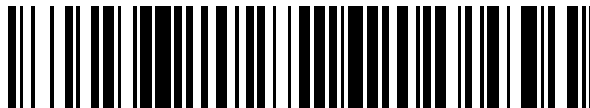


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 482**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2008 PCT/US2008/013811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09085169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08868776 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2234474**

54 Título: **Genes de la diacilglicerol aciltransferasa 2 y proteínas codificadas por los mismos procedentes de algas**

30 Prioridad:

21.12.2007 US 8752 P

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

27.04.2017

73 Titular/es:

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA (50.0%)

1200 MONTREAL ROAD

OTTAWA, ON K1A 0R6, CA y

DOW AGROSCIENCES, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

ZOU, JITAO;

XU, JINGYU y

ZHENG, ZHIFU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes de la diacilglicerol aciltransferasa 2 y proteínas codificadas por los mismos procedentes de algas

Reivindicación de prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de patente de EE.UU. con nº de serie 60/008.752, archivada el 21 de diciembre de 2007, para "GENES DE DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASA 2 Y PROTEÍNAS DE ALGAS CODIFICADAS POR LOS MISMOS".

Campo de la técnica

10 Esta descripción se relaciona de manera general con la biotecnología y, más particularmente, con genes útiles para la manipulación genética de características de las plantas. En algunas realizaciones, la descripción se relaciona con polipéptidos y ácidos nucleicos aislados y/o purificados que codifican diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2) y métodos para su uso.

Antecedentes

15 Los cultivos oleaginosos son un producto agrícola notable. Los aceites de semillas de plantas son una gran fuente de ácidos grasos esenciales poliinsaturados para las dietas humanas y de materias primas renovables para las industrias químicas. Las enzimas del complejo de la ácido graso sintasa en los plástidos de las semillas en desarrollo son responsables de la biosíntesis de ácidos grasos que se canalizan hacia el conjunto de acil-CoA citosólico para mantener la acumulación de triacilglicerol. La biosíntesis de triacilglicerol (TAG) se localiza en el retículo endoplasmático con glicerol 3-fosfato y acil-CoA grasos como sustratos primarios. Hay tres aciltransferasas involucradas en el ensamblaje biológico de lípidos de almacenamiento de las plantas, concretamente la glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT, EC 2.3.1.20), la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAT, EC 2.3.1.51) y la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT, EC 2.3.1.20). Estas tres aciltransferasas catalizan la acilación escalonada del esqueleto de glicerol cuya etapa final es la acilación de sn-1,2-diacilglicerol (DAG) mediante DGAT para la formación de TAG, un proceso bioquímico generalmente conocido como la vía metabólica Kennedy. Se ha sugerido la acilación del esqueleto de glicerol mediada por DGAT para producir TAG como la etapa limitante de la tasa de acumulación de lípidos de plantas. Por tanto, DGAT es una diana en la modificación genética de la biosíntesis de lípidos de plantas.

Descripción de la invención

30 En la presente memoria describimos un género de polipéptidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con la diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT) de *T. pseudonana*. Estos polipéptidos se pueden utilizar para alterar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en plantas. También se describen polipéptidos que comprenden el dominio catalítico de la diacilglicerol transferasa de *Thalassiosira pseudonana* DGAT2, y polipéptidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con el dominio catalítico de la diacilglicerol transferasa de DGAT2. Además se describen secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen al menos 90% de identidad de secuencia con DGAT2 de *T. pseudonana*, y polinucleótidos que codifican polipéptidos con al menos 90% de identidad con el dominio diacilglicerol transferasa de DGAT2 de *T. pseudonana*.

35 En la presente memoria describimos un gen aislado y purificado de diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT) y secuencias de ADNc de *T. pseudonana*. También se describe la secuencia completa de ADNc de DGAT2 de *T. pseudonana*, y las secuencias de ADNc con al menos 80% de identidad de secuencia con el ADNc de DGAT2. En algunas realizaciones, un vector puede contener estas secuencias de ADNc. Estos polinucleótidos pueden ser utilizados para modificar la formación natural de triacilgliceroles en plantas para aumentar el rendimiento de los aceites comerciales de plantas, o para modificar su composición para conseguir mejoras comerciales específicas de plantas y de productos de plantas.

40 También se describen otros genes aislados y purificados y secuencias de ADNc de la familia DGAT2 de *T. pseudonana*, y de otras especies de algas, que incluyen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri* y *Phaeodactylum tricornutum*. Estos polinucleótidos se pueden utilizar también para modificar la formación natural de triacilgliceroles en plantas para aumentar el rendimiento de los aceites comerciales de plantas, o para modificar su composición para conseguir mejoras comerciales específicas de plantas y productos de plantas.

45 También se describe una planta transgénica que contiene una construcción de ácido nucleico. Se describe un método para transformar una célula o una planta; comprendiendo el método introducir el ácido nucleico aislado, purificado o recombinante en la célula o planta. Un proceso para producir una semilla transformada genéticamente comprende introducir el ácido nucleico en la semilla. En algunas realizaciones, se pueden utilizar estos métodos para modificar plantas para cambiar su contenido en aceite de semilla.

50 Expresado de forma general, algunos ejemplos describen el aislamiento, purificación y caracterización de un gen DGAT2 de algas, y la utilidad de DGAT2 en la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga. Lo

anterior se hará más evidente a partir de las siguientes descripciones detalladas de varias realizaciones, lo cual prosigue con referencia a las figuras que acompañan.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 representa la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 1) que se corresponde con la secuencia completa de ADNc de DGAT2 de *T. pseudonana* DGAT2 (SEQ ID NO: 2).
- 10 La FIG. 2 representa un alineamiento de secuencias entre SEQ ID NO: 1 (TpDGA2) y gi: 37182187, gi: 50541689, gi: 74623358, gi: 74623359, gi: 86279638, y gi: 62825813, que son todas diacilglicerol transferasas de tipo 2. Los aminoácidos comunes a cuatro o más de las secuencias se indican en negrita. La secuencia de aminoácidos que comprende el dominio catalítico diacilglicerol transferasa de estas diacilglicerol transferasas de tipo 2 consiste en los residuos: 236 – 365 (TpDGA2); 79 – 208 (gi: 37182187); 76 – 205 (gi: 50541689); 76 – 205 (gi: 74623358); 34 – 165 (gi: 74623359); 33 – 165 (gi: 86279638); 36 – 165 (gi: 62825813).
- 15 La FIG. 3A representa un ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 3). La FIG. 3B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y que codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 3; (SEQ ID NO: 4).
- La FIG. 4A representa otro ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 5). La FIG. 4B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 5; (SEQ ID NO: 6).
- 20 La FIG. 5A representa otro ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 7). La FIG. 5B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 7; (SEQ ID NO: 8).
- La FIG. 6A representa otro ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 9). La FIG. 6B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 9; (SEQ ID NO: 10).
- 25 La FIG. 7A representa otro ