкретных тканях, не затрагивая экспрессию в других тканях. "Тканеспецифические промоторы" относятся к кодирующим областям, которые направляют экспрессию гена в первую очередь в специфических тканях, таких как корни, листья, стебли, пестики, пыльники, цветочные лепестки, семенная оболочка, семенной нуцеллус или эпидермальные слои. Стимуляторы транскрипции, энхансеры или активаторы, могут быть интегрированы в тканеспецифические промоторы для создания промотора с высоким уровнем активности, который поддерживает тканеспецифичность. Например, промоторы используемые при сверхэкспрессии предпочтительно будут тканеспецифическими.

Сверхэкспрессия в несоответствующей ткани, такой как листья, при попытке получить сверхэкспрессию в запасающей области семени, могла быть губительной. Конкретно подходящими промоторами являются промоторы, которые обеспечивают, например, семяспецифическую, корнеспецифическую, листоспецифическую, плодоспецифическую экспрессию и тому подобное. Это может быть особенно полезным, поскольку семена, корни, листья и плод представляют конкретный интерес. Некоторые промоторы, специфические для различных типов тканей уже являются доступными или могут быть выделены традиционными способами (смотри, например, патенты США NN: 5792925; 5783393; 5859336; 5866793; 5898096 и 5929302) и как описывают ниже. Таблица 1 перечисляет другие эмбрио-специфические промоторы, которые могут быть применены в практическом воплощении изобретения.

Таблица 1. Эмбрио-специфические промоторы

| Промотор | Эмбрион | Эндосперм | Распределение по времени | Ссылка |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Олеозинный из <i>Arabidopsis</i> | Сильный, однородный | нет | Следовые количества в сердцевине, более высокие от ранней до поздней стадии семядолей | <i>Al et al., Plant Mol. Biol.</i> 25:193-205, 1994 |
| USP <i>Vicia faba</i> | Сильный, однородный | нет | На ранней стадии не известен, сильный на поздней стадии семядолей | <i>Baumlein et al., Mol. Gen. Genet.</i> 225:459-467, 1991 |
| Легуминозный <i>Vicia faba</i> | Сильный, предпочтительно в семядолях | Алейроновый слой (поздний) | На ранней стадии не известен, сильный на поздней стадии семядолей | <i>Baumlein et al., выше,</i> 1991 |
| Напиновый <i>Brassica</i> | | ? | Поздний | <i>Kohn-Murase, Plant. Mol. Biol.</i> 26:1115-1124, 1994 |
| Альбуминовый S1 <i>Arabidopsis</i> | Только в стебле | нет | От ранней до поздней стадии семядолей | <i>Guerche et al., Plant Cell</i> 2:469-478, |

| | | | | |
|-----------------|----------------------|-----|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| | | | | 1990 |
| Альбуминовый S2 | В стебле и семядолях | нет | От ранней до поздней стадии семядолей | Guerche <i>et al.</i> , <i>выше</i> , 1990 |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

[0111] В конкретных вариантах изобретения представляет интерес семя-специфический промотор, который является конкретно активным во время развития эмбрионального растения незрелого семени. Экспрессия доминантно-негативного мутанта изобретения на ранней стадии развития семени может быть желательной для усиления клеточных делений на ранней стадии развития семян. Дополнительные клеточные деления на этой стадии могут приводить к более крупным зародышам. Состав зародыша приблизительно на 33% состоит из масла, следовательно, более крупный зародыш приведет к увеличению содержания масла. Промотор изобретения, подходящий для экспрессии в зародыше и с низкой экспрессией или неэкспрессирующийся в других растительных тканях представляет интерес для увеличения содержания масла в семенах. Особенно интересными являются такие промоторные последовательности, которые инициируют экспрессию на начальной стадии фазоспецифического развития зародыша. Ранний фазоспецифический промотор представляет собой промотор, который инициирует экспрессию белка до 7 дня после опыления (побег) у *Arabidopsis* или на равноценной стадии у других видов растений. Примеры особенно интересных промоторных последовательностей включают в себя промотор гена пермеазы аминокислот (AAP1) (например, промотор AAP1 *Arabidopsis thaliana*), промотор гена олеат 12-гидроксилазы:десатуразы (например, промотор, обозначенный LFAH12 *Lesquerella fendler*), промотор гена альбумина 2S2 (например, промотор 2S2 *Arabidopsis thaliana*), промотор гена элонгазы жирных кислот (FAE1) (например, промотор FAE1 *Arabidopsis thaliana*), и промотор гена семядолей листовенных (LEC2) (например, промотор LEC2 *Arabidopsis thaliana*). Промоторы AAP1, LFAH12, 2S2 и FAE1 являются неактивными на самых ранних стадиях развития зародыша. Они становятся транскрипционно-активными на все более поздних стадиях развития, начиная с AAP1, за которым следуют LFAH12, 2S2 и затем FAE. Затем все четыре промотора сохраняют активность на протяжении поздних стадий развития зародыша. Промотор LEC2 имеет противоположный профиль экспрессии. Он является активным на очень ранней стадии развития зародыша и затем его активность постепенно падает на протяжении поздних стадий. Другие, представляющие интерес, эмбрио-специфические промоторы включают в себя промоторы следующих генов: Seedstick (Pinvopich *et al.*, *Nature* 424:85-88, 2003), Fbp7 и Fbp11 (Seedstick петунии) (Colombo *et al.*, *Plant Cell*. 9:703-715, 1997), Banyuls (Devic, *Plant J.*, 19:387-398, 1999), ABI3 (Ng *et al.*, *Plant. Mol. Biol.* 54:25-38, 2004), agl-15, Agl18 (Lehti-

Shiu *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 58:89-107, 2005), Phe1 (Kohler, *Genes Develop.* 17:1540-1553, 2003), emb175 (Cushing *et al.*, *Planta.* 221:424-436, 2005), L11 (Kwong *et al.*, *Plant Cell* 15:5-18, 2003), Lec1 (Lotan, *Cell* 93:1195-1205, 1998), Fusca3 (Kroj *et al.*, *Development* 130:6065-6073, 2003), TT12 (Debeaujon *et al.*, *Plant Cell* 13:853-871, 2001), TT16 (Nesi *et al.*, *Plant Cell* 14:2463-2479, 2002), A-RZf (Zou and Taylor, *Gene* 196:291-295, 1997), TTG1 (Walker *et al.*, *Plant Cell* 11:1337-1350, 1999), TT1 (Sagasser *et al.*, *Genes Dev.* 16:138-149, 2002), TT8 (Nesi *et al.*, *Plant Cell* 12:1863-1878, 2000) и Gea-8 (морковь) (Lin *et al.*, *J. Exp. Botany* 50:1139-1147, 1999) промоторы. Эмбрио-специфические промоторы однодольных включают в себя промоторы Globulin, Knox (рис) (Postma-Haarsma, *Plant Mol Biol* 39:257-271, 1999), Oleosin (Plant, *Plant Mol Biol.* 25:193-205, 1994), Keddie, *Plant Mol Biol.* 24:327-340, 1994), Peroxiredoxin (Per1) (Haslekas *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 36:833-845, 1998), Haslekas *et al.*, *Plant Mol Biol.* 53:313-326, 2003), HvGAMYB (Diaz *et al.*, *Plant J.* 29:453-464, 2002) и SAD1 (Isabel-LaMoneda *et al.*, *Plant J.* 33:329-340, 1999) ячменя и промотор богатого пролином белка гибрида кукурузы (Jose-Estanyol *et al.*, *Plant Cell* 4:413-423, 1992; Jose-Estanyol *et al.*, *Gene* 356:146-152, 2005).

[0112] Промоторы запасных белков семян также представляют конкретный интерес, поскольку запасные белки семян во многих растениях могут представлять вплоть до 90% общего запасного белка. Запасные белки семян являются строго регулируемые, экспрессируясь почти исключительно в семенах в высоко тканеспецифической и стадийспецифической манере (Higgins *et al.*, *Ann. Rev. Plant Physiol* 35:191-221, 1984; Goldberg *et al.*, *Cell* 56:149-160, 1989). Кроме того, различные запасные белки семян могут быть экспрессированы на разных стадиях развития семени. Экспрессия семяспецифических генов была детально изучена (смотри, обзоры Goldberg *et al.*, *выше*, и Higgins *et al.*, *выше*). Примеры семяспецифических промоторов включают в себя LFAH12 *Arabidopsis* и других растений и 5' регуляторные области гена олеозина *Arabidopsis*, как описывают в патент США N 5977436 Thomas *et al.* (включенной сюда полностью в виде ссылки), которые при присоединении функционально или к кодирующей последовательности гетерологичного гена или к последовательности, комплементарной природному растительному гену, направляет экспрессию гетерологичного гена или комплементарной последовательности в семени растения.

[0113] Подходящие промоторы запасных белков семян двудольных растений включают в себя, например, промоторы β -фазеолина бобовых, лектина и фитогемагглютинаина (Sengupta-Gopalan, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3320-3324, 1985; Hoffman *et al.*, *Plant Mol Biol.* 11 :717-729, 1988; Voelker *et al.*, *EMBO J.* 6:3571-3577, 1987); рапсовый напировый промотор (канола) (Radke *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 75:685-694, 1988); промоторы глицинина и конглицинина соевых бобов (Chen *et al.*, *EMBO J.* 7:297-302, 1988; Nielson *et al.*, *Plant Cell* 1:313-328, 1989, Harada *et al.*, *Plant Cell* 1:415-425, 1989; Beachy *et*

al., *EMBO J.* 4:3047- 3053, 1985); лектиновый промотор соевых бобов (Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8240-8244, 1986); промотор ингибитора трипсина Кунитца соевых бобов (Perez-Grau *et al.*, *Plant Cell* 1:1095- 1109, 1989; Jofuku *et al.*, *Plant Cell* 1:1079-1093, 1989); промотор пататина картофеля (Rocha-Sosa *et al.*, *EMBO J.* 8:23-29, 1989); промоторы конвицилина, вицилина и легумина гороха (Rerie *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 259:148-157, 1991; Newbiggin *et al.*, *Planta* 180:461-470, 1990; Higgins *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 11:683-695, 1988; Shirsat *et al.*, *Mol. Gen. Genetics* 215:326- 331, 1989) и промотор спорамин батата (Hattori *et al.*, *Plant Mol. Biol* 14:595-604, 1990).

[0114] Для однодольных растений промоторы запасных белков семян полезные для практического применения изобретения включают в себя, например, зеиновые промоторы кукурузы (Scherthauer *et al.*, *EMBO J.* 7:1249-1255, 1988; Hoffman *et al.*, *EMBO J.* 6:3213-3221, 1987 (зеина кукурузы с молекулярной массой 15 кДа)); промотор 18 кДа олеозина кукурузы (Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6181-6185, 1991); промотор *shrunken-1*; промотор глобулина 1; промотор *shrunken-2*; глютеиновый промотор риса; гордеиновый промотор ячменя (Marris *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 10:359-366, 1988); промоторы RP5 (Su *et al.*, *J. Plant Physiol.* 158:247-254, 2001); EBE1 и 2 кукурузы (Magnard *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 53:821-836, 2003) и промоторы глутенина и глиаина (патент США N 5650558; Colot *et al.*, *EMBO J.* 6:3559-3564, 1987).

[0115] Также подходящими для практического применения изобретения являются промоторы генов изоцитратлиазы и малатсинтазы *B.napus* (Comai *et al.*, *Plant Cell* 1:293-300, 1989); дельта-9 десатуразы сафлоры (Thompson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2578-2582, 1991) и клещевины (Shanklin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2510-2514, 1991); ацил белка-носителя (ACP) *Arabidopsis* (Post-Beittenmiller *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:1777, 1989), *B. napus* (Safford *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 174:287-295, 1988) и *B. campestris* (Rose *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15:7197, 1987); β -кетоацил-ACP-синтазы ячменя (Siggaard-Andersen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4114-4118, 1991) и олеозина кукурузы (Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6181-6185, 1991), соевых бобов (Genbank Accession No. X60773) и *B. napus* (Lee *et al.*, *Plant Physiol.* 96:1395-1397, 1991).

[0116] Другие промоторы, подходящие для практического применения изобретения являются известными специалистам в данной области. Кроме того, известные методы могут быть использованы для выделения дополнительных промоторов, подходящих для применения в соответствии с данным изобретением. Например, различные методы скрининга могут быть использованы для выделения промоторов, экспрессированных в определенные (связанные с развитием) периоды времени, например, во время развития плода.

[0117] Промоторы семя-специфических генов, функционально присоединенные к гетерологичным кодирующим последовательностям в конструкциях химерных генов, также поддерживают пространственно-временную картину их экспрессии в трансгенных растениях. Такие примеры включают в себя использование промотора гена 2S-запасного белка семян *Arabidopsis thaliana* для экспрессии пептидов энкефалинов в семенах *Arabidopsis* и *B. napus* (Vandekerckhove *et al.*, *Bio/Technology* 7:929-932, 1989), промоторы лектинов бобов и β -фазеолина бобов для экспрессии люциферазы (Riggs *et al.*, *Plant Sci.* 63:47-57, 1989) и глютеиновые промоторы пшеницы для экспрессии хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Colot *et al.*, *выше*).

[0118] Достижение должного уровня экспрессии фрагментов нуклеиновых кислот изобретения может потребовать использования различных химерных генов, использующих различные промоторы. Такие химерные гены могут быть внедрены в растения-хозяева или вместе в одном экспрессионном векторе или последовательно с помощью более чем одного вектора.

[0119] Кроме того, энхансеры часто являются необходимыми или полезными для усиления экспрессии гена изобретения. Необходимо, чтобы эти элементы были функционально присоединенными к последовательности, которая кодирует нужные белки, и чтобы регуляторные элементы являлись функционирующими. Энхансеры или энхансероподобные элементы могут быть или нативными, или химерными фрагментами нуклеиновых кислот. Они включили бы вирусные энхансеры, такие как обнаруженные в 35S-промоторе (Odell *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 10:263-272, 1988), энхансеры генов опинов (Fromm *et al.*, *Plant Cell* 1:977-984, 1989) или энхансеры из других источников, которые приводят к усиленной транскрипции при расположении под промотор, функционально присоединенного к фрагменту нуклеиновой кислоты изобретения. Например, конструкция может включать в себя 35S-промотор CaMV с двойным транскрипционным энхансером, присоединенным к 5'-нетранслируемой лидерной последовательности вируса гравировки табака (TEV). Лидерная последовательность TEV действует в качестве транскрипционного энхансера для повышения количества произведенного белка.

[0120] Подходящие промоторные элементы, такие как промоторные элементы описанные здесь, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими мутантный SKI и подходящим терминатором (участком полиаденилирования) в соответствии с общепризнанной процедурой.

Трансгенные растения

[0121] В другом аспекте изобретения предоставляют трансгенные растения, содержащие мутантный трансген SKI. Трансгенные растения, экспрессирующие мутантный полипептид SKI, могут быть получены, например, путем переноса трансгенного вектора (например, плазмидного или вирусного вектора), кодирующего мутантный полипептид, в растение. Типично, если вектор является плазмидой, вектор также включает в себя селективируемый маркерный ген, например, ген неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*), кодирующий устойчивость к канамицину. Наиболее известный метод трансформации растений выполняют клонированием трансгена-мишени в вектор для трансформации растений, который затем трансформируют в *Agrobacterium tumefaciens*, содержащую Ti-плазмиду-помощник, как описывают Ноекена *et al.* (*Nature* 303:179-181, 1983). Клетки *Agrobacterium*, содержащие трансгенный вектор, инкубируют с листовыми дисками растения, которое должно быть трансформировано как описывают Ап *et al.* (*Plant Physiology* 81:301-305, 1986). (Смотри также, Ноукаас, *Plant Mol. Biol.* 13:327-336, 1989). Трансформацию культивируемых клеток-хозяина растений обычно выполняют посредством *Agrobacterium tumefaciens*, как описывают выше. Культуры клеток-хозяина, у которых нет жестких барьеров клеточных мембран, обычно трансформируют с помощью кальций-фосфатного метода, в виде первоначально описанного Грахам *et al.*, (*Virology* 52:546, 1978) и модифицированного как описывают в разделах 16.32-16.37 Самбрук *et al.*, выше. Однако также могут быть использованы другие методы введения ДНК в клетки, например, с полибренном (Кавай *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:1172, 1984), слияния протопластов (Шэфмер, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163, 1980), электропорации (Неуманн *et al.*, 1982 *EMBO J.* 1:841, 1982) и прямое микроинъектирование в ядро (Саресчи, *Cell* 22:479, 1980). Трансформированные каллюсы растений могут быть отобраны с помощью селективируемого маркера ростом клеток на среде, содержащей, например, канамицин и подходящие количества фитогормона, например, нафтилуксусной кислоты и бензиладенина для индукции каллуса и побегов. Затем клетки растений могут быть регенерированы и полученные растения перенесены в почву с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области.

[0122] В дополнение к методам, описанным выше, существует большое число методов, известных в данной области, для переноса клонированной ДНК внутрь большого числа видов растений, в том числе голосемянных, покрытосемянных, однодольных и двудольных (смотри, например, *Methods in Plant Molecular Biology* (Glick and Thompson eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1993); Васил, *Plant Mol. Biol.* 25:925-937, 1994 и Комари *et al.*, *Current Opinions Plant Biol.* 1:161-165, 1998 (полные обзоры); Loopstra *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15:1-9, 1990 и Brasileiro *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 17:441-452, 1991 (трансформация деревьев); Eimert *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 19:485-490, 1992 (трансформация *Brassica*); Hiei *et al.*, *Plant J.* 6:271-282, 1994; Hiei *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 35:205-218, 1997; Chan *et al.*, *Plant*

Mol. Biol. 22:491-506, 1993; патенты США NN 5516668 и 5824857 (трансформация риса) и патенты США NN: 5955362 (трансформация пшеницы); 5969213 (трансформация однодольных); 5780798 (трансформация кукурузы); 5959179 и 5914451 (трансформация сои). Типичные примеры включают в себя облегченное введение ДНК в протопласты электропорацией (Rhodes *et al.*, *Science* 240:204-207, 1988; Bates, *Methods Mol. Biol.* 111:359-366, 1999; D'Halluin *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 111:367-373, 1999; патент США N 5,914,451); обработка протопластов с помощью полиэтиленгликоля (Lyznik *et al.*, *Plant Molecular Biology* 13:151-161, 1989; Datta *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 111 :335-334, 1999) и бомбардировка клеток микрочастицами, нагруженными ДНК, (Klein *et al.*, *Plant Physiol.* 91:440-444, 1989; Boynton *et al.*, *Science* 240:1534-1538, 1988; Register *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 25:951-961, 1994; Barcelo *et al.*, *Plant J.* 5:583-592, 1994; Vasil *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 111:349-358, 1999; Christou, *Plant Mol. Biol.* 35:197-203, 1997; Finer *et al.*, *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 240:59-80, 1999). Дополнительно, принципы трансформации растений и методы рассматривают у Birch, *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48:297, 1997; Forester *et al.*, *Exp. Agric.* 33:15-33, 1997. Незначительные изменения делают эти методы применимыми для широкого диапазона видов растений.

[0123] В случае трансформации однодольных бомбардировка частицами типично является предпочтительным выбором. Однако однодольные, например кукуруза, также могут быть трансформированы с помощью методов трансформации для *Agrobacterium*, как описывают в патенте США N 5591616 Hiei *et al.* В другом методе осуществления трансформации у однодольных, например, кукурузы, клетки эмбрионной суспензионной культуры смешивают с суспензией волокон (5% мас./об., вискеры Silar SC-9) и плазмидной ДНК (1 мкг/мкл), и которую затем помещают или вертикально в многоячейковый диск на встряхивателе (вихревой мешалке) Vortex Genie II vortex mixer (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA), или горизонтально в держателе миксера Mixomat dental amalgam mixer (Degussa Canada Ltd., Burlington, Ontario, Canada). Затем трансформацию выполняют при перемешивании на максимальной скорости в течение 60 секунд (например, с помощью встряхивателя (вихревой мешалки) Vortex Genie II), или встряхивании (перемешивании) при фиксированной скорости в течение 1 секунды (Mixomat). Этот процесс приводит к образованию популяций клеток, из которых могут быть отобраны стабильные трансформанты. Растения регенерируют из стабильно трансформированных каллусов и эти растения и их потомство являются трансгенными, что может быть показано методом Саузерн-гибридизации. Принципиальными преимуществами данного подхода являются его простота и низкая стоимость. В отличие от бомбардировки частицами, не требуется дорогостоящего оборудования и материалов. Применение вискеров для трансформации растительных клеток, конкретно кукурузы, описывают, например, в патенте США N 5464765, Coffee *et al.*

[0124] Патент США N 5968830, Dan *et al.*, описывает методы трансформации и регенерации сои. Патент США N 5969215 Hall *et al.* описывает методы трансформации по получению трансформированных растений *Beta vulgaris*, например, сахарной свеклы.

5

[0125] Каждый из перечисленных выше методов трансформации имеет преимущества и недостатки. В каждом из методов плазмидную ДНК создают методами генетической инженерии так, что она содержит не только гена интереса, но также селектируемые маркерные гены и маркерные гены для скрининга. Селектируемый маркерный ген используют для селекции только тех клеток, которые содержат интегрированные копии плазмиды (конструкция, является такой, в которой ген интереса и селектируемый ген и ген для скрининга переносят в виде единицы). Ген для скрининга обеспечивает другой контроль на успешное культивирование только тех клеток, которые несут гены интереса.

10

15

[0126] Традиционная трансформация *Agrobacterium* с помощью селективных маркеров устойчивости к антибиотикам является проблематичной ввиду публичной оппозиции, из-за того, что растения представляют собой чрезмерный риск расширения толерантности к действию антибиотиков для животных и людей. Такие антибиотические маркеры могут быть элиминированы из растений трансформацией растений с помощью методов с *Agrobacterium*, аналогичных методам, описанным в патенте США N 5731179 Komari *et al.* Проблем с устойчивостью к антибиотикам также можно эффективно избежать путем использования кодирующих последовательностей *bar* или *pat*, таких как описывают в патенте США N 5712135. Такие предпочтительные ДНК-маркеры кодируют дополнительные белки или полипептиды, ингибирующие или нейтрализующие действие глутаминсинтетазы ингибитора гербицидов фосфинотрицина (глюфосинат) и соли глюфосината аммония (Basta, Ignite).

20

25

30

35

[0127] Плазмиду, содержащую один или несколько этих генов, вводят или в протопласты растений, или в каллусные клетки любым из выше указанных методов. Если маркерный ген является селектируемым геном, то только такие клетки, которые имеют встроенный ДНК-комплекс, сохраняются в процессе селекции с подходящим фитотоксичным агентом. После того как подходящие клетки идентифицируют и размножат, регенерируют растения. Потомство от трансформированных растений должно быть протестировано для уверенности в том, что ДНК-комплекс был успешно интегрирован в геном растения.

40

45

[0128] Существует ряд факторов, которые оказывают влияние на успех трансформации. Проектирование и конструирование экзогенной генной конструкции и ее регуляторных элементов оказывает влияние на интегрирование экзогенной последовательности в хромосомную ДНК растительного ядра и на способность трансгена экспрессироваться клеткой. Подходящий метод введения экзогенной генной конструкции в клеточное ядро

50

растений образом, не оказывающим губительного воздействия, является необходимым. Важно, что тип клетки, внутрь которой вводят конструкцию, в случае регенерации целых растений, должен быть типом, который поддается регенерации, определенной подходящим протоколом регенерации.

Способы применения

[0129] В соответствии с другим аспектом изобретения модулируют клеточное деление в растительной клетке, например, стимулируют. Растительные клетки, поддающиеся модуляции, например, стимуляции клеточного деления с помощью описанных здесь методов, представляют растительные клетки, которые экспрессируют полипептид SKI дикого типа, имеющий изолированные области связывания циклина и CDK. В целом, способы включают в себя экспрессирование в растительной клетке мутантного полипептида SKI, как описывают здесь, и давая возможность мутантному полипептиду SKI ингибировать биологическую активность SKI дикого типа в растительной клетке. Мутантный полипептид SKI экспрессируется из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный белок. Кроме того, в конкретных вариантах изобретения способ дополнительно включает в себя введение в растительную клетку рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид SKI. Рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие мутантные полипептиды SKI, в том числе конструирование таких рекомбинантных молекул и их введение в растительные клетки, описывают в целом *выше*, и дополнительно представляют в примерах, *ниже*. Модуляция клеточного деления может быть выполнена на растительной клетке также *in vivo*, например, как описывают *выше* относительно трансгенных растений. Альтернативно, метод может быть выполнен на растительной клетке *in vitro*.

[0130] Как описывают *выше*, мутантный полипептид SKI включает в себя аминокислотную последовательность SKI, имеющую, по меньшей мере, одну модификацию относительно ссылочного полипептида SKI. Что касается способа модуляции клеточного деления, то ссылочный полипептид SKI может быть или растительным полипептидом SKI дикого типа, экспрессированным в растительной клетке, в которой должна выполняться модуляция клеточного деления (типично эндогенный SKI дикого типа). Альтернативно, поскольку применение мутантного белка SKI, как описывают здесь, может обеспечивать доминантно-негативную антагонистическую активность в отношении структурных гомологов или членов семейства SKI дикого типа, из которого получают мутант, ссылочный полипептид SKI может быть полипептидом SKI дикого типа, гетерологичным полипептиду SKI дикого типа, экспрессированным с помощью растительной клетки, и который способен обеспечить существенно эквивалентную функцию дикого типа. Таким образом, в некоторых случаях

мутантный белок SKI, полученный не из эндогенного белка SKI, экспрессируется в растительной клетке для ингибирования эндогенной функции SKI дикого типа (например, мутантный полипептид SKI, полученный из KRP-белка дикого типа *Arabidopsis thaliana* может быть использован для ингибирования функции KRP дикого типа в негетерологичных растительных клетках, таких как, *Brassica napus*, *Glycine max*, клетки кукурузы и тому подобное). Другие гетерологичные мутантные полипептиды SKI, полученные из других растений, например, *Brassica napus* и тому подобное, также могут быть использованы.

[0131] Кроме того, в конкретных вариантах способа, большое количество родственных SKIs одновременно ингибируется в растительной клетке с использованием SKI- мутанта изобретения. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения все эндогенные SKIs в рамках семейства (например, члены семейства KRP) ингибируются одновременно. Как отмечалось выше, мутантный SKI белок, в виде описанного выше, обеспечивает доминантно-негативную антагонистическую активность в рамках структурных гомологов или членов семейства SKI дикого типа, из которого получают вариант, таким образом предусматривая такое одновременное ингибирование множественных гомологов или членов семейства. Таким образом, в типичных вариантах изобретения, большинство (и предпочтительно все) SKIs, имеющие существенную идентичность последовательности или сходство в целевой CDK или циклин связывающей области, ингибируются в растительной клетке. Например, в конкретных вариантах, поскольку члены семейства KRP имеют общую существенную идентичность последовательности в рамках CDK-связывающей области, которая, прежде всего, является ответственной за ингибирование киназной активности циклин-CDK, абсолютное большинство, а предпочтительно все, эндогенные члены семейства KRP внутри растительной клетки ингибируются посредством экспрессии мутантного SKI KRP для модуляции клеточного деления.

[0132] Как описывают выше, путем эффективного блокирования эндогенных SKI-белков в результате ингибирования активности циклин/CDK, модулируют клеточное деление в рамках растительной клетки. Такая модуляция включает в себя ускорение прохождения через клеточный цикл и, в конечном счете, усиленную пролиферацию клеток. Таким образом, с применением способов *in vivo* (например, трансгенные растения, смотри выше), изложенных здесь, может быть достигнуто повышение урожайности и/или увеличение размера зерна, повышенная мощность растения, увеличенная масса корней, повышенный размер плода и тому подобное.

[0133] Повышенная урожайность может обнаруживаться в различных формах в зависимости от специфичности растительной ткани и видов растений, в которых

клеточный цикл растения был модулирован блокированием эндогенных SKI-белков в результате ингибирования активности циклин/CDK.

5 [0134] У семенных культур, таких как кукуруза, рис, пшеница, ячмень, соя, канола, повышенный урожай может быть в виде повышенного общего количества семян, увеличенного размера семян или в виде увеличения обоих и числа семян, и размера
10 семян. В одном варианте воплощения изобретения, повышенную урожайность получают в трансгенных разновидностях любой из семенных культур путем экспрессии трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, приводящей к повышенному клеточному делению и
15 увеличенному общему числу семян, более крупным семенам или к обоим, к увеличенному числу семян и размеру семян. В одном варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют конститутивным промотором. В другом
20 примере осуществления изобретения экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют семяспецифическим промотором, направляющим эффект мутантного белка SKI на семя, которое является важным компонентом семенной продуктивности с агрономической точки зрения.

[0135] Для масличных культур, таких как соя, канола, камелина, лен, кукуруза, сафлора
25 или подсолнечник и тому подобное, у которых желаемым продуктом является масло, повышенный урожай принимает форму более высокого выхода масла на растение. Масло получают из зародышей семян. В одном варианте воплощения, повышенный выход масла получают у трансгенных вариантов любой из масличных культур путем экспрессии
30 трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, являющегося причиной повышенного клеточного деления, приводящего к увеличенному общему числу семян, более крупным зародышам, или к обоим, к увеличенному числу семян и к размеру зародышей. Увеличенное общее число семян на растение приводит к повышенному общему выходу
35 масла на растение. Увеличенный размер зародыша приводит к повышенному содержанию масла в одном семени и повышенному общему выходу масла на растение. В предпочтительном варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют эмбрио-специфическим промотором, придающим повышенное клеточное
40 деление на ранней стадии развития зародыша, приводящей к более крупному зародышу, повышенному количеству масла на семя и соответствующему повышению общего выхода масла на растение.

45 [0136] Производство несеменной биомассы является главным компонентом урожайности таких культур, как люцерна, салат-латук, табак, эвкалипт и тополь. Повышенная урожайность таких культур была бы обнаружена в увеличенном общем росте растения, приводящем к повышенному накоплению биомассы. В одном таком варианте
50 изобретения, увеличенную биомассу получают у трансгенных разновидностей любой из

культур для производства биомассы путем экспрессии трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, вызывающей усиленное клеточное деление, приводящее к повышенному росту и биомассе. В одном варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют промотором, придающим конститутивную экспрессию трансгена, кодирующего мутантный белок SKI в большинстве или во всех тканях растения. В предпочтительном варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют ткане-специфическим промотором, направляющим экспрессию трансгена на важный с агрономической точки зрения компонент растения, например, листья у латука или табака, или ствол у эваклипта или тополя для накопления биомассы в тканях-мишенях.

[0137] Сахар или целлюлоза является основным компонентом урожая зерновых, выращенных в целях производства этанола, в том числе сахарный тростник, сахарная свекла, кукуруза и просо. В одном варианте изобретения повышенное содержание сахара получают у трансгенных разновидностей любой из культур, производящих сахар, таких как сахарный тростник или сахарная свекла, путем экспрессии трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, вызывая усиленное клеточное деление, усиленный рост тканей растения, аккумулирующих сахар, и повышенное общее содержание сахара на растение. В одном таком варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI в культурах, производящих сахар, контролируют промотором, приводящим к конститутивной экспрессии трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, в большинстве, или во всех тканях растения. В предпочтительном варианте изобретения экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют ткане-специфическим промотором, направляющим экспрессию трансгена на накопление сахара в растительной ткани, например, в стебле сахарного тростника, или корне сахарной свеклы, таким образом усиливая клеточную пролиферацию и рост растительных тканей, запасующих и аккумулирующих сахар, приводя к повышенному общему содержанию сахара. В другом варианте воплощения изобретения, повышенное содержание целлюлозы получают у трансгенных разновидностей любой из культур, производящих целлюлозу, таких как кукуруза или просо, путем экспрессии трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, приводя к усиленному клеточному делению и синтезу клеточной стенки, таким образом повышая содержание целлюлозы, которая является компонентом клеточной стенки. В одном варианте изобретения, экспрессию трансгена мутантного белка SKI контролируют промотором, обеспечивающим конститутивную экспрессию трансгена, кодирующего мутантный белок SKI, в большинстве или во всех тканях растения. Последующее общее усиление клеточной пролиферации приводит к повышенному депонированию в клеточной стенке и таким образом к повышенному общему содержанию целлюлозы растения.

ПРИМЕРЫ

5 [0138] Следующие примеры предлагают для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1. Получение/очистка активного комплекса циклин:CDK и получение/очистка молекул Kgr.

10 Клетки насекомых и среда

[0139] Бакуловирусная система экспрессии является универсальной эукариотической системой гетерологичной экспрессии генов. Эта система обеспечивает правильный фолдинг белка, образование дисульфидных связей и другие важные пост-трансляционные модификации. Все методы брали из *Baculovirus expression vector system: Procedures and methods manual*. (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA. 6th ed.).
15 Клетки насекомых Sf9 выращивали при 27°C в среде для клеток насекомых TNM-FH (BD Biosciences) в исследованиях, о которых сообщают. Необходимо отметить, что альтернативная среда является хорошо известной специалистам в данной области и также является пригодной. Аналогично, альтернативные клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf21 и High Five TM, также будут работать для получения вирусов и
20 получения белка.

30 *Вестерн-блот и иммунопреципитация*

[0140] Рекомбинантный белок, экспрессированный в клетках насекомых, исследовали Вестерн-блоттингом. Белковые экстракты (35 мкг) кипятили в присутствии буфера Лэммли, разгоняли в 10% или 12% гелях SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF с помощью аппарата для переноса при погружении (BioRad). После переноса мембрану блокировали в TBS-T (25 mM Tris pH 7,5; 75 mM NaCl; 0,05% Tween), содержащем 5% порошка обезжиренного сухого молока. Использовали первое антитело при разведении
35 1:1000 в течение ночи в буфере для блокирования TBS-T. Блоты промывали три раза 15 минут при комнатной температуре. Подходящее второе антитело, конъюгированное пероксидазой хрена (HRP), использовали в разведении 1:10000 в буфере для блокирования TBS-T. Иммуноблоты инкубировали во втором антителе в течение 1 часа и
40 затем промывали три раза в буфере TBS-T, по 15 минут каждый. Затем иммуноблоты проявляли как описывают в протоколе к системе ECL (Amersham Biosciences).
Использовали широко применяемые антитела anti-flag M2 моноклональное антитело (Sigma), anti-NA моноклональное или поликлональное антитело (Babco), anti-PSTAIR антитело (Sigma- Aldrich), anti-мус моноклональное или поликлональное (A-14) (Santa
50

Cruz Biotechnology). Использованными вторыми антителами были анти-мышинные IG-HRP, и противокроличьи IG-HRP (GE Healthcare).

5 [0141] Иммунопреципитацию выполняли обычным способом для мониторинга
комплексообразования между молекулами AtCyclinD2;1, AtCDKA и Kgp. Белковые
экстракты (14 мкг) разводили в 0,5 мл буфера для связывания (100 мМ натрий-
10 фосфатного буфера pH 7,0, 150 мМ NaCl, 1% Triton 100 с добавлением ингибиторов
протеаз). Смесь белок/антитело осторожно покачивали при 4°C в течение
приблизительно двух часов и затем добавляли соответствующее антитело (2 мкг анти-
15 flag M2 антитела; 5 мкл анти-НА антитела; 5 мкл анти-тус поликлонального антитела).
Protein A-сефарозу добавляли до получения объема слоя 10 мкл. Иммунопреципитаты
осторожно перемешивали в течение 1 часа при 4°C и затем промывали 3 раза с помощью
20 1 мл буфера для связывания. Затем белковые комплексы, связанные с Protein-A
сефарозой, кипятили в присутствии буфера Лэммли. Белковые комплексы подвергали
разделению или в 10% или в 12% гелях SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF.
Мембраны подвергали блотингу как описывают выше.

25 *Конструирование бакуловирусного вектора*

[0142] кДНК последовательности циклина D2;1 (AtcyclinD2;1) *Arabidopsis* и CDKA (AtCDKA)
30 *Arabidopsis* помечали эпитопной меткой и клонировали в бакуловирусный вектор
переноса (BD Biosciences). Другие векторные системы для переноса, известные
специалистам в данной области, также могут быть использованы. AtCyclinD2;1 помечали
с помощью FLAG эпитопа (Sigma-Aldrich) на N-конце добавлением аминокислотной
35 последовательности Met Asp Tyr Lys Ala Phe Asp Asn Leu (MDYKAFDNL) (SEQ ID No.:18)
с помощью ПЦР и затем клонировали в вектор переноса pAcHLT (BD Biosciences). Другие
бакуловирусные векторные системы для переноса, например, Baculodirect (Invitrogen),
также могут быть использованы для этой цели. Эпитопную аминокислотную
40 последовательность гемагглютинаина (НА) Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
(YRYDVDPYA; SEQ ID NO: 19) помещали в рамку с 5'-концом AtCDKA с помощью ПЦР и
затем клонировали в вектор переноса pVL1393 (AB Vector, CA). Циклин и CDK помечали
эпитопной меткой для обеспечения идентификации вестерн-блотом и для экспериментов
45 по иммунопреципитации. Также могут быть использованы циклин и/или CDK, лишённые
тэгов. Другие совместимые векторные системы для переноса также могут быть
применены.

50

Изготовление рекомбинантного вируса

[0143] Используют бакуловирусный геном Baculogold Bright Baculovirus (BD Biosciences).
5 Альтернативные бакуловирусные (Baculovirus) геномы также могут быть использованы.
Вариант AtcyclinD2;1 с прикрепленной Flag-меткой вводили в несущественную
(nonessential) область бакуловирусного генома с помощью гомологичной рекомбинации.
10 Гомологичная рекомбинация происходит при котрансфекции вектора переноса,
содержащего циклин D2; 1, с линейаризованной ДНК BD Baculogold Bright Baculovirus DNA
в клетки насекомых Sf9. Клетки Sf9 высевали при 2×10^6 клеток на чашки 60 мм и быстро
котрансфецировали с помощью 2 мкг вектора переноса циклина D2; 1 трансфер вектор
15 (pAcHLT-cyclinD2;1) плюс 0,5 мкг линейаризованной ДНК BD Baculogold Bright Baculovirus
DNA с использованием реактива для трансфекции Fugene 6 transfection reagent в
соответствии с протоколом фирмы-производителя (Roche Diagnostics). Через 4 часа
трансфекции раствор Fugene/ДНК удаляли и заменяли на 3 мл среды TNM-FH. Через
20 четыре (4) дня супернатант собирали и впоследствии использовали для инфицирования
большого количества клеток для амплификации вируса. Эту амплификацию повторяли
до титра вируса по меньшей мере, 10^9 вирусных частиц/мл. Вирус амплифицировали
инфицированием клеток Sf9 при множественности заражения (moi) < 1 . Титр вируса
25 определяли с помощью световой и флуоресцентной микроскопии.

[0144] Вариант AtCDKA1, меченый HA, вводили в несущественную область
30 бакуловирусного генома с помощью гомологичной рекомбинации. Гомологичная
рекомбинация происходит при котрансфекции вектора переноса, содержащего циклин
D2;1, с линейаризованной ДНК BD Baculogold Bright Baculovirus DNA в клетки насекомых
Sf9. Клетки Sf9 высевали при 2×10^6 клеток на чашки 60 мм и быстро котрансфецировали
35 с помощью 2 мкг вектора переноса (pVL1393-AtCDKA) плюс 0,5 мкг линейаризованной
ДНК BD Baculogold Bright Baculovirus DNA с использованием реактива для трансфекции
Fugene 6 transfection reagent в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Roche
Diagnostics). Через 4 часа трансфекции раствор Fugene/ДНК удаляли и заменяли на 3
40 мл среды TNM-FH. Через четыре (4) дня супернатант собирали и впоследствии
использовали для инфицирования большого количества клеток для амплификации
вируса. Эту амплификацию повторяли до титра вируса по меньшей мере, 10^9 вирусных
частиц/мл. Вирус амплифицировали инфицированием клеток Sf9 при множественности
45 заражения (MOI) < 1 . Титр вируса определяли с помощью световой и флуоресцентной
микроскопии.

Получение рекомбинантного белка в клетках насекомых.

50

[0145] Получение белка AtcyclinD2;l, меченного Flag: Мечение AtcyclinD2;l достигали инфицированием клеток Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса AtcyclinD2;l. С этой целью клетки Sf9 выращивали в суспензионной культуре при 2×10^6 /мл, инфицировали с помощью рекомбинантного бакуловируса при MOI > 5 (но более высокое или несколько меньшее значение MOI также будет действовать) в течение приблизительно от 4 до 5 дней и затем собирали. Клетки собирали и центрифугировали при 3000 об./мин. при 4°C. Осадок клеток промывали с помощью свежей среды и затем центрифугировали при 3000 об./мин. при 4°C. Осадок замораживали при -80°C или немедленно подвергали лизису. Лизирующий буфер состоял из 20 мМ HEPES pH 7,5, 20 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 20% глицерин, 20 мМ MgCl₂ плюс ингибиторы протеаз (Complete Mini, EDTA free, Boehringer Mannheim), 1 таблетка на 10 мл лизирующего буфера. Клеточный лизат обрабатывали ультразвуком на льду 2 раза в течение 15 секунд. Затем лизат белка центрифугировали при 40000 об./мин. в роторе 100.2 Beckman TLA в течение 2 часов. Супернатант, содержащий меченый AtCyclinD2;l, делили на аликвоты и замораживали при -20°C. Экспрессию определяли вестерн-блоттингом с помощью моноклонального антитела анти-Flag M2 (Sigma-Aldrich).

[0146] Получение меченого AtCDKA достигали инфицированием клеток Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса AtCDKA и обрабатывали таким же образом, как описывают выше. Экспрессию мониторируют вестерн-блоттингом с помощью моноклонального или поликлонального антитела anti-HA (Babco). Экспрессия также может быть определена вестерн-блоттингом с помощью антитела anti-PSTAIR (Sigma-Aldrich).

[0147] Активный киназный комплекс AtcyclinD2;1/AtCDKA достигали коинфицированием клеток Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса AtcyclinD2;l (MOI > 5) плюс AtCDKA (MOI > 5). Активный комплекс очищали как описывают выше. Экспрессию белка определяли вестерн-блоттингом экстрактов клеток насекомых с помощью антитела anti-Flag M2 или антитела anti-HA. Взаимодействие AtcyclinD2;l и AtCDKA определяли коиммунопреципитацией как описывают ниже.

Метод анализа киназной активности

[0148] Анализ *in vitro* разрабатывали для тестирования способности различных молекул KRP/ICK ингибировать комплексы циклин/CDK.

[0149] Киназную активность в белковых экстрактах клеток насекомых, инфицированных индивидуальными бакуловirusами, или котрансфицированных с помощью двух бакуловirusов, определяли с помощью стандартного киназного анализа. Гистон H1 (H1) был основным используемым субстратом, но рекомбинантный табачный белок

ретинобластомы (Nt Rb) также мог быть использован в качестве субстрата (смотри, Koroleva *et al.*, *Plant Cell* 16, 2346-79, 2004). Методы анализа киназной активности выполняли следующим образом: 7 мкг белкового экстракта клеток насекомых прибавляли к смеси киназного буфера (КАВ: 50 мМ Tris pH 8,0, 10 мМ MgCl₂, 10 мкМ АТФ плюс 0,5 мкКи/мл ³²PγАТФ и 2 мкг ННІ) до конечного объема 30 мкл. Реакционную смесь инкубировали при 27°C в течение 30 минут. Киназную реакцию останавливали с помощью равного объема (30 мкл) 2-кратного буфера Лэммли. Включение [³²P]-фосфата регистрировали автордиографией и/или с помощью системы Molecular Dynamics PhosphorImager с последующим SDS-PAGE на 12% гелях. Альтернативные буферные параметры для выполнения CDK-киназных анализов также могут быть применены. (смотри, например, Wang and Fowke, *Nature* 386:451-452, 1997; Azzi *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 203:353-360, 1992; Firpo *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 14:4889-4901, 1994.)

[0150] Результаты: Экстракт белка клеток насекомых, инфицированных с помощью только AtcyclinD2;I или только AtCDKA, не обнаруживал киназную активность с использованием в качестве субстрата ННІ. Клетки насекомых, котрансфицированные с помощью вируса AtcyclinD2;I и вируса AtCDKA, содержали устойчивую киназную активность.

Активные CDK-подобные (cdc2-like) киназы также могут быть очищены из экстрактов растительных тканей или экстрактов культуры клеток тканей растений с помощью агарозных гранул рІ3sucI (Смотри Wang and Fowke, *Nature* 386:451-452, 1997; Azzi *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 203:353-360, 1992) и использованы в аналогичном анализе, описанном выше, и в экспериментах по конкурентному связыванию, описанных ниже в примерах 2-8.

Клонирование кДНК Krp в бактериальный экспрессионный вектор

Клонирование AtKrp1

[0151] кДНК AtKrp1 клонировали из кДНК *Arabidopsis* путем ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидов:

(начало) 5' ATGGTGAGAAAATATAGAAAAGCT-3' (SEQ ID NO:20);

(конец) 5'-TCACTCTAACTTTACCCATTCGTA-3' (SEQ ID NO:21).

Полученный в результате ПЦР фрагмент субклонировали в вектор pCRII-ТОРО (Invitrogen). Полученный вектор AtKrp1 #359 секвенировали для установления подлинности правильной последовательности для GenBank# U94772.

Клонирование 5' RACE Krp1 *Brassica napus*

[0152] С целью поиска использовали медленное сравнение blastn на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации для поиска последовательностей *Brassica*, гомологичных кодирующим последовательностям AtKRP1. Поиск обнаружил два кандидата EST, CD820320 и CD829052, которые, оказалось, были идентичными последовательностями. CD820320 брали из поиска Jorja's blastx для подтверждения того, что транскрибируемая нуклеотидная последовательность EST в значительной степени согласуется с белковой последовательностью At KRP1.

[0153] CD829052 составляет 646 п.о. и включает в себя, по меньшей мере, 106 аминокислот последовательности KRP1 *Brassica oleracea* и 3'UTR. Праймер 5' RACE (GSP1brasskrp1_5'RACE:

5'-CTCTGATAATTTAACCCACTCGTAGCGTCCTTCTAATGGCTTCTC-3'; SEQ ID NO:22) конструировали для восстановления полноразмерного VnKRP1. Праймер RACE содержал последние 45 нуклеотидов кодирующей последовательности CD820320.

[0154] кДНК, подготовленную методом 5' RACE, получали из DH12075 листьев *Brassica napus* с помощью набора для амплификации SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). 5' RACE выполняли на этой кДНК в соответствии с инструкциями к набору, за исключением того, что вместо KlenTaq использовали фермент pfu и буфер (Stratagene). Условиями ПЦР были: начальная денатурация при 94°C в течение 5 минут, с последующими 35 циклами при 94°C в течение 5 секунд, 68°C в течение 10 секунд, 72°C в течение 3 минут. Полученный ПЦР-продукт был очень слабой полосой массой приблизительно 600 п.о. Затем 2,5 мкл этого ПЦР-продукта подвергали повторной амплификации с использованием вышеуказанных условий ПЦР. Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор TOPO Blunt (Invitrogen) и трансформировали в клетки alpha gold cells (Bioline). Выделяли плазмидную ДНК из двух трансформантов и вставки (*пер., инсерции*) секвенировали с помощью прямого и обратного праймеров M13. Последовательность одного кандидата вставки была идентичной CD820320 и обозначена Vn KRP1-II (никаких дополнительных новых последовательностей не происходит в результате RACE). Последовательность другой вставки кандидата, обозначенной Vn KRP1-I, была на 94% идентичной Vn KRP1-II на нуклеотидном уровне в кодирующей области, и на 86% идентичной на аминокислотном уровне для последних 106 остатков. RACE восстанавливала полную кодирующую последовательность Vn KRP1-I с дополнительными 108 парами оснований 5' UTR относительно вектора Blunt TOPO (pTG313). Кодирующую последовательность VnKrp1 (SEQ ID NO:23) показывают ниже:

1 atggtgagaaaatgcagaaaaactaaagggacgggtgggagctctctacgtatatgcagcttcgagccggagaatcgt 80

мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и растили при 37°C. При достижении культурой OD₆₀₀ между 0,6 и 0,8 экспрессию рекомбинантного белка индуцировали с помощью 0,5 мМ изопропил-D-тиогалактопиранозидом (IPTG). Затем клетки растили при 30°C в течение трех часов. Клетки собирали центрифугированием в роторе JLA 10500 Beckman. Осадок бактериальных клеток или хранили при -80°C, или немедленно лизировали. Бактерии лизировали в 10 мл фосфатного лизирующего буфера (100 мМ фосфатный буфер pH 7,0, 150 мМ NaCl, 1% Triton X100), содержащем ингибиторы протеаз и не содержащем EDTA. Ресуспендированную бактериальную культуру обрабатывали ультразвуком 4 X 20 секунд в водном льде при мощности 40%. Лизированные клетки центрифугировали при 14000 об./мин. в роторе JA 20.1 Beckman в течение 15 минут при 4°C. Осадок клеток промывали с помощью 10 миллилитров фосфатного лизирующего буфера и осадок клеток снова собирали центрифугированием. Целевые молекулы KRP были в основном нерастворимыми. Нерастворимые целевые молекулы KRP солюбилизировали в буфере с мочевиной (8М мочевины, 100 мМ Tris pH 7,5). Ресуспендированный осадок клеток кратко обрабатывали ультразвуком 3 X 15 секунд в водном льде при 40% мощности. Белки, нерастворимые в мочевины, удаляли центрифугированием при 14000 об./мин. в роторе JA20.1 Beckman в течение 15 минут при 4°C. Целевые KRPs очищали в серии с помощью аффинной смолы с иммобилизованным металлом BD Talon Co²⁺, уравновешенной буфером с мочевиной. Серию при очистке инкубировали при 4°C от 3 часов до периода в течение ночи при медленном вращении. Суспензию наносили на колонку и смолу промывали с помощью 36 объемов смолы в колонке буфером с мочевиной с последующей промывкой 12 объемами буфера с мочевиной, содержащем 5 мМ имидазола pH 7,5. Связавшийся целевой белок KRP элюировали с помощью буфера с мочевиной, содержащем 300 мМ имидазола, pH 7,5. Фракции анализировали на целевой KRP электрофорезом SDS-PAGE и/или определением белка с помощью Bradford protein assay (BioRad). Рефолдинг денатурированного целевого KRP1 выполняли с помощью диализа с пошаговым разбавлением. Фракции, содержащие основную часть целевого белка KRP, объединяли и диализовали в 1М мочевины, 100 мМ Tris pH7,5, 150 мМ NaCl и 5 мМ β-меркаптоэтанола плюс 5 мМ бензамидина в течение 20 часов при 4°C. Затем буфер для диализа заменяли на 0,5 М мочевины, 100 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl и 5 мМ β-меркаптоэтанол плюс 5 мМ бензамидина и продолжали диализ в течение дополнительных 12 часов. Рекомбинантный белок собирали, определяли количество методом Bradford и хранили при 4°C.

Мутагенез Krps.

[0158] Версии членов семейства AtKRP дикого типа и членов семейства BnKRP субклонировали в основной вектор pCRII-TOPO (Invitrogen) для целей секвенирования и мутагенеза.

5

[0159] Такой же ПЦР-фрагмент кДНК AtKRP1 дикого типа, содержащий сконструированный сайт 5'- *Bam*HI и сайт 3'-*Xho*I (смотри, "Cloning of Krp cDNAs into bacterial expression vector," выше) субклонировали в вектор pCRII-TOPO (Invitrogen) для мутагенеза. Полученный вектор Торо-AtKrp #385В, содержащий кДНК AtKRP1 дикого типа, проверяли на наличие правильной последовательности с помощью стандартного автоматического секвенирования. Такой же фрагмент кДНК BnKRP1 дикого типа из вышеуказанного субклонировали в вектор pCRII-TOPO (Invitrogen) для мутагенеза. Полученный вектор Торо-BnKrp #539, содержащий кДНК дикого типа, проверяли на наличие правильной последовательности с помощью стандартного автоматического секвенирования.

10

15

20

[0160] Сайт-направленный мутагенез выполняли в соответствии с протоколом для набора Stratagene's QuikChange site-directed mutagenesis kit.

25

[0161] Для конструирования BnKrp1#462 с множественными аминокислотными замещениями в предполагаемой циклинсвязывающей области (E129A, E130A, I131 A, D132A) смысловую BnKrp1DbleMut#1 (GGAGCAACCACCAACGGCAGTGGCTGCTGCTGCTTTTTTCGTG; SEQ ID NO:28) и анти-смысловую BnKrp1DbleMut#1b

30

(CACGAAAAAAGCAGCAGCAGCCACTGCCGTTGGTGGTTGCTCC; SEQ ID NO:29) использовали для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций. Затем мутантный продукт субклонировали в сайт *Bam*HI/*Xho*I pET16b-5MYC получения конечного BnKrp1#462.

35

40

[0162] Для конструирования BnKrp1# 512 с двумя аминокислотными замещениями в высококонсервативных остатках CDK-связывающей области (F151A, F153A) смысловой олигонуклеотид BnKrp1DbleMut#2 (CCTTСТААТGGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTАТАСТTCTTCTTGAA; SEQ ID NO:30) и антисмысловой олигонуклеотид BnKrp1DbleMut#2b (TTCAAGAAGAAGTATAACGCTGATGCTGAAAAGGAGAAGCCATTAGAAGG; SEQ ID NO:31) использовали для сайт-направленного мутагенеза с помощью QuikChange с ТороBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *Bam*HI/*Xho*I

50

рЕТ16b-5MYC. Такие же аминокислотные замены вводили также в AtKRP1 с использованием AtKrpI-Торо # 385В в качестве матрицы с использованием нижеприведенных олигонуклеотидов QCICK1 кодирующей последовательности cdsF173A, F175A-кодирующей" 5'-ТТСААГААГААГТАСААТGCCGATGCCGAGAAGGAGAAGCCАТТА-3'; (SEQ ID NO:32) и "QCICK1 кодирующей последовательности cdsF173A, F175A-некодирующей" 5'-ТТАТGGСТТСТССТТСТGGGCАТCGGCАТТGTАСТТСТТСТТGAA-3' (SEQ ID NO:33).

[0163] Для конструирования ВnKrp1#463 с аминокислотными заменами в предполагаемой циклинсвязывающей области и высококонсервативными остатками в CDK-связывающей области (E129A, E130A, I131A, D132A,+ F151A,F153A) использовали смысловой олигонуклеотид

ВnKrp1DbleMut#2((CСТТСТААТGGСТТСТССТТТТCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGGAA; SEQ ID NO:30) антисмысловой олигонуклеотид ВnKrp1DbleMut#2b (ТТСААГААГААГТАТААCGСТGATGCTG AAAAGGAGAAGCCАТТАГААGG; SEQ ID NO:32) для сайтнаправленного мутагенеза QuikChange с ВnKrp#462 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* рЕТ16b-5MYC.

[0164] Для конструирования ВnKrp1# 586 с одной аминокислотной заменой в CDK-связывающей области (K148A) использовали смысловой олигонуклеотид ВnKrpIK148A (GATAАТТТСААГААG GCGTATAАСТТТGАТТТC; SEQ ID NO:34) и антисмысловой олигонуклеотид ВnKrpIK148A (GAAАТCAAAGTTАТACGCСТТСТТGAAАТТАТC; SEQ ID NO:35) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* рЕТ16b-5MYC.

[0165] Для конструирования ВnKrpI#587 с одной аминокислотной заменой в CDK-связывающей области (Y149A) использовали смысловой олигонуклеотид ВnKrp1Y149A (ААТТТСААГААГААG GСТААСТТТGАТТТCGAA; SEQ ID NO:36) и антисмысловой олигонуклеотид ВnKrp1Y149A (ТТCGAAАТCAAAGTTAGCСТТСТТСТТGAAАТТ; SEQ ID NO:37) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* рЕТ16b-5MYC.

[0166] Для конструирования ВnKrpI# 588 с одной аминокислотной заменой в CDK-связывающей области (N150A) использовали смысловой олигонуклеотид ВnKrp1N150A (ТТСААГААГААГТАТ GCСТТТGАТТТCGAAААG; SEQ ID NO:38) и антисмысловой олигонуклеотид ВnKrp1N150A (СТТТТCGAAАТCAAAGGCАТАСТТСТТСТТGAA; SEQ ID

NO:39) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВнКрп#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

5

[0167] Для конструирования ВнКрп1#572 с одной аминокислотной заменой в CDK-связывающей области (F151A) использовали смысловой олигонуклеотид ВнКрп1F151A (AGAAGAAGTATAACGCTGATTTTCGGAAAGGA; SEQ ID NO:40) и антисмысловой олигонуклеотид ВнКрп1F151A (TCCTTTTCGAAATCAGCGTTATACTTCTTCT; SEQ ID NO:41) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВнКрп#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

10

15

[0168] Для конструирования ВнКрп1#573 с одной аминокислотной заменой в CDK-связывающей области (F153A) использовали смысловой олигонуклеотид ВнКрп1F153A (AGTATAACTTTGATGCCGAAAAGGAGAAGCC; SEQ ID NO:42) и антисмысловой олигонуклеотид ВнКрп1F153A (GGCTTCTCCTTTTCGGCATCAAAGTTATACT; SEQ ID NO:43) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВнКрп#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

20

25

[0169] Для конструирования ВнКрп1# 553 с двумя аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (K157A; P158A) использовали смысловой олигонуклеотид ВнКрп1KP->AA (GATTTTCGAAAAGGA GCGGCATTAGAAGGACGCT; SEQ ID NO:44) и антисмысловой олигонуклеотид ВнКрп1KP→AA (AGCGTCCTTCTAATGCCGCCTCCTTTTCGAAATC) (SEQ ID NO:45) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВнКрп#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

30

35

[0170] Для конструирования ВнКрп1# 554 с двумя аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (R162A; Y163A) использовали смысловой олигонуклеотид ВнКрп1RY->AA (GCCATTAGAAGGA GCCGCCGAGTGGGTAAATT; SEQ ID NO:46) и антисмысловой олигонуклеотид ВнКрп1RY→AA (AATTTAACCCACTCGGCGGCTCCTTCTAATGGC; SEQ ID NO:47) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с ТороВнКрп#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

40

45

50

[0171] Для конструирования BnKrpI# 555 с двумя аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (E164A; W165A) использовали смысловой олигонуклеотид BnKrpIEW→AA (AGAAGGACGCTAC GCGGCGGTAAATTATCAGA; SEQ ID NO: 48) и антисмысловой олигонуклеотид BnKrpIEW→AA (TCTGATAATTTAACCGCCGCGTAGCGTCCTTCT; SEQ ID NO: 49) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с TopoBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

[0172] Для конструирования BnKrpI# 556 с двумя аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (K167A; L168A) использовали смысловой олигонуклеотид BnKrpIKL→AA (CGCTACGAGTGGGT TGCAGCATCAGAGTGAGAGC; SEQ ID NO: 50) и антисмысловой олигонуклеотид BnKrpIKL→AA (GCTCTCACTCTGATGCTGCAACCCACTCGTAGCG; SEQ ID NO:51) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с TopoBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

[0173] Для конструирования BnKrpI# 574 с множественными аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (F151A; F153A; E164A; W165A) использовали олигонуклеотид BnKrp1F151A, F153A (CCTTCTAATGGCTTCTCCTTTTCAGCATCAGCGTTATACTTCTTCTTGAA; SEQ ID NO: 52) антисмысловой олигонуклеотид F151 A, F153A (TTCAAGAAGAAGTATAACGCTGATGCTGAAAAGGAGAAAGCCATTAGAAGG; SEQ ID NO:53) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с TopoBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

[0174] Для конструирования BnKrp1#598 с множественными аминокислотными заменами в CDK-связывающей области (Y149A;F151A;F153A) использовали смысловой олигонуклеотид BnKrp1Y149A (AATTTCAAGAAGAAGGCTAACGCTGATGCTGAA; SEQ ID NO:54) и антисмысловой олигонуклеотид BnKrp1Y149A (TTCAGCATCAGCGTTAGCCTTCTTCTTGAAATT; SEQ ID NO:55) для сайт-направленного мутагенеза QuikChange с TopoBnKrp#539 в качестве матрицы. Продукт мутагенеза секвенировали для подтверждения наличия желаемых мутаций и затем субклонировали в сайт *BamHI/XhoI* pET16b-5MYC.

[0175] Для конструирования BnKrp1#547, использовали следующие два олигонуклеотида для амплификации кДНК BnKrp1, у которой отсутствует большинство двух С-концевых

аминокислот, то есть, Ser и Glu, которые прибавляют сайт 5' *Bam*HI/*Nde*I и сайт рестрикции *Xho*I на 3'-конце *BnKrp1* (5' *BnKrp1 Bam*HI/*Nde*I: ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEQ ID NO:26) и 3' *BnKrp1SE*>stop *Xho*I: CTCGAGTCAAGCAGCTAATTAAACCCACTCGTA (SEQ ID NO:56). ПЦР-фрагмент амплифицировали из рTG#313 (TopoII *BnKrp1*) и субклонировали в сайт *Bam*HI и *Xho*I рET16b-5мус и секвенировали. Полученный вектор *BnKrp* #547 содержал кДНК *BnKrp1* в рамке с тэгами 6XHis и мус.

[0176] Для конструирования *BnKrp1*#614 использовали нижеуказанные два олигонуклеотида для амплификации кДНК *BnKrp1* с полностью отсутствующим CDK-связывающим доменом: 5' *BnKrp1 Bam*HI/*Nde*I: ACGGATCCCATATGGTGAGAAAATGC (SEQ ID NO: 26) и 3' *BnKrp1*Δcdk: CTCGAGTCACTTCTTGAAATTATC (SEQ ID NO: 57), который содержит сайт *Xho*I. ПЦР-фрагмент амплифицировали из рTG#420 (TopoII *BnKrp1*) и субклонировали в TopoII (Invitrogen) и секвенировали. Затем фрагмент *Bam*HI/*Xho*I субклонировали в рET16b-5мус. Полученный вектор *BnKrp* #614 содержал кДНК *BnKrp1* с недостающей кодирующей последовательностью CDK-связывающей области в рамке с тэгами 6XHis и мус.

Пример2. Аминокислотная гомология между р27^{KIP1} млекопитающих и KRPs растений.

[0177] Семейство CIP1/KIP1 CKIs использует две контактирующие области для связывания и ингибирования киназного комплекса. На основе такого способа связывания и ингибирования изменение связывающей способности одной из этих двух областей могло потенциально привести к доминантно-негативному белку, который еще может взаимодействовать с комплексом (через интактный домен), но больше не ингибирует киназную активность и не дает CKI дикого типа ингибировать активный комплекс циклин/CDK. Например, при приведении циклин-связывающей области в нефункциональное состояние мутантный белок все еще взаимодействовал бы через CDK-связывающую область с киназным комплексом через интактный домен. Аналогично, при приведении CDK-связывающей области в нефункциональное состояние мутантный белок все еще взаимодействовал бы через циклин-связывающую область с киназным комплексом.

[0178] Семейство AtKrp CKI's имеет общие гомологии по всему целому белку с наивысшей степенью гомологии находящейся большей частью в С-концевых аминокислотах с 40 по 45 (смотри, Wang *et al.*, *Nature* 386:451-452, 1997; Wang *et al.*, *Plant J.* 15:501-510, 1998; Lui *et al.*, *Plant J.* 21:379-385, 2000; De Veylder *et al.*, *Plant Cell* 13:1653-1667, 2001; Jasinski *et al.*, *Plant Physiol* 130:1871-1882, 2002; Zhou *et al.*, *Plant Cell Rep.* 20:967-975, 2002; Zhou *et al.*, *Plant J.* 35:476-489, 2003). Однако только приблизительно

последние 23 аминокислоты семейства Krp обнаруживают гомологию с p27^{KIP1} млекопитающих (смотри Фигуру 1).

5 [0179] Эксперименты по связыванию *in vitro* выполняли для облегчения выяснения взаимодействий при связывании представителя KRP, а именно BnKRP1 и AtcyclinD2;l и AtCDKA. Связывающие взаимодействия других членов семейства KRP также могут быть
10 выяснены с помощью тех же самых, описанных выше, экспериментов по связыванию *in vitro*. Эксперименты по связыванию *in vitro* с использованием мутантных вариантов BnKrp1, содержащих аминокислотные замещения высококонсервативных аминокислот в CDK-связывающей области, обнаружили, что только одна эта область была необходима для связывания с CDK, тогда как связывание с Atcyclin все еще сохранялось. Более того
15 интактный CDK-связывающий домен является абсолютно необходимым для ингибирования комплекса AtCyclinD2/CDKA. Аминокислоты, расположенные непосредственно выше от CDK-связывающей области, в области, которая, как
20 утверждают авторы изобретения, является циклин-связывающей областью, являются консервативными среди членов семейства KRP, (смотри Фигуру 1) но не в p27^{KIP1}. Мутация нескольких консервативных остатков внутри этого предполагаемого циклин-связывающего домена уничтожает взаимодействие с AtcyclinD2;l, тогда как
25 взаимодействие с AtCDKA остается неизменным. Интересно, что этот предполагаемый мутантный циклин-связывающий участок тем не менее ингибирует киназный комплекс AtcyclinD2/CDKA, хотя не так эффективно, как KRP1 дикого типа. Ингибирующая концентрация, которая снижает киназную активность на 50% (IC₅₀) составляла 0,035 мкг для KRP1 дикого типа (BnKrp# 461), тогда как IC₅₀ для циклин-связывающего мутанта (BnKrp#462) составляла 1,25 мкг.

35 [0180] Похожие наблюдения были обнаружены с аналогом p27^{KIP1} млекопитающих (смотри, Vlach *et al.*, *EMBO J.* 16:5334-44, 1997). IC₅₀ циклин-связывающего мутанта p27^{KIP1} была выше по сравнению с p27^{KIP1} дикого типа. Однако в отличие от этого, CDK-связывающий мутант с высокой концентрацией p27^{KIP1} все еще обладали высокой
40 способностью ингибирования киназного комплекса. Это объясняется, по-видимому, наличием 310-спирали в p27^{KIP1} млекопитающих, которая отсутствует у Krps растений (смотри пример 3 для объяснения).

45 [0181] Эти данные предполагают, что в KRPs существуют две области, которые являются подобными аналогу p27^{KIP1} млекопитающих, ответственными за взаимодействие с активным киназным комплексом. Интересно, что мутантный циклиновый домен все же мог ингибировать киназный комплекс, давая основание предположить, что CDK-связывающая область была в первую очередь ответственной за киназное ингибирование
50 циклин/CDK. Аналогично циклин-связывающая область p27^{KIP1} играла аддитивную роль

в ингибировании активных комплексов CDK. Еще эти результаты иллюстрируют, что в отличие от p27^{KIP1}, CDK-связывающая область KRP1 играет более существенную роль в ингибировании киназ.

5

[0182] Таким образом, концентрирование на высокой гомологии остатков в CDK-связывающей области между членами KRP и p27^{KIP1} будет изменено, в конце концов, на создание доминантно-негативной молекулы VnKrp1, которая все еще может связывать комплекс, препятствуя VnKRP1 дикого типа ингибированию киназного комплекса, все же без ингибирования самого комплекса.

10

Пример 3. Структуру белка p27^{KIP1} млекопитающих в комплексе с циклин/CDK использовали для идентификации ключевых аминокислот, которые контактируют с CDK, которые являются консервативными в KRPs растений.

15

[0183] Для облегчения конструирования доминантно-негативных молекул Krp, которые, в конечном счете, препятствовали бы функционированию KRP дикого типа, использовали ранее опубликованную структуру p27^{KIP1} млекопитающих в комплексе с циклинA-CDK2 киназным комплексом (смотри, Russo *et al.*, *Nature* 382:325-331, 1996). Структурные данные наряду с данными по выравниванию объединяли для идентификации ключевых аминокислот, так что при замене на аланин или другой аминокислотный остаток получали белок с доминантно-негативными характеристиками. Этими доминантными характеристиками являются следующие: 1) мутантный Krp связывается с циклин/CDK-комплексом, 2) мутантный белок не существенно ингибирует образование комплекса циклин/CDK даже при высоких концентрациях и 3) мутантный белок должен конкурировать существенно с молекулой KRP дикого типа за связывание с комплексами циклин/CDK. *In vivo*, мутантные Krps, которые удовлетворяют этим характеристикам, приобрели бы повышенную киназную активность циклин/CDK в клетке, что в конечном счете, привело бы к усиленной пролиферации клеток и к более высокому митотическому индексу.

20

25

30

35

[0184] Киназная активность циклин A/CDK2 млекопитающих может быть полностью выключена связыванием p27^{KIP1}. Было показано, что механизм, посредством которого p27^{KIP1} ингибирует киназный комплекс циклинA/CDK2, является сложным процессом (смотри, Russo *et al.*, выше). p27^{KIP1} использует два способа ингибирования активного киназного комплекса. Первый компонент ингибирования включает в себя 310-спираль p27^{KIP1}, которая, вероятно, не является консервативной в любом из CKIs семейств KRP растений. 310-спираль сама встраивается в каталитическую щель киназы для имитации АТФ-субстрата. Заполнение этой щелевидной области 310-спиралью эффективно блокирует связывание АТФ и киназную активность. Однако даже при отсутствии 310-

40

45

50

спирали p27^{KIP1} все еще обладал способностью ингибирования киназного комплекса (смотри, Polyak *et al.*, *Cell* 78:59-66, 1994).

5 [0185] Сравнение кристаллической структуры p27^{KIP1}, связанного с циклина/CDK2, и киназного комплекса в чистом виде показало, что N-концевая часть CDK2 претерпевает
 10 существенные конформационные изменения при связывании p27^{KIP1} (смотри, Russo *et al.*, *выше*). Действительно, специфические β-складки с N-концевой частью киназы, которые обычно помогают координировать АТФ в активном сайте, теряются при
 15 связывании p27^{KIP1}. Связывание p27^{KIP1} индуцирует рефолдинг, который вовлекает остатки β-шпильки, β-цепи и 310-спираль p27^{KIP1} и аминокислоты β-складки N-концевой части CDK2, которая подвергается рефолдингу с образованием межмолекулярного β-сэндвич (смотри, там же). Такое конформационное изменение в чистом виде
 20 обеспечивает существенное ингибирование киназной активности циклина/CDK2. Остатки внутри p27^{KIP1}, которые образуют этот β-сэндвич, являются высококонсервативными у всех членов семейства p27^{KIP1} млекопитающих и также в значительной степени консервативными у всех членов семейства KRP. На основе результатов, изложенных в
 25 Примере 1, и отсутствии консервативной 310-спирали, вероятно, консервативная CDK-связывающая область у членов семейства KRP связывает активный киназный комплекс и ингибирует киназную активность путем индуцирования конформационных изменений в N-концевой доли AtCDKA киназы. Однако, другая область KRP не может быть исключена в качестве фактически имитирующей связывание АТФ путем встраивания в каталитическую
 30 щель, точно так же, как 310-спираль встраивается в p27^{KIP1} млекопитающих.

[0186] Большинство 23 карбоксиконцевых аминокислот семейства KRP демонстрирует
 35 наивысшую аминокислотную идентичность с p27^{KIP1} млекопитающих (смотри Фигуру 1). Некоторые консервативные остатки в BnKRPI были системно изменены на основе идентичности последовательности с p27^{KIP1} млекопитающих, которые играют роль в образовании β-сэндвича между SKI и киназным комплексом. Каждый мутант сравнивали с BnKRP1 (BnKrp#461) дикого типа по его способности ингибировать киназный комплекс.
 40 В некоторых случаях мутантный BnKrp1 также контролировали на связывание с AtcyclinD2;1 или AtCDKA. Результаты этих экспериментов суммированы ниже в Таблице 2.

[0187] Мутации вносили как описывают подробно в Примере 4, "Мутантные полипептиды SKI KRP".
 45

[0188] На конце большинства N-концевых участков CDK-связывающей области находится мотив Lys Tyr Asn Phe Asp Phe (KYNFDF) (SEQ ID NO:58). Этот мотив
 50 является высококонсервативным у членов семейства KRP как у видов *Arabidopsis*, так и у *Brassica napus*. Эти остатки являются в основном консервативными у p27^{KIP1}. У p27^{KIP1} они

образуют часть витка β -шпильки, который, в конечном счете, образует β -сэндвич с CDK2 в комплексе циклина-CDK2. Каждый из этих консервативных остатков заменяли на аланин и тестировали на их способность ингибировать киназный комплекс (смотри Таблицу 2). Многие единичные мутации замены аминокислот не затрагивали способность ингибировать киназный комплекс *in vitro*. Однако, BnKrp1#587 и BnKrp1#572, показали интересные результаты. В каждом случае киназное ингибирование ослабевало по сравнению с белком дикого типа, давая возможность предположить, что эта область KRP1 играет роль в киназном ингибировании.

[0189] Боковые цепи как 62 так и 64 фенилаланинов у p27^{KIP1} связываются с CDK2, играют существенную роль в образовании β -сэндвича и являются консервативными у KRP1. (смотри Фигуру 1). Поскольку ингибиторная активность F151A Krp1 (BnKrp1#572) была частично нарушена то, как 151, так и 153 фенилаланины заменяли на аланин. Этот двойной мутант, BnKrp1#512, больше не ингибировал киназный комплекс несмотря на его способность все еще связывать киназный комплекс через циклинD2;1. Однако может существовать некоторое остаточное связывание этого мутанта с CDK-частью комплекса.

[0190] 149 тирозин KRP1 не является консервативным у p27^{KIP1}; однако он находится в N-концевом положении β -шпильки, которая контактирует с CDK2 и образует часть β -сэндвича. 149 тирозин является высококонсервативным у членов семейства KRPs *Arabidopsis* и *Brassica*. При замене 149 тирозина на аланин (BnKrp1#587), частично нарушали ингибирующую активность, давая основание предположить, что тирозин играет важную роль в связывании и/или ингибировании CDKA. Таким образом, мутация по этому положению (Y149A) может быть скомбинирована с двойным мутантом F151A и F153A Krp1. Ожидали, что такой тройной мутант сохранит его связывание с киназным комплексом наряду с потерей его способности ингибировать киназную активность.

[0191] С-концевая область по отношению к KYNFDF-мотиву (SEQ ID NO:58) у KRP1 также содержит несколько аминокислот, которые являются консервативными у p27^{KIP1} (смотри Фигуру 1). Многие из этих остатков являются консервативными в β -цепи p27^{KIP1}, которая образует часть β -сэндвича. Некоторые из этих консервативных аминокислот заменяли попарно на аланин (смотри сводную Таблицу 2). Во всех случаях, кроме одного, ингибирующая функция не была существенно повреждена. Исключение составлял мутант Krp1#545 (E164A;W165A), который был намного более слабым ингибитором, чем KRP1 дикого типа. 165 триптофан простирает свою боковую цепь внутри β -сэндвича. Все фенилаланины 151, 153 и E164 и W165 заменяли на аланин (Krp1 #574). Этот сложный мутант BnKrp1 также не ингибировал киназный комплекс даже при использовании в высоких концентрациях.

[0192] Усечение полной CDK-связывающей области KRP1 также не способствовало ингибированию киназного комплекса. Это не было удивительным, поскольку, удаляли целую область, ответственную за связывание CDK. Однако авторы изобретения предполагают, что, вероятно, такое усечение приведет к нестабильному белку.

Пример 4. Мутантные SKI-полипептиды KRP.

[0193] В качестве улучшения по сравнению с предшествовавшими способами, используемыми для экспрессии молчащих генов на посттранскрипционном уровне РНК, была выполнена супрессия членов семейства KRP растений на белковом уровне с помощью доминантно-негативной стратегии. Основной принцип доминантно-негативной стратегии состоит в конструировании гена для производства мутантного белка, который предупреждает нормальные копии того же самого белка от выполнения их функции. В этом случае, нормальный белок KRP образует мультисубъединичный комплекс с комплексом циклин/CDK для инактивации киназной активности. Таким образом, экспрессирование мутантной версии KRP1 дикого типа будет препятствовать нормальным копиям KRP1 при ингибировании киназной активности циклин/CDK. Кроме того, при наличии высокой степени гомологии между 7 членами семейства KRP *Brassica* мутантный Krp1 будет вести себя как доминантно-негативный по отношению к другим членам семейства или возможно ко всем членам семейства. В конечном счете, циклин- и CDK-связывающие области KRPs являются достаточно консервативными у других видов растений. Таким образом, этот доминантно-негативный Krp1 будет предохранять киназные комплексы циклин/CDK от ингибирования эндогенными KRPs в других растениях, таких как кукуруза, пшеница, канола, соя, рис, хлопок, тополь и тому подобное.

[0194] Предварительно, доминантно-негативные мутанты были использованы для облегчения понимания различных путей трансдукции сигнала. В частности, доминантно-негативная ГТФаза Ras до настоящего времени являлась чаще всего используемым доминантно-негативным белком и играла главную роль в стратегии, применяемой для изучения других ГТФаз (Feig and Cooper, *Mol. Cell. Biol.* 8:3235-3243, 1988). Аналогично, доминантно-негативные версии CDKs использовали для определения роли CDKs в контроле клеточного цикла (van den Heuvel and Harlow, *Science* 262:2050-2054, 1993).

[0195] Семейство KIP/CIP SKIs отличается от семейства INK-ингибиторов по механизму, который они используют для ингибирования киназного комплекса. В то время как семейство INK связывается только с CDK, семейство CIP/KIP имеет две консервативные области, которые независимо друг от друга связывают циклин и CDK. Факт, что семейство CIP1/KIP1 SKIs и семейство KRP SKIs используют две соприкасающиеся области для связывания комплекса, делает их идеальным кандидатом доминантно-

негативной стратегии. Это происходит потому, что CDK–связывающая область может быть целевой для мутантов, которые уничтожают взаимодействие с CDK при поддержании в интактном состоянии области KRP1, которая связывает циклин.

5

[0196] В изобретении были клонированы молекулы KRP's канолы, *Brassica napus* (Bn) и KRP кресс-салата резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* (At) и подтверждена их способность ингибировать активность циклин/CDK. С этой целью разрабатывали анализ *in vitro* для тестирования способности различных KRP's ингибировать комплексы циклин/CDK. Циклин cyclinD2;1 *Arabidopsis* (AtcyclinD2;1) и CDKA *Arabidopsis* (AtCDKA) помечали эпитопной меткой и клонировали в вектор бакуловирусной системы экспрессии (baculovirus expression vector system) (BD Biosciences). AtCyclinD2;1 помечали FLAG-эпитопом (Sigma-Aldrich) на N-конце. Геммагглютининовый эпитоп (HA) помещали в рамку с 5'-конца AtCDKA. Образование белка AtcyclinD2;1 обеспечивали инфицированием клеток Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса AtcyclinD2;1. Образование AtCDKA обеспечивали инфицированием клеток Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса CDKA. Активный комплекс циклинD2;1/CDKA получали путем коинфицирования Sf9 *S. frugiperda* с помощью бакуловируса AtcyclinD2;1 плюс AtCDKA. Циклин, CDK и активный комплекс очищали и анализировали на киназную активность. Киназную активность определяли с помощью стандартного анализа киназной активности с помощью гистона H1 (H1) в качестве субстрата или с помощью рекомбинантного NtRb (Nakagami *et al.*, *Plant Cell* 14:1847-1857, 2002). Клетки насекомых, инфицированные Cyclin D2;1, не производили активный комплекс. Аналогично, клетки, инфицированные CDKA, не образовывали активную киназу. При инфицировании клеток с помощью как Atcyclin D2;1, так и AtCDKA, легко обнаруживали киназную активность. Активные комплексы циклин/CDK также могут быть очищены из экстрактов растительных тканей или из экстрактов культуры клеток тканей растений с использованием агарозных шариков p13suc1 (Wang *et.al*, *Plant J.* 15:501-510, 1998).

10

15

[0197] Krps конструировали для включения N-концевой полигистидиновой эпитопной метки (HIS тэг) субклонированием кДНК Krp внутри рамки считывания с кодирующей последовательностью для HIS-метки в вектор pET16b (Novagen). Экспрессию белка Krp дикого типа и мутантного Krp индуцировали в бактерии и впоследствии очищали с помощью Ni-агарозы в виде белка слитого с HIS-меткой.

40

45

[0198] Все протестированные (Bn)Krps *Brassica napus* (BnKRP1, BnKRP4, BnKRP5) были крайне эффективны в ингибировании комплекса циклинD2;1/CDKA. Во всех случаях ингибирование также было зависимым от дозы. Несколько других AtKrps *Arabidopsis* (AtKRP1, AtKRP2) также были эффективными ингибиторами.

50

[0199] Семейство CIP1/KIP1 CKIs использует две контактирующие области для связывания и ингибирования киназного комплекса. На основе этого способа связывания и ингибирования, изменение связывающей способности одной из двух этих областей потенциально могло дать в результате мутантный белок с доминантно-негативными характеристиками. Например, при приведении циклин-связывающей области в нефункциональное состояние мутантный белок все еще взаимодействовал бы через CDK-связывающую область с киназным комплексом через интактный домен. Аналогично, при приведении CDK-связывающей области в нефункциональное состояние мутантный белок все еще взаимодействовал бы через циклин-связывающую область с киназным комплексом.

[0200] Члены семейства ICK/KRP имеют ограниченную аминокислотную идентичность с семейством p27^{KIP1} млекопитающих. Такая идентичность ограничивается, самое большее, С-концевыми аминокислотами с 24 по 30. В действительности расположение циклин/CDK-связывающего домена p27^{KIP1} млекопитающих локализовано на N-конце белка, тогда как гомологичную область в Ktps растений обнаруживают, самое большее, в С-концевой части белка. (Смотри Фигуру 1, демонстрирующую выравнивание p27^{KIP1} и различных членов семейства Ktp). Циклин-связывающая область p27^{KIP1} млекопитающих не является консервативной у KRPs растений. Однако область, расположенная непосредственно выше предполагаемой CDK-связывающей области, является консервативной у всех растительных KRPs. Эта консервативная область, хотя не гомологична p27^{KIP1}, могла быть ответственной за взаимодействие с циклином. Замены нескольких аминокислотных остатков в этой предполагаемой циклин-связывающей области BnKRP1 (аминокислоты 125-138) разрушают связывание с циклином но не оказывают влияние на связывание с CDK. Эти данные дают основание предполагать, что в KRPs существуют две области подобные аналогу p27^{KIP1} млекопитающих, которые опосредуют взаимодействие с активным киназным комплексом. Интересно, что мутировавшая циклин-связывающая область не полностью разрушала ингибирование киназного комплекса, давая основание предположить, что CDK-связывающая область является в первую очередь ответственной за киназное ингибирование циклин/CDK.

[0201] При высокой степени гомологии между CDK-связывающими областями CKIs растений и млекопитающих кристаллическую структуру p27^{KIP1}, связанного с комплексом циклина/CDK2, использовали для облегчения идентификации контактных остатков p27^{KIP1}, которые связывают циклин и CDK (Russo *et al.*, *Nature* 382:325-331, 1996). Контактные остатки сравнивали с различными последовательностями KRP для определения действительно ли они являются консервативными в области, которая содержит наивысшую гомологию с p27^{KIP1}. В большинстве случаев на N-терминальном конце CDK-связывающей области находится мотив LysTyrAsnPheAspPhe (KYNFDF) (SEQ ID NO:588).

Эти остатки являются, большей частью, консервативными у p27. Они образуют β -складку, которая контактирует с CDK2 в комплексе циклина-CDK2.

5 [0202] Каждый из этих консервативных остатков заменяли на аланин и тестировали на их
способность ингибировать киназный комплекс. Интересно, что многие из этих мутаций
одиночных аминокислотных замен не оказывали влияние на способность ингибировать
10 киназный комплекс *in vitro*. Однако мутанты F151A Krp1 и Y149A Krp1 не снижали
активность SKI без нарушения связывания с киназным комплексом.

[0203] Поскольку боковые цепи как 151, так и 153 фенилаланинов контактируют с CDK и
15 F151A Krp1, то ингибирующую активность частично нарушали, как 151, так и 153
фенилаланины замещали аланином. Этот двойной мутант VnKrp1 (VnKrp1 F151A; F153A)
больше не ингибирует киназный комплекс, несмотря на его способность связывать
киназный комплекс через циклинD2;1. Не может быть исключено, что все еще может
20 существовать некоторое остаточное связывание этого мутанта с CDK-частью комплекса.

[0204] Тирозин 149 в Krp1 не является консервативным в p27^{KIP1}, однако в структурной
25 модели p27 млекопитающих похожий аминокислотный остаток находится в положении β -
складки, которая контактирует с CDK2. При замене на аланин (Krp1 Y149A)
ингибирующая активность частично нарушалась, давая основание предположить, что
этот аминокислотный остаток играет важную роль в связывании и/или ингибировании
CDKA. Таким образом, мутация этого положения (Y149A) в сочетании с двойным
30 мутантом F151A; F153A Krp1 порождала вариантный белок, который больше не
ингибировал киназный комплекс. Ожидают, что этот тройной мутант (VnKrp1 Y149A;
F151A; F153A) все еще сохранит связывание с киназным комплексом при неспособности
ингибировать киназную активность.

35 [0205] Как указывают выше, одиночные замены аминокислот как Y149A, так и F151A в
отдельности снижали способность мутантного полипептида VnKrp1 ингибировать
киназный комплекс. Ожидают, что двойной мутант Y149A; F151A VnKrp1 произведет
40 мутантный белок, который больше не ингибирует киназный комплекс.

[0206] С-концевая область у KRP1 до мотива KYNFDF (SEQ ID NO:58) также содержит
45 несколько аминокислот, которые являются консервативными у p27^{KIP1}. Эти
консервативные аминокислоты попарно заменяли на аланин. Во всех за исключением
одного случая, ингибирующая функция не была существенно повреждена. Исключение
составлял мутант E164A;W165A Krp1, который был гораздо более слабым ингибитором,
50 чем KRP1 дикого типа. В отдельном производном белка фенилаланины 151, 153 и E164

и W165 замещали аланином. Этот множественный мутант BnKrp1 также не ингибировал киназный комплекс.

5 [0207] Усечение полной CDK-связывающей области KRP1 также не было способно ингибировать киназный комплекс. Это не было удивительно, поскольку удаляли всю область ответственную за связывание CDK.

10 [0208] Результаты оценки различных мутантов BnKrp1 на биологическую активность суммируют в Таблице 2.

Таблица 2. Биологическая активность мутантов BnKrp1

| Номер конструкции | Мутация Krp | Связывание циклина | Связывание CDK | Ингибирование киназной активности | Доминантная негативность |
|-------------------|----------------------------------|--------------------|----------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 461 | BnKRP1 дикого типа | +++ | +++ | +++ | N/A ² |
| 586 | BnKRP1 K148A | ND ³ | ND | +++ | N/A |
| 587 | BnKRP1 Y149A | ND | ND | ++ | - |
| 588 | BnKRP1 N150A | ND | ND | +++ | N/A |
| 572 | BnKRP1 F151A | +++ | +/- | ++ | - |
| tbd | BnKRP1 D152A | ND | ND | ND | N/A |
| 573 | BnKRP1 F153A | ND | ND | +++ | N/A |
| 512 | BnKRP1 F151A; F153A | +++ | - | - ⁴ | ++++ |
| 598 | BnKRP1 Y149A; F151A; F153A | ND | ND | - | +++++ |
| 553 | BnKRP1 K157A; P158A | ND | ND | +++ | N/A |
| 554 | BnKRP1 R162A; Y163A | ND | ND | ++ | - |
| 555 | BnKRP1 E164A; W165A | ND | ND | - ⁴ | ++ |
| 574 | BnKRP1 F151A; F152A E164A; W165A | ++ | - | - ⁴ | ++ |
| 556 | BnKRP1 KL-AA | ND | ND | ND | ND |
| 547 | BnKRP1 SE-stop | ND | ND | +++ | N/A |

45 ¹Предохранение киназного комплекса от ингибирования BnKrp1 дикого типа.

²N/A означает не применимо.

50 ³ND означает не определяли.

⁴ кандидат не ингибировал киназную активность даже при использовании вплоть до 10-кратного минимального количества ингибитора дикого типа, необходимого для уничтожения киназной активности.

5

[0209] Как отмечали ранее, разрушение циклин-связывающего домена приводило к образованию мутантного белка Krp1, который все еще сохранял некоторую ингибирующую активность. Тем не менее, вероятно существуют другие аминокислоты в рамках предполагаемой циклин-связывающей области (аминокислоты 125-138), которые могут быть заменены для создания мутантного белка, который соответствует произвольным доминантно-негативным свойствам. Кроме того, при использовании аланина во всех замещениях в этих конкретных исследованиях, ожидают, что такое замещение идентифицированных аминокислотных остатков на другой неаланиновый аминокислотный остаток, который существенно отличается по одному или нескольким физическим свойствам (другие неконсервативные замещения) также принесет доминантно-негативный белок. В частности, ожидается, что замещение конкретного аминокислотного остатка на противоположно заряженную аминокислоту или на аминокислотный остаток с существенно отличными определяющими характеристиками, например, гидрофильного остатка на гидрофобный остаток и наоборот и тому подобное, в результате даст даже лучший доминантно-негативный кандидат.

10

15

20

25

30

35

[0210] Идеальный доминантно-негативный кандидат не будет ингибировать киназную активность даже при использовании вплоть до 10-кратного минимального количества ингибитора дикого типа, необходимого для уничтожения киназной активности. Некоторые мутанты соответствовали этому требованию (смотри Таблицу 2). Важность этой особенности заключается в факте, что при экспрессии *in vivo* уровни мутантного белка могут быть выше уровней, по сравнению с белком дикого типа.

40

[0211] Доминантно-негативные молекулы VnKrp1, идентифицированные в этом исследовании, эффективно предохраняют комплекс циклинD2;l/CDKA от ингибирования VnKRPI дикого типа. Аналогичная доминантно-негативная молекула производного Krp1 также защищает киназный комплекс от ингибирования молекулами KRP других видов, таких как кукуруза, соя, рис, хлопок, тополь, люцерна (смотри Пример 7).

45

Пример 5. Мутантные белки VnKrp1 конкурентно блокируют белок SKI дикого типа от ингибирования киназного комплекса.

50

[0212] Доминантно-негативные кандидаты, которые являются конкретно пригодными не будут ингибировать киназную активность даже при использовании вплоть до 10-кратного минимального количества ингибитора дикого типа, необходимого для уничтожения

киназной активности. Некоторые мутанты соответствовали этому требованию (смотри Таблицу 2, Фигуру 1 и Пример 2). Важность этой особенности заключается в факте, что при экспрессии *in vivo* уровни мутантного белка могут быть выше уровней, по сравнению с белком дикого типа и важно то, что мутантный белок не существенно ингибирует киназный комплекс фактически при любой концентрации.

[0213] Некоторые доминантно-негативные кандидаты анализировали на их способность предохранять комплекс cyclinD2;I/CDKA от BnKRPI дикого типа. Эксперименты по конкурентному связыванию выполняли как указывают ниже. Активный киназный комплекс cyclinD2;I/CDKA (7 мкг) преинкубировали с кандидатами доминантно-негативных мутантов BnKrp1 (5 мкг или 10 мкг) в течение 20 минут в 1-кратном киназном буфере. Затем комплекс анализировали на его киназную активность в отсутствие или после добавления BnKrp1 дикого типа (0,5 мкг, 1,0 мкг или 2 мкг) с помощью НН1 в качестве субстрата. Затем продукты киназных реакций подвергали разделению в SDS PAGE, как описывают в Примере 1, "Анализ киназной активности". Результаты выражали количественно с помощью PhosphorImager (Molecular Dynamics).

[0214] BnKrp1 F151A; F153A (BnKrp1#512) обладал способностью предохранять киназный комплекс от ингибирования BnKRPI дикого типа. 5 мкг F151A; F153A BnKrp1 восстанавливали вплоть до 40% киназной активности в присутствии 0,6 мкг KRP1 дикого типа. Этот доминантно-негативный эффект был дозозависимым, вплоть до 60% киназной активности восстанавливали при использовании 10 мкг F151A; F153A BnKrp1.

[0215] Мутант BnKrp1#555 (E164A; W165A) является представляющим интерес доминантно-негативным кандидатом, поскольку он также не в состоянии ингибировать киназную активность даже при использовании при 10 мкг на реакцию. В экспериментах по конкурентному связыванию этот мутант предохранял активный киназный комплекс от ингибирования KRP1 дикого типа, но только при восстановленной активности около 14% при использовании 5 мкг, и около 15% при использовании 10 мкг. Мутации BnKrp1#512 и BnKrp1#555 комбинировали в один мутантный белок, названный BnKrp1 #574 (F151A, F153A, E164A, W165A). Этот объединенный мутант не ингибировал киназную активность при его собственных количествах 5 мкг и 10 мкг. Этот объединенный мутант обладал способностью предохранять киназный комплекс от ингибирования BnKRPI дикого типа, но мог восстанавливать активность вплоть до 35%. Мутантный BnKrp1 #598 (Y149A; F151A; F153A) обладал способностью предохранять киназный комплекс от ингибирования BnKRPI дикого типа. 5 мкг F151A; F153A BnKrp1 восстанавливали вплоть до 55% киназной активности в присутствии 0,6 мкг KRP1 дикого типа. Этот доминантно-негативный эффект был дозозависимым, восстанавливали вплоть до 80% киназной активности при использовании 10 мкг Y149A;F151A;F153A BnKrp1.

[0216] Эти данные дают основание предположить, что оптимальной областью-мишенью для доминантно-негативного эффекта является область β -шпильки. Однако, точно не любой остаток может быть изменен. Несколько одиночных аминокислотных замен не были в состоянии создать доминантно-негативный Krp (смотри Пример 3), но на самом деле, изменение слишком многих консервативных остатков также давало в результате мутант, который удовлетворял большинству требованиям доминантно-негативного, за исключением того, что он, в конечном счете, не был в состоянии вести себя в качестве доминантно-негативного. AtKrp2 является наиболее близкородственным к BnKrp1 и AtKrp1. Мутант AtKrp2, где KYNFDF-мотив (SEQ IS NO:58) заменяли на KAAAAA (SEQ ID NO:59), обладал обнадеживающими свойствами доминантно-негативной молекулы Krp. При высоких концентрациях этот мутант BnKrp2 не был в состоянии ингибировать киназный комплекс как ожидали. Интересно, что этот мутант не был в состоянии предохранять киназу от ингибирования BnKRPI дикого типа.

[0217] Вкратце: F151A; F153A BnKrp1 блокировали KRP дикого типа от ингибирования киназы, E164A; W165A Krp1 не был достаточно хорошим при блокировании KRP дикого типа, тогда как BnKrp1 (Y149A;F151A;F153A) был наилучшим доминантно-негативным кандидатом в экспериментах по конкурентному связыванию *in vitro*. Двойной мутант BnKrp1 (Y149A;F151A) также, вероятно, обладает способностью предохранять киназный комплекс от ингибирования.

[0218] Как указывают выше, нарушение циклин-связывающего домена в результате давало мутантный белок Krp1, который сохранял некоторую ингибирующую активность. Тем не менее, вероятно существуют другие аминокислоты, в которые могут быть внесены изменения для создания мутантного белка, который удовлетворяет всем доминантно-негативным свойствам. Кроме того, аланин был аминокислотой выбора для всех замен. У многих из представленных мутантов замещение остатка на неконсервативную аминокислоту могло привести к еще лучшему доминантно-негативному кандидату.

Пример 6. F151A; F153A BnKrp1 и Y149A; F151A; F153A BnKrp1 ведут себя в качестве доминантно-негативных по отношению к другим членам семейства KRP *Brassica napus*.

[0219] Одной из суммарных целей доминантно-негативной стратегии являлось введение мутации в отдельного члена семейства KRP, который ведет себя как доминантно-негативный не только по отношению к своему партнеру дикого типа, но также по отношению ко всем членам своего семейства. Выравнивание семейства KRP CKIs *Brassica napus* и *Arabidopsis* демонстрирует высокую идентичность последовательности, которая располагается в критическом C-конце белка. Были представлены данные,

5 продемонстрированные выше, что консервативная область именно N-концевая на CDK-связывающем домене отвечает за связывание циклинов. Кроме того, некоторые группы представили данные двухгибридного скрининга, иллюстрирующие, что некоторые молекулы KRP имеют перекрывающуюся циклин-связывающую специфичность.

10 [0220] VnKRP4 отличается от VnKRP1 в β -шпильке. Phe151 является консервативным между VnKRP1 и VnKRP4, однако, F153 VnKRP1 является пролином в VnKRP4. Это не обязательная замена консервативной аминокислоты и дает основание предположить, что VnKRP4 может взаимодействовать с комплексом cyclin/CDKA иначе, чем VnKRP1. Однако уже было показано, что это положение внутри CDK-связывающего домена, по-видимому, не играет существенную роль в ингибировании циклин/CDKA (мутант VnKrp1#573, смотри Пример 1).

20 [0221] VnKRP4 клонировали с помощью следующих двух олигонуклеотидов для амплификации кДНК VnKrp4, добавляя сайт 5' *Bam*HI/*Nde*I и сайт рестрикции *Xho*I на 3'-конце VnKrp4-I (5'VnKrp4-I *Bam*HI/*Nde*I: GGATCCCATATGGGA AAATACATAAAG (SEQ ID NO:60) и 3' VnKrp4-I *Xho*I: CTCGAGCTAATCATCTACCTTCTT (SEQ ID NO:61). ПЦР-фрагмент амплифицировали из pTG#315 (TopoII VnKrp4-I) и субклонировали в сайт *Bam*HI и *Xho*I pET16b-5mус и секвенировали. Полученный в результате вектор VnKrp#605 содержал кДНК VnKRP4 дикого типа в рамке с тэгами 6XHis и мус. Белок экспрессировали и очищали как описывают в примере 1.

30 [0222] VnKrp4 является потенциальным ингибитором киназного комплекса AtcyclinD2;1/CDKA с IC₅₀ очень близким IC₅₀ VnKRP1 дикого типа. Эксперименты по конкурентному связыванию выполняли как описывают в Примере 4. В этом случае, оба VnKrp1#512 (F151A; F153A) и VnKrp1#598 (Y149A; F151A; F153A) обладали способностью 35 предохранять киназный комплекс от ингибирования VnKRP4 дикого типа. На основе этого наблюдения ожидают, что VnKrp1#512 и VnKrp1#598 вели бы себя как доминантно-негативные по отношению к большинству, если не ко всем, членам семейства VnKRP.

40 Пример 7. F151A; F153A VnKrpI и Y149A; F151A; F153A VnKrpI ведут себя в качестве доминантно-негативных по отношению к другим членам семейства KRP других видов растений.

45 [0223] Главная цель доминантно-негативной стратегии состояла во введении одной или нескольких мутаций в отдельного члена семейства KRP, который ведет себя как доминантно-негативный не только по отношению к своему члену семейства дикого типа, но также по отношению к членам семейства KRP в других видах растений. 50 Представляющие интерес хлебные злаки изобретения включают в себя, но не

ограничиваются, сою, канолу, кукурузу, пшеницу, люцерну, рис, овощные культуры, такие как томаты и даже деревья, например, тополь.

5 [0224] Нуклеотидную последовательность AtKRP1 (GenBank# U94772) использовали для выполнения поиска в tBLASTn для последовательностей KRP кукурузы, сои, тополя, табака и риса. Некоторые короткие ESTs демонстрировали высокую гомологию
10 ограниченную сyclin/CDK-связывающими доменами. Некоторые из этих коротких последовательностей выравнивали и показали консервативность этой области у различных видов растений (Смотри Фигуру 2).

15 [0225] У кукурузы, один конкретный элемент ввода, номер в Genbank #AY986792, содержал открытую рамку считывания 573 п.о., кодирующую полноразмерный белок с высокой степенью идентичности к нескольким членам семейства VnKRP. Этот белок называли ZmKRP4 но это не обязательно кукурузный гомолог VnKRP4 или AtKRP4.
20 Подобно VnKRP4, ZmKRP4 отличается от VnKRPI в β-шпильке. Phe 151 был консервативным между VnKRPI и VnKRP4 и ZmKRP4. Однако, F153 VnKRP1 был пролином как у VnKRP4, так и ZmKRP4. ZmKRP4 амплифицировали из кДНК, полученной из тотальной РНК, выделенной из зрелых метелок кукурузы. Последовательность олигонуклеотида собирали из номера #AY986792 в Genbank. ZmKRP4 5'*Bam*HI/NdeI:
25 GGATCCCATATGGGCAAGTACATGCGC (SEQ ID NO:62) и ZmKRP4 3'*Bam*HI: GGATCCTCAGTCTAGCTTCACCCA (SEQ ID NO:63). ПЦР-продукт субклонировали в TOPOII (Invitrogen) и секвенировали. Для продукта белка ZmKRP4 *Bam*HI-фрагмент 573 п.о. клонировали в сайт *Bam*HI вектора pET16b-5Myc и ориентацию вставки определяли рестриктазным картированием. Рекомбинантный белок получали как описано в Примере 4.

35 [0226] Аналогично у сои, один конкретный элемент ввода, номер в Genbank #AY439104, содержал открытую рамку считывания 499 п.о., кодирующую полноразмерный белок с высокой степенью идентичности к нескольким членам семейства VnKRP. Этот белок, названный GmKRP2-2, фактически является идентичным VnKRPI в рамках β-шпильки.
40 GmKRP2-2 амплифицировали из кДНК, полученной из тотальной РНК, выделенной из молодых развивающихся проростков сои. Олигонуклеотид конструировали из последовательности образца в Genbank#AY439104: GmKRP2-2 5'*Xho*I/NdeI:
45 ctcgaggacatatggagatggctcaggtaaggca (SEQ ID NO:64) и GmKRP2-1 3'*Xho*I: ctcgagtcaactgaacccactcgtatcgtcc (SEQ ID NO:65). ПЦР-продукт субклонировали в TOPOII (Invitrogen) и секвенировали. Для экспрессии белка GmKRP2-2 *Xho*I-фрагмент 499 п.о. клонировали в сайт *Xho*I вектора pET16b-5Myc и ориентацию вставки определяли рестриктазным картированием. Рекомбинантный белок получали как описано в Примере 4.
50

[0227] Как ZmKRP4, так и GmKrp2-2 анализировали на их способность ингибировать рекомбинантный киназный комплекс *suclnD2;l/CDKA*. ZmKRP4 являлся потенциальным ингибитором киназного комплекса с IC_{50} очень близким IC_{50} VnKRP1 дикого типа, 0,035 мкг. Аналогично, GmKrp2-2 также являлся потенциальным ингибитором киназного комплекса. Оба доминантно-негативных VnKrp1 (VnKrp1#512 и #598) обладали способностью блокировать ZmKRP4 и GmKrp2-2 от игибирования киназного комплекса. В каждом случае предохранение было сравнимым с предохранением, которое придавал VnKrp1 #512 по отношению к ингибированию VnKRPI. Этот результат иллюстрирует перекрестно-видовой эффект доминантно-негативного Krp изобретения.

[0228] Эксперименты также дают основание предполагать, что VnKrp#512 и VnKrp #598 будут обладать похожим эффектом в отношении других перекрестно-видовых членов семейства KRP, например, членов семейства KRP риса, пшеницы, сорго, сахарного тростника, сахарной свеклы и тому подобное. Молекулы KRP наряду с другими, могут быть клонированы, экспрессированы в виде рекомбинантных белков и оценены в аналогичных исследованиях для демонстрации того, что VnKrp1 #512 и VnKrp1 #598 обладают похожим эффектом в отношении этих членов семейства.

Пример 8. Параллельная мутация молекул KRP у других видов растений приводит к образованию доминантно-негативных молекул.

[0229] Остатки, замененные в VnKRPI для получения доминантно-негативного эффекта, являются консервативными в нескольких членах семейства KRPs в каноле, кукурузе, сое, рисе, люцерне, тополе, табаке и тому подобное. Замещение консервативных фенилаланинов на остатки аланина может быть выполнено на нескольких KRPs этих хлебных злаков и проанализировано на их способность вести себя в качестве доминантно-негативных молекул.

[0230] F151 и F153 являются консервативными в некоторых, но не во всех KRPs в каноле, сое, кукурузе. Мутация этих консервативных остатков в KRPs сои и кукурузы даст в результате похожую доминантно-негативную молекулу Krp.

Пример 9. Трансгенные растения канолы, экспрессирующие трансгенные конструкции, сконструированы для придания эмбрио-специфической и конститутивной экспрессии Krp1 (F151a;F153a).

[0231] На основе результатов *in vitro*, которые приводят в вышеприведенных примерах, экспрессию изобретения в культивируемых клетках растений или трансгенных растениях прогнозируют для повышения эндогенной киназной активности CDK. Такое повышение киназной активности CDK будет иметь положительное влияние (positive dring influence) на

клеточный цикл. Изобретение клонировали в экспрессионный вектор для растений. Экспрессионный вектор для растений содержит в себе нативный или ненативный промотор, присоединенный к вышеописанному изобретению. Промоторы могут располагаться в порядке от сильного, слабого, индуцибельного ткане-специфического, органоспецифического и специфически связанного с развитием.

[0232] Эквивалент мутаций BnKrp1 (F151A; F153A) вводили в AtKRPI с помощью следующих олигонуклеотидов: "QC AtKrp1cds F173A;F175A-coding" 5'-TTCAAGAAGAAGTACAATGCCGATGCCGAGAAGGAGAAGCCATTA-3' (SEQ ID NO:66) и "QC AtKrp1cds F173A;F175A-noncod" 5'-TTATGGCTTCTCCTTCTGGGCA TCGGCATTGTACTTCTTCTTGAA-3' (SEQ ID NO:67). AtKrp1 #359 использовали в качестве матрицы с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза Stratagene Quikchange Site Directed Mutagenesis Kit. F173A; F175A (pTG356) AtKrp1 подтверждали секвенированием. Промотор LFAH12 встраивали с 5'-конца мутанта AtKrp1 (F173A; F175A) в pTG356 в два этапа. Первый, *Sall* и *PstI* LFAH12 промотор из pCAMBIA 2381Z (pTG 254) субклонировали в pBluescript II (Stratagene) в сайты *Sall* и *PstI*, что приводит к образованию pTG 357. Затем LFAH12 промотор вырезали из pTG 357 с помощью *PstI* и *BamHI* и встраивали в pTG 356, что приводит к образованию pTG 361. Наконец pTG 361 обрабатывали с помощью *KpnI* и *NotI*, pLAY112 обрабатывали с помощью *NotI* и *BglII* (mas3'utr компонент) и pCGN 1547 обрабатывали с помощью *KpnI* и *BamHI* и выполняли тройное лигирование. Это приводило к получению кассеты LFAH12-At ICK1 cds DN-mas 3' utr (pTG 369).

[0233] Экспрессионный вектор для растений, содержащий BnKrp1(F151 A; F153A) под контролем конститутивного промотора 35S конструировали следующим образом. Фрагмент *BamHI/XhoI*, содержащий кодирующую последовательность BnKrp1(F151A; F153A)cds клонировали в pTG 271 (35S/TOPO Blunt) с использованием тех же самых сайтов. Полученную конструкцию (pTG529) разрезали с помощью *KpnI* и *XbaI*. pLAY112 разрезали с помощью *XbaI* и *HindIII* и pCGN1547 разрезали с помощью *KpnI* и *HindIII* и выполняли тройное лигирование. Это приводило к получению кассеты 35S-BnKrp1 (F151A;F153A)-mas3 utr (pTG533).

Трансформация канолы (*Brassica napus*)

[0234] Разновидность канолы двойной гаплоид DH12075 трансформировали с помощью LFAH-12 AtKrp1 (F173A; F175A) и трансгенной экспрессионной конструкции 35-S BnKrp1 (F151A; F153A) (также упоминаемой в собирательном значении в этом Примере в виде "трансгенные экспрессионные конструкции мутанта Krp1") с помощью метода

трансформации, опосредованного *Agrobacterium* на основе метода Maloney *et al.* (Maloney *et al.*, *Plant Cell Reports* 8:238, 1989).

5 [0235] Стерилизованные семена проращивали на 1/2 среды MS (Murashige & Skoog) с 1% сахарозы в чашках Петри 15 X 60 мм в течение 5 дней при приблизительно от 40 до приблизительно 60 семян на чашку. Всего проращивали приблизительно 1500 семян для каждой конструкции для трансформации. Семена не полностью погружали в среду для прорастания. Проросшие всходы выращивали в помещении для культуры тканей при 10 25°C на 16 часовом световом/8 часовом темновом цикле.

[0236] Семядоли срезали прямо над апикальной меристемой без получения любой меристемной ткани. Это делали осторожным захватыванием обоих черешков с помощью 15 пинцета непосредственно выше области апикальной меристемы. Соблюдали осторожность, чтобы не раздробить черешки пинцетом.

20 С помощью кончиков пинцета в качестве направляющего приспособления черешки срезали с помощью скальпеля N 12 с заостренным лезвием. Семядоли высвобождали на пластину 15мм X 100мм со средой для сокультивирования. Без труда отделяли правильно отрезанные семядоли. Если семядоли срезаны неправильно, то существовал 25 очень хороший шанс, что получались меристемные ткани и такие семядоли не использовались. Каждая пластина содержала приблизительно 20 семядолей. Эксплантаты семядолей инокулировали с помощью *Agrobacterium* после каждых нескольких пластин, которые готовили во избежание увядания, которое имело бы 30 отрицательное воздействие на следующих стадиях процесса схемы.

[0237] Экспрессионные конструкции мутантного трансгена Kgr1 вводили электропорацией 35 в *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium*, содержащий экспрессионные конструкции мутантного трансгена Kgr1, выращивали на среде АВ с подходящими антибиотиками в течение 2 дней при встряхивании при 28°C. Для инокуляции эксплантатов семядолей добавляли небольшой объем культуры *Agrobacterium* в чашки Петри 10 мм x 35 мм. 40 Черешок каждого экспланта погружали в культуру *Agrobacterium* и отрезанный конец помещали в среду для сокультивирования в чашку Петри. Чашки закрывали и помещали в помещение для культуры тканей при 25°C при 16 часовом световом/8 часовом темновом цикле в течение 3 дней.

45 [0238] Через 3 дня экспланты в наборах из десяти переносили в свежие чашки Петри 25 мм x 100 мм, содержащие среду для индукции проростков. Эта среда содержала селективный агент (20 мг/л канамицина) и гормон (4,5 мг/л BA). Переносили только 50 здоровые на вид экспланты. Экспланты держали на среде для индукции проростков в

течение от 14 до 21 дней. В этот период могут наблюдаться зеленые каллусы и возможно некоторое развитие проростков и некоторые нетрансформированные ростки. Нетрансформированные ростки легко распознавали по их белому и пурпурному цвету. Чувствительные к канамицину ростки удаляли путем их срезания и все на вид здоровые каллусы переносили в свежие чашки со средой для индукции проростков. Экспланты выдерживали на этих чашках в течение еще от 14 до 21 дней.

[0239] Через 2 - 3 недели, ростки, которые были темно-зеленого цвета, переносили в чашки, содержащие среду для элонгации проростков. Эта среда содержала селективный агент (20 мг/л канамицина) но не содержала никаких гормонов. Пять проростков помещали в каждую чашку. Чашки накрывали и возвращали в помещение для культуры тканей. Трансформированные ростки, которые выглядели стекловидными, переносили на среду для элонгации корней, содержащую флороглюцин (150 мг/л). Ростки, которые стали здоровыми и зелеными, возвращали в чашки со средой для элонгации проростков. Повторный перенос стекловидных проростков на свежие чашки с той же самой средой требовался в некоторых случаях для получения нормально выглядящих проростков.

[0240] Ростки с нормальной морфологией переносили в банки для детского питания на 4 унции со средой для выращивания корней, содержащей 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты. Любой избыточный каллус отрезали при переносе проростков в банки. Ростки могли быть поддержаны в банках неограниченно путем их переноса в свежие банки, содержащие 0,2 мг/л индолилмасляной кислоты, приблизительно каждые 6 недель.

[0241] Как только сформировалась хорошая корневая система, ростки T_0 поколения удаляли из банок, агар с корнями удаляли и растеньице переносили в почву для горшечных культур. Каждое самостоятельное T_0 -растеньице представляет собой самостоятельный экземпляр инсерции трансгена в геном канолы и называется как объект. Прозрачную крышку помещали над растеньицем на несколько дней, давая возможность растению акклиматизироваться к новой окружающей среде. Как только растение отвердело, крышку снимали. Затем T_0 трансгенные объекты выращивали в оранжерее до полного созревания и собирали T_1 семена.

Исследование T_0 объектов

[0242] Число инсерционных сайтов в трансгенном локусе определяли в каждом объекте Саузерн-анализом. Экспрессию трансгена мутанта *Krp1* в объектах T_0 подтверждали Нозерн-анализом или ПЦР с обратной транскриптазой по конечной точке. Данные экспрессии трансгена мутанта *Krp1* получали для одного момента времени в развитии зародыша, через 19 дней после опыления (DAP). Из этих данных делали заключение, что

5 в этот период времени развития, промотор LFAH 12 регулировал высокие уровни мРНК AtKrp1 (F173A; F175A). Экспрессию трансгена 35S BnKrp1 (F151A; F153A) регистрировали в пробах листьев, которые обладали от умеренного до высокого уровней экспрессии во многих объектах. Данные экспрессии продемонстрировали, что оба промотора были функциональными в управлении экспрессией трансгена мутанта Krp1 трансгенных растений канолы.

10 [0243] Киназная активность также может быть измерена для определения эффекта экспрессии белка мутанта Krp1 на эндогенную киназную активность Cyclin-CDK. Эквивалентные количества экстрактов белка тканей или клеток трансгенных и нетрансгенных растений обогащали CDK с помощью смолы pI3Sucl (Upstate, Chicago, IL) и проводили анализы гистоновых киназ как описывают в примере 4 или Wang *et al.*, *Plant J.* 15:501-510, 1998. Продукты киназных реакций разделяли в SDS-PAGE и фосфорилирование NH1 определяли количественно с помощью PhosphorImager.

20 [0244] T₀ растения развивались успешно в случае обоих экспрессионных конструкциях трансгенного мутанта Krp1. Анализируемые конструкции включали в себя (a) LFAH12/AtKrp1(F173A; F175A); (b) 35S BnKrp1(F151A; F153A).

25 Пример 10. Экспрессия *in vivo* ускоряет прорастание и начальную стадию роста.

30 [0245] Экспрессия мутантных белков изобретения в трансгенных растениях будет оказывать влияние путем повышения киназной активности cyclin-CDK. Это повышение активности будет иметь положительное сильное влияние на клеточный цикл, который в конечном счете приведет к увеличенному размеру органов. У растений снижение уровней экспрессии Krp1 путем подавления экспрессии эндогенного гена Krp в зародыше с помощью результатов подхода для инвертированных повторов приводит к увеличенному размеру семян и повышенной урожайности. Кроме эффекта на урожай увеличенный размер семян может дать в результате повышенную мощность или посевной материал. Более крупные семена содержат в себе большее количество запасного белка и запасы крахмала, которые должны утилизироваться во время прорастания роста семян. Это может привести к более раннему прорастанию и более быстрой начальной стадии роста. Раннее прорастание и быстрый рост на начальной стадии являются полезными агрономическими качествами, поскольку они приводят к более быстрому образованию урожая. Это повышает шансы на успешный урожай путем уменьшения окна уязвимости к резким условиям окружающей среды и тому подобное, которые могут повредить или уничтожить урожай перед образованием.

[0246] Повышенный темп роста и развития наблюдали на выращенных в оранжерее проростках трансгенных растений канолы, трансформированных доминантно-негативной экспрессионной конструкцией (pTG369) AtKrp1 (F173A; F175A) описанной в примере 9. Двадцать четыре семени каждого из пятнадцати независимых объектов трансформации доминантно-негативной экспрессирующей конструкции AtKrp1 (F173A;F175A) высаживали в торфяные таблетки джиффи на подносах и проращивали в оранжерее. Двадцать четыре семени каждого из пятнадцати независимых объектов, трансформированных геном KRP1 дикого типа также под контролем промотора LFAH12 высаживали параллельно. Кроме того в это же самое время высаживали нетрансформированную родительскую разновидность канолы DH12075 и всего 135 трансгенных объектов, трансформированных любой из девяти неродственных трансгенных конструкций.

[0247] Через три недели роста все проростки переносили в поле, для выращивания для получения семян. Каждый набор из двадцати четырех ростков на каждое событие выращивали в виде индивидуальной деланки. При пересадке между деланками существовали легко обнаруживаемые различия в росте среди проростков. Через всю популяцию проростков для всех трансгенных конструкций размер варьировал от 1 дюйма высотой до приблизительно от 4 до 5 дюймов высотой. Прогресс в развитии также варьировал, изменяющийся от нескольких проростков, имеющих только существующие семядоли, до проростков с несколькими настоящими листочками. Деланки с нетрансформированной родительской формой располагаются в середине этого ряда. Различия в трансгенных деланках были специфическим для конструкции. Большинство деланок в поле, которые содержали проростки в верхнем пределе диапазона размера и развития, были деланками, содержащими растения, трансформированные доминантно-негативной экспрессирующей конструкцией AtKrp1 (F173A; F175A) (pTG369). Другие конструкции не демонстрировали этот признак на большинстве деланок, демонстрирующих рост и развитие, сопоставимые нетрансформированной родительской формой или меньшие. Эти результаты указывают на то, что экспрессия трансгена Krp доминантно-негативного мутанта придает свойство повышенной скорости начальной стадии роста и ускоренного темпа развития.

[0248] Дополнительные характеристики, которые должны быть проконтролированы, включают в себя, например, продолжительность до всходов/продолжительность прорастания, время появления семядолей, размер семядоли, время появления первого настоящего листа и появление второго настоящего листочка. Диаметр розетки также может быть определен у трансгенных и нетрансгенных растений. Другие признаки также могут быть определены у трансгенных и нетрансгенных растений и включают в себя например, время появления бутона и размер стебля бутона, конечный размер главной

кисти, время до появления первого цветка, определение времени появления первого стручка и тому подобное

5 Пример 11. Экспрессия *in vivo* дает лучшее образование корней.

10 [0249] Семена канолы являются очень мелкими, требуют относительно высокой влажности для прорастания и должны выращиваться близко к поверхности почвы для обеспечения максимальной силы проростка. Небольшие семена и мелкие растения делают урожай уязвимым к абиотическим стрессам, таким как сухая почва и затопление. Убиквитарная экспрессия или экспрессия на раннем этапе развития корней мутантных полипептидов изобретения под контролем различных промоторов, дала бы ускоренный 15 рост и развитие корней. Усиленное клеточное деление во время развития корней окажет благоприятное влияние на силу роста путем быстрого образования крепкого основания корня и возможно большего основания корня, чем у нетрансгенного контрольного растения. Размер корневой системы трансгенных растений может быть сравнен с 20 нетрансгенным растением.

25 Пример 12. Оценка эффекта экспрессии трансгена *AtKrp1* (F173A:F175A) во время развития зародыша в урожае канолы в параллельных испытаниях в полевых условиях.

30 [0250] В этом примере растения трансгенной канолы, содержащие трансген *Krp1*(F173A;F175A) *Arabidopsis* под контролем эмбрио-специфического промотора LFAN 12 (pTG369) тестировали в полевых условиях.

Продвижение трансгенных объектов AtKrp1(F173A;F175A) к полевым условиям.

35 [0251] Объекты T₀ отбирали для получения в полевых условиях на основе сочетания экспрессии трансгена и числа трансгенных инсерционных локусов. Объекты с подтвержденной трансгенной экспрессией и одиночным локусом инсерции трансгена включали в первоочередной состав для переноса в полевые испытания. В некоторых 40 случаях отбирали события с множественными инсерционными локусами при наличии множественных генов, которые давали высокий суммарный уровень экспрессии трансгена вследствие дозы гена.

45 [0252] Семена T₁ отобранных объектов выращивали в виде расщепляющихся популяций T₁ на полевых участках. Каждое событие высаживали в два ряда, двадцать четыре растения на участок. Для объектов с одиночным локусом вставки трансгена, выделение трансгена среди двадцати четырех растений T₁ произвело бы распределение 50 приблизительно шесть «нулевых» растений, не содержащих трансген, двенадцать гетерозиготных растений и шесть гомозиготных растений. Каждое растение T₁

индивидуально помещали в мешок перед цветением для предупреждения перекрестного скрещивания. Урожай семян T_2 от каждого из двадцати четырех растений T_1 собирали отдельно.

5

[0253] Семенные фонды T_2 использовали чтобы идентифицировать, которое из двадцати четырех родительских растений T_1 было нулевым, гетерозиготным или гомозиготным. Приблизительно тридцать семян T_2 от каждого из растений T_1 проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри с раствором, содержащим антибиотик G418, аналог канамицина. Поскольку растения котрансформировали с помощью гена устойчивости *nrpII resistance* в качестве селективного маркера, то только такие семена, несущие трансген, могли бы прорасти и продолжить рост. Если все семена на чашке оказались чувствительными к G418, тогда T_1 родитель идентифицировали как нулевую линию. Если все семена на чашке были устойчивыми к G418, тогда T_1 родитель идентифицировали как гомозиготную линию. Если приблизительно одна четвертая семян на чашке была чувствительной, а остальные устойчивыми, то T_1 родитель идентифицировали как гетерозиготную линию. Семена T_2 от гомозиготных родителей T_1 того же самого объекта трансформации ссыпали для создания гомозиготного семенного фонда для полевых испытаний. Семена T_2 от нулевых T_1 родителей того же самого события трансформации ссыпали для создания семенного фонда нулевого потомства для полевых испытаний.

10

15

20

25

Планирование полевых испытаний

30

[0254] Эффект трансгена AtKrp1(F173A;F175A) на выход характерных признаков на трансгенных линиях канолы оценивали сравнением каждой трансгенной линии непосредственно с ее нулевым двойником в полевых условиях в крупных повторяющихся испытаниях. Поскольку нулевой двойник возникает из расщепления трансгена T_1 поколения, то нулевые и гомозиготные двойники являются почти идентичными генетически. Единственное существенное отличие состоит в наличии или отсутствии трансгена AtKrp1(F173A;F175A). Эта близкая генетическая идентичность делает нулевого двойника оптимальным контролем для оценки эффекта трансгена AtKrp1(F173A;F175A). В качестве основной задачи испытания было сравнение трансгенной линии результата события с ее нулевым результатом расщепления, выбирали мелко-деляночную схему опыта. Такая схема дает высокий уровень оценки взаимодействия между трансгенными и нетрансгенными подчиненными элементами и различий между трансгенными подделянками между объектами (взаимодействие подделянки и основной делянки) и нижний уровень оценки различий между общими объектами или основной делянки.

35

40

45

50

5 [0255] Полевые испытания проводили на многочисленных участках провинций Прерий для оценки урожайности фенотипов в диапазоне условий окружающей среды, при
10 которых канола типично растет. На всех участках каждый трансгенный объект физически располагали попарно с его нулевым двойником на смежном участке. Каждую пару
15 участков гомозиготных и нулевых двойников повторяли четыре раза на каждом опытном участке. Расположение четырех параллельных пар участков в каждом опыте распределяли случайным образом в каждом месте испытания. Участки составляли 1,6 м
на 6 м и засеивали при плотности приблизительно 142 семени на квадратный метр. Растения выращивали до созревания с помощью стандартных агрономических приемов
типичных для коммерческого производства канолы.

20 Пример 13. Повышенная урожайность у трансгенной канолы, экспрессирующей AtKrp1 (F173A;F175 A) во время эмбрионального развития, с помощью эмбрио-специфических промоторов.

25 [0256] Урожай со всех участков в каждом местонахождении полевых испытаний убирали по отдельности с помощью комбайна. Данные по урожайности семян собирали в виде суммарной массы семян, приведенной в соответствие с содержанием влажности для
30 каждого участка. Для каждого трансгенного объекта в каждом испытании сравнивали среднее значение валового урожая из четырех параллельных участков каждой гомозиготной линии со средним значением валового урожая четырех параллельных
35 участков ассоциированной линии нулевых двойников. Это сравнение использовали для оценки эффекта трансгена AtKrp1(F173A;F175A) на общий урожай семян. Результаты каждого из многочисленных опытных участков объединяли для получения совокупности анализов испытаний эффекта трансгена AtKrp1(F173A;F175A) на общий урожай семян. Статистический анализ дисперсии в каждом опытном участке допускал распределение порога значимости ($P = 0,05$) для различий общего выхода зерна между гомозиготными трансгенными линиями и их нулевыми двойниками.

40 [0257] Трансгенные линии канолы AtKrp1(F173A;F175A), которые показывали статистически существенное повышение общего выхода зерна, суммируют в Таблице 3. Эти результаты демонстрируют, что сверхэкспрессия AtKrp1(F173A;F175A) с помощью эмбрио-специфического промотора (LFAH12) приводит к повышенному урожаю семян.

45 **Таблица 3.** Изменение общего выхода семян гомозиготных растений AtKrp1 (F173A;F175A) относительно их нулевых двойников. Все значения являются статистически достоверными ($P = 0,05$)

| Объект | Промотор | Трансген | % повышения урожая |
|---------|----------|---------------------|--------------------|
| TG39-2 | LFAN12 | AtKrp1(F173A;F175A) | 13,0 |
| TG39-26 | LFAN12 | AtKrp1(F173A;F175A) | 18,6 |
| TG39-32 | LFAN12 | AtKrp1(F173A;F175A) | 12,0 |

[0258] Понятно, что примеры и варианты воплощения изобретения, описанные здесь, приводят только в целях иллюстрации и что различные модификации или изменения в их свете будут наводить на мысль специалистов в данной области и должны быть включены в рамках духа и сферы действия этой заявки и объема приложенной формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные здесь, включены сюда посредством ссылки в их полноте для всех целей.

Формула изобретения

1. Изолированный, мутантный полипептид СКІ (ингибитор циклин-зависимой киназы, или CDK) растений, содержащий аминокислотную последовательность СКІ, имеющую, по меньшей мере, одну модификацию относительно полипептида СКІ дикого типа растений, указанный полипептид СКІ дикого типа, содержащий (а) циклин-связывающую область для придания аффинности связывания для циклина и (б) CDK-связывающую область для придания аффинности связывания для CDK; где, по меньшей мере, одна указанная модификация находится внутри CDK-связывающей области, соответствующей аминокислотам 145-168 *Brassica napus* KRP1 (BnKRP1) для придания относительно полипептида СКІ дикого типа модифицированной аффинности связывания мутантного полипептида СКІ для CDK; где, по меньшей мере, одна указанная модификация выбрана из группы, включающей аминокислотные замены, вставки (инсерции) и делеции по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа; где мутантный полипептид СКІ существенно сохраняет относительно полипептида СКІ дикого типа аффинность связывания для циклина; и где мутантный полипептид СКІ может конкурировать с указанным СКІ дикого типа за связывание с CDK-связывающей областью.
2. Мутантный полипептид СКІ растений по п.1, где указанный полипептид СКІ дикого типа растений является членом семейства KIP-родственных белков (KRP).
3. Мутантный полипептид СКІ растений по п.2, где указанный член семейства KRP означает полипептид СКІ *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, кукурузы, пшеницы, риса, люцерны, хлопка или тополя.
4. Мутантный полипептид СКІ растений по п.2, где указанный член семейства KRP означает полипептид KRP1 *Arabidopsis* или *Brassica*.
5. Мутантный полипептид СКІ растений по п.2, где, по меньшей мере, одна указанная модификация находится внутри области, соответствующей аминокислотам 145-168 *Brassica* KRP1 (BnKRP1).
6. Мутантный полипептид СКІ растений по п.5, который содержит, по меньшей мере, две модификации внутри области, соответствующей аминокислотам 145-168 KRP1 *Brassica* (BnKRP1).
7. Мутантный полипептид СКІ растений по п.5, где, по меньшей мере, одна

указанная модификация содержит замену аминокислоты.

8. Мутантный полипептид СКІ растений по п.7, где замена аминокислоты означает замену неаланина на аланин, неконсервативную замену.

9. Мутантный полипептид СКІ растений по п.7, который содержит, по меньшей мере, две аминокислотные замены, причем каждая аминокислотная замена находится в положении, независимо выбранном из группы, состоящей из:

(a) положения, соответствующего аминокислоте 145 VnKRP1;

(b) положения, соответствующего аминокислоте 149 VnKRP1;

(c) положения, соответствующего аминокислоте 151 VnKRP1;

(d) положения, соответствующего аминокислоте 153 VnKRP1;

(e) положения, соответствующего аминокислоте 164 VnKRP1; и

(f) положения, соответствующего аминокислоте 165 VnKRP1.

10. Мутантный полипептид СКІ растений по п.9, где одна или несколько и произвольно все из, по меньшей мере, двух аминокислотных замен являются заменами (заменой) неаланина на аланин или аминокислотной неконсервативной заменой (неконсервативными заменами).

11. Мутантный полипептид СКІ растений по п.5, где, по меньшей мере, одна указанная модификация находится внутри KYNFDF-мотива.

12. Мутантный полипептид СКІ растений по п.11, в котором указанные, по меньшей мере, две модификации внутри KYNFDF-мотива содержат замены аминокислот в положениях, соответствующих аминокислотам 151 и 153 VnKRP1.

13. Мутантный полипептид СКІ растений по п.12, где, по меньшей мере, одна из аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотам 151 и 153 VnKRP1, означает замену неаланина на аланин или означает замену аминокислоты на противоположно заряженную аминокислоту.

14. Мутантный полипептид СКІ растений по п.12, где каждая из аминокислотных замен в положениях, соответствующих аминокислотам 151 и 153 VnKRP1, означает замену неаланина на аланин или означает замену аминокислоты на противоположно заряженную аминокислоту.

15. Мутантный полипептид СКІ растений по любому из пп.13 или 14, дополнительно содержащий аминокислотную замену в положении, соответствующем аминокислоте 149 VnKRP1.

16. Мутантный полипептид СКІ растений по п.15, где аминокислотная замена в положении, соответствующем аминокислоте 149 VnKRP1, означает замену неаланина на аланин или неконсервативную замену.

17. Мутантный полипептид СКІ растений по п.17, дополнительно содержащий аминокислотную замену, по меньшей мере, в одном из

(a) положений, соответствующих аминокислоте 164 VnKRP1 и

(b) положений, соответствующих аминокислоте 165 VnKRP1.

18. Мутантный полипептид СКІ растений по п.17, где аминокислотная замена, по меньшей мере, в одном из (a) и (b) или каждом (a) и (b) означает замену неаланина на аланин или неконсервативную замену.

19. Мутантный полипептид СКІ растений по п.5, который является мутантным полипептидом VnKRP1.

20. Мутантный полипептид VnKRP1 по п.19, который означает

(1) VnKRP1 F151A; F153A;

(2) VnKRP1 Y149A; F151A; F153A;

(3) VnKRP1 E164A; W165A; или

(4) BnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.

21. Мутантный полипептид СКІ по п.1, где, по меньшей мере, одна указанная модификация включает укорачивание CDK-связывающей области.

22. Мутантный полипептид СКІ по п.21, который является мутантным полипептидом BnKRP1.

23. Рекombинантная нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид СКІ по п.1.

24. Экспрессионный вектор, содержащий репликон и рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.23.

25. Экспрессионный вектор по п.24, который представляет собой экспрессионный вектор, дополнительно содержащий промоторную область, функционально присоединенную к рекомбинантной нуклеиновой кислоте.

26. Экспрессионный вектор по п.25, где промоторная область является функциональной в растительной клетке.

27. Экспрессионный вектор по п.26, где промоторная область содержит 35S-промотор CaMV или LFAN12-промотор.

28. Экспрессионный вектор по п.25, где промоторная область является транскрипционно активной в тканеспецифической и/или органоспецифической манере.

29. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п.23.

30. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.24.

31. Способ изготовления мутантного полипептида СКІ, содержащий: культивирование клетки-хозяина по п.29 или 30 в условиях, подходящих для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид СК-I.

32. Способ по п.31, дополнительно содержащий восстановление указанного мутантного полипептида СКІ.

33. Трансгенное растение, содержащее трансген, кодирующий мутантный полипептид СКІ, указанное трансгенное растение, экспрессирующее полипептид СКІ дикого типа, указанный полипептид СКІ дикого типа, содержащий (а) циклин-связывающую область, придающую аффинность связывания для циклина, и (б) CDK-связывающую область, придающую аффинность связывания для CDK, где указанный мутантный полипептид СКІ содержит аминокислотную последовательность СКІ, имеющую, по меньшей мере, одну модификацию относительно ссылочного полипептида СКІ, указанный ссылочный полипептид СКІ выбран из группы, состоящей из

(1) растительного полипептида СКІ дикого типа, экспрессированного трансгенным растением, и

(2) полипептида СКІ дикого типа гетерологичного (1) и способного обеспечить функционирование СКІ дикого типа внутри клетки трансгенного растения, существенно эквивалентное функционированию СКІ дикого типа (1);

где, по меньшей мере, одна указанная модификация находится внутри CDK-связывающей области, соответствующей аминокислотам 145-168 Brassica napus KRP1 (BnKRP1), для придания относительно ссылочного полипептида СКІ модифицированной аффинности связывания мутантного полипептида СКІ с CDK,

где, по меньшей мере, одна указанная модификация выбрана из группы, включающей аминокислотные замены, вставки (инсерции) и делеции по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа;

и где мутантный полипептид СКІ существенно поддерживает относительно

ссылочного полипептида SKI аффинность связывания с циклином; и

где мутантный полипептид SKI может конкурировать с указанным SKI типа за связывание с CDK-связывающей областью.

5 34. Трансгенное растение по п.33, которое является однодольным растением или двудольным растением.

35. Трансгенное растение по п.33, где указанный ссылочный полипептид SKI является членом семейства KRP-родственных белков (KRP).

10 36. Трансгенное растение по п.35, где указанный член семейства KRP означает полипептид SKI *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, кукурузы, пшеницы, риса, люцерны, хлопка или SKI полипептид тополя.

37. Трансгенное растение по п.36, где указанный член семейства KRP означает полипептид KRP1.

15 38. Трансгенное растение по п.35, где, по меньшей мере, одна модификация или, по меньшей мере, две модификации находятся внутри области, соответствующей аминокислотам 145-168 KRP1 *Brassica* (BnKRP1).

39. Трансгенное растение по п.38, где, по меньшей мере, одна модификация или, по меньшей мере, две модификации содержат аминокислотную замену.

20 40. Трансгенное растение по п.39, где аминокислотная замена означает замену неаланина на аланин или замену аминокислоты на противоположно заряженную аминокислоту.

41. Трансгенное растение по п.39, где, по меньшей мере, одна модификация или, по меньшей мере, две модификации находятся внутри KYNFDF-мотива.

25 42. Трансгенное растение по п.41, где, по меньшей мере, одна модификация или, по меньшей мере, две модификации внутри KYNFDF-мотива содержат замены аминокислот в положениях, соответствующих аминокислотам 151 и 153 BnKRP1.

30 43. Трансгенное растение по п.42, где, по меньшей мере, одна из аминокислотных замен или каждая аминокислотная замена в положениях, соответствующих аминокислотам 151 и 153 BnKRP1, означает замену неаланина на аланин или противоположно заряженную аминокислоту.

35 44. Трансгенное растение по п.43, где мутантный полипептид SKI дополнительно содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем аминокислоте 149 BnKRP1.

45. Трансгенное растение по п.44, где аминокислотная замена в положении, соответствующем аминокислоте 149 BnKRP1, означает замену неаланина на аланин или неконсервативную замену.

40 46. Трансгенное растение по пп.44-45, где мутантный полипептид SKI дополнительно содержит аминокислотную замену, по меньшей мере, в одном или каждом из

(a) положений, соответствующих аминокислоте 164 BnKRP1, и

(b) положений, соответствующих аминокислоте 165 BnKRP1.

45 47. Трансгенное растение по п.46, где аминокислотная замена, по меньшей мере, в одном из (a) и (b) или, по меньшей мере, каждым (a) и (b) означает замену неаланина на аланин или неконсервативную замену.

50 48. Трансгенное растение по п.46, где ссылочный полипептид SKI означает полипептид BnKRP1.

49. Трансгенное растение по п.48, где мутантный полипептид SKI означает

(1) BnKRP1 F151A; F153A;

(2) BnKRP1 Y149A; F151A; F153A;

(3) VnKRP1 E164A; W165A; или

(4) VnKRP1 F151A; F153A; E164A; W165A.

50. Трансгенное растение по п.33, где, по меньшей мере, одна модификация содержит укорачивание CDK-связывающей области.

51. Трансгенное растение по п.50, где ссылочный полипептид SKI означает полипептид VnKRP1.

52. Трансгенное растение по п.33, которое выбрано из группы, состоящей из *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, кукурузы, пшеницы, риса, люцерны, хлопка, тополя и камелины.

53. Трансгенное растение по п.52, где ссылочный полипептид SKI означает полипептид SKI *Arabidopsis thaliana*.

54. Способ получения трансгенного растения по любому из пп.38-53, содержащий введение в растение вектора, содержащего трансген, кодирующий мутантный полипептид SKI.

55. Способ модуляции клеточного деления в растительной клетке, экспрессирующей полипептид SKI дикого типа, указанный полипептид SKI дикого типа, содержащий (а) циклин-связывающую область, придающую аффинность связывания для циклина, и (b) CDK-связывающую область, придающую аффинность связывания для CDK, содержащий экспрессию внутри клетки мутантного SKI-полипептида по любому из пп.1-22.

56. Способ по п.55, дополнительно содержащий введение в растительную клетку рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный SKI-полипептид.

57. Способ по п.56, где рекомбинантная нуклеиновая кислота означает экспрессионный вектор.

58. Способ по любому из пп.55-57, где растительная клетка из растения, выбранного из группы, состоящей из *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* и кукурузы (маиса).

59. Способ увеличения мощности растения, включающий экспрессию в растении мутантного SKI-полипептида, содержащего SKI по любому из пп.1-22, позволяющую указанному мутантному SKI-полипептиду ингибировать биологическую активность SKI дикого типа в растении так, чтобы увеличить мощность растения.

60. Способ увеличения массы корней растения, включающий экспрессию в растении мутантного SKI-полипептида, содержащего SKI по любому из пп.1-22, позволяющую указанному мутантному SKI-полипептиду ингибировать биологическую активность SKI дикого типа в растении так, чтобы увеличить массу корней растения.

61. Способ увеличения размера семян растения, включающий экспрессию в растении мутантного SKI-полипептида, содержащего SKI по любому из пп.1-22, позволяющую указанному мутантному SKI-полипептиду ингибировать биологическую активность SKI дикого типа в растении так, чтобы увеличить размер семян растения.

62. Способ усиления роста растений на раннем этапе, включающий экспрессию в растении мутантного SKI-полипептида, содержащего SKI по любому из пп.1-22, и позволяющую указанному мутантному SKI-полипептиду ингибировать биологическую активность SKI дикого типа в растении так, чтобы увеличить рост растений на раннем этапе.

63. Трансгенное растение по п.33, где мутантный полипептид SKI растений

- 5
- (a) положения, соответствующего аминокислоте 145 ВnKRP1;
 - (b) положения, соответствующего аминокислоте 149 ВnKRP1;
 - (c) положения, соответствующего аминокислоте 151 ВnKRP1;
 - (d) положения, соответствующего аминокислоте 153 ВnKRP1;
 - (e) положения, соответствующего аминокислоте 164 ВnKRP1; и
 - (f) положения, соответствующего аминокислоте 165 ВnKRP1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

```

BnKrp1      1 --NVRKCRKIKGTVGA-----SSTYMQLRSSRRIVVYRS
AtKRP1      1 --NVRKYRKAAGIVEAG-----V-----SSTYMQLRSSRRIVVYRS
AtKRP2      1 --MAVRRRERDVVE-----ENGVTITVVKRERKMEEEVDLVE
BnKrp3      1 --MGKYIRKSKITC-----DIDSMEATEATSLGVRT- AAANTLALKR
AtKRP3      1 --MGKYIRKSKITC-----DISVMEVSKATAPSPGVETRAAKTLALKR
BnKrp4      1 --MGKYIRKSKLDE-----EALSLIDVSP-----SPLGVLTRAKSLALQR
AtKRP4      1 --MGKYIRKSKIDGAGAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVPSSSSSPLGVLTRAKSLALQQ
BnKrp5      1 --MGKYIRKSKIAG-----ALSAKDISHQTASGFRTRAAKNLALQRLR
AtKRP5      1 --MGKYIRKSKVAC-----AVSVKDKSHPPALGFRTRAAAAANLALHR
BnKrp6      1 --MSERDFNCKRDAR-----SLEASSQNDSQLKKKKLLDDDFVFLA
AtKRP6      1 --MSERKRELAKKAS-----STSFSPCLKKTKLND
AtKRP7      1 MSETKPKRDSYEAG-----SNIKRMRLDDDDDLR
p27         1 -----

BnKrp1      31 EKASS-----SSSSCCASN----NNGMI
AtKRP1      33 SEKSSSVS-----VVGDNVGVSSSCSGSNEYKKEEIE
AtKRP2      36 SRIILSP-----CVQATNRGGIVARNAGASSETSMT
BnKrp3      41 LNSSAP-----DSSCYLQLRSSRRLKPPSRAE
AtKRP3      42 LNSSAADS-----ALPNDSSCYLQLRSSRRLKPPSRAE
BnKrp4      39 RLQ-----KPPSPSPFNPPPS---KQEITDCSGGSYLQLRSSRRLKPPSPV
AtKRP4      59 QQQRCLLQKPPSPSSLPPTSASPNNPSKQMKKKQQMNDCGSYLQLRSSRRLKPP-IV
BnKrp5      43 SHSTPPF-----VDADSFYLYLQLRSSRRLVLPPLAD
AtKRP5      42 LRSHSD-----EADSFNYLYLQLRSSRRLVLPPLTN
BnKrp6      39 VPSPMAS-----SDDSSRGGCSVTSAGEDDDKSSII
AtKRP6      29 SDSSPDSHDVIVF-----AVSSSSVASSALASDECSVTI
AtKRP7      31 SPRTLS-----SSSSSSLAYSVSDSGGFCSVAE
p27         1 -----

BnKrp1      50 DLEE---EDGETEISSCRRSSKRKLFENLREK-----ESMENSQ--
AtKRP1      65 LEEE---DNDGDTETSTYRRGTRKRLFENLREE-----EKELSKSM
AtKRP2      68 VRRR---DSPPVEEQQIEEEDSSVCCSTSEEK-----SKRRIEFVDLE
BnKrp3      69 PRQ---VPGIKESGSK--IDSVNSSVAGSGD-----ECFCRE
AtKRP3      75 PKQPPRVERSGIKESGSRSRVDSVNSVPVAQSSN-----EDECFDNFVSVQVSCGE
BnKrp4      83 VIRSSKRRKQRREEGRNPNPNPQ-NHDSIRGSGGDGSSRSDSVAESVVFGEKDFNGGI
AtKRP4      118 VIRSTKRRKQORRNETCGRNPNPNRNLDSIRGDG---SRSDSVSESVVFGEKDLISEI
BnKrp5      74 TRKQ---QORQLANSVGK---RQTTNPRAN-----FVLSSEPT
AtKRP5      71 TRKQ---QKQQLIPSVNQ---CQTKNPRASSGP-----AKKLEPDT
BnKrp6      71 CFSS---ESNEIVRK-SPTVSDLETHQIS-----LDLSVS
AtKRP6      64 GGEE---SDQSSSISGCSFTSEKBIAKNSSSFG-----VDLEDHQIETET
AtKRP7      60 SEEE---DDHLSSSISGCSSETNEIATRLP-----FSDLBAHEISET
p27         1 -----

BnKrp1      87 -QIVAGFDSAVK-----ESSDCCSRR---TSLSTTEEGK-----
AtKRP1      104 ENYSSEFFRSVAVK-----ESLDCCSGRKTEETVTAREEEK-----
AtKRP2      110 ENNGDDRETETS-----WIYDDLKNSSESMDSSSVAVEDVESR-----
BnKrp3      102 NSPEFQTRQST-----RESTPCNFVEDLETIVPGSSSTRSMR-----
AtKRP3      126 NSLGFESRHST-----RESTPCNFVEDMEIIVPGSSSTRSMCRATK-----
BnKrp4      142 NRELDGSESFN-----WITSRESLPCSLIRKHEHTSPGSSTKLNGISDNSNQR
AtKRP4      174 NKDPTFGQNFDFLEERTQSFNRTTRESLPCSLIRRPEIHTPGSSSTKLNICVSE-SNQR
BnKrp5      106 NLEEDRGSNLV-----KPFSGCSLGEKGLRFESGDRETTPCSL-----
AtKRP5      106 TTEEACGDNER-----ISREDCNFCQKGFLESEN-----
BnKrp6      103 GRIHRNEANP-----ESEALGETTEMESSSADDRKS-----
AtKRP6      107 ETSTFITSNFR-----KETSFPVSEGLGETTEMESSSATKRK-----
AtKRP7      101 EISTLLTNNFRK-----QGISSEENLGETAEMDSATTEMRDQR-----
p27         1 -----

```

Фиг.1а

```

BnKrp1 118 ----KSATEQPPTAVEEDDFVVEAEK---GLHDMKPKKYNEDFEKKEKLEEG-RYERVKLI-
AtKRP1 140 ----AKLMTETPTSEEDDFVVEAEK---GLKEKPKKYNEDFEKKEKPIEG-RYERVKLE
AtKRP2 150 -RRLRKSLHETVKEALEDFFQVAEKDLRKLLECSMKYNEDFEKDEPLGGGAYEWVIGN
BnKrp3 139 ---TPARDSTVPTIGLEDEFFAYAEQ---GQHLFMEKYNEDIVHDVPLP-RYERVKQS
AtKRP3 167 -EYTRBQDNVIPITSEDEFFAYAEQ---GQHLFMEKYNEDIVHDVPLP-RYERVKQK
BnKrp4 192 EDSFSGSHRHLEPTTPEMDEFFSAABE---EQKQFTEKYNEDFVNEQPLPG-RYERVKVD
AtKRP4 233 EDSLRSRSHRRRPTTPEMDEFFSGABE---EQKQFTEKYNEDFVNEQPLPG-RYERVKVD
BnKrp5 144 -RRDSEKATQSVPSHEDEFFAFAYEQ---GQHLFTEKYNEDIVSEMPPLP-RYERVKV
AtKRP5 137 ----SMISDSKSIQSEEDFFASAEQ---GQHLFTEKYNEDIVSEMPPLP-RYERVKVM
BnKrp6 136 ----SPEVSKSPITPGETDEFLSELES---KDKRFTKYNEDIVNDKPLQG-RYKNDVMK
AtKRP6 144 ----QPGVRKIPTAAELEDLSELES-SPD-DKKKQFTEKYNEDIVNDKPLQG-RYKNDRL
AtKRP7 140 -TEKKKMEKSPITQAELEDDFFSABER---YEKRFTEKYNEDIVNLTPLP-RYQNVSLK
p27 31 -----NLFGPVDEELTRDLEKHCRCMDEASQRKYNEDFQVHKPLP-RYERVKVE
    
```

Циклин – связывающая

CDK – связывающая

```

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

Фиг.16

| | | |
|--------------|-----|--------------------------------------------------------|
| Bn Krp1 | 124 | PPTAVETEDFFVEAEKQLHDMFKKKYNFDFFKKEKPLEG--RYEHWIKL--- |
| Bn Krp3 | 146 | VPTIGELSEFFAYAEQQQQRLFMKYNFDIVNDVPLPG--CYEHWQVSP-- |
| Bn Krp4 | 202 | LPTTPEMDEFFFAAESEEQKQFLEKYNFDPPVNEQPLPG--KPEWKKVDD-- |
| Bn Krp5 | 154 | VPS-HBIEEFFFAAEQQQCFEIKYNFDIVSEMDLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Bn Krp6 | 142 | SPTTPEMDEFFFAAESEEQKQFLEKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm AAS13377 | 122 | VPTSESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm AAS13374 | 159 | VPTSESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm AAS13375 | 152 | VPTSESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm AAS13376 | 136 | VPTSESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm CO980060* | | --PPKAELEEFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gm CO981606* | | VPTSESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Zm AI737717* | 68 | VPPAQELIQHFAAAALAAHAKRFASKYNFDIVVGVPLDAGRTEWTPGVSI |
| Zm AW267370* | 41 | IPSSTEFNEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Zm CD963560* | 17 | VPSSEKNEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Zm CB329626* | 144 | IPSSLEMEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Os CV727532* | | IPASAELEAFFFAAEQRQRCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Os CR293278* | | VPSSEKNEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Os BI306406* | | --PPEEEMEANLAAAESSVAREFAAKYNFDIVKCAEINDC--RYEHWIKVVP-- |
| Ta BG908519 | 145 | IFCSAEKNEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Ta AI820225* | | VPSSEKNEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Pt CK096447* | | IPPTCEMDEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Pt BU862176* | | IPPTCEMDEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Pt BU892281* | | IPPTCEMDEFFFAAEQRQQCAFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Nt KIS1 | 117 | MESEKEDFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| St BQ505644* | | --SEAELEEFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |
| Gh AI728644* | | IPSKAELEEFFFAAEKNDIQKRFIDKYNFDIVNDVPLPG--RYEHWIKVVP-- |

Bn= Brassica napus (canola)
 Gm= Glycine max (soy)
 Os= Oryza sativa (rice)
 St= Solanum tuberosum (potato)
 Gh= Gossypium hirsutum (cotton)
 Ta= Triticum aestivum (wheat)
 Pt= Populus tremula (poplar)
 Nt= Nicotiana tabacum (tobacco)

Фиг.2



➤ Kp1 F151A;F153A Кодоны, оптимизированные для экспрессии в кукурузе(Maize)

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc
 gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgatcgacctgaggagg
 agcgggatggagagacagagacctctcgtgcaggcgctccagcaaacgtaaaccttcgagaatcttagggagaagga
 gagtatggaaaattctcagcaaatcgtagccggattgaltcggcgggtaaagagictagcgactgctgctgticcagaagg
 acgagtctgtctactaccgaggagaaggggaaaagcggcaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggattctt
 tgtcgaggcggagaaacagctccacgacaattttaagaagaataataacgctgacgctgaaaaggagaagccactggag
 ggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

➤ Kp1 Y149A;F151A;F153A Кодоны, оптимизированные для экспрессии в кукурузе(Maize)

Atggtccggaagtgccggaagacgaaaggcaccgtgggggctagtagcacctatatgcaacttaggtcaagaaggatc
 gtctaccgtagcgagaaggctagttcctctagttcgtcatgctgtgcttcaaataacaacggcgtgatcgacctgaggagg
 agcgggatggagagacagagacctctcgtgcaggcgctccagcaaacgtaaaccttcgagaatcttagggagaagga
 gagtatggaaaattctcagcaaatcgtagccggattgaltcggcgggtaaagagictagcgactgctgctgticcagaagg
 acgagtctgtctactaccgaggagaaggggaaaagcggcaccgagcaaccgccgacggctgtcgagattgaggattctt
 tgtcgaggcggagaaacagctccacgacaattttaagaagaagcgaacgctgacgctgaaaaggagaagccactgga
 gggcaggtacgagtgggttaaattgtccgagtga

Фиг.3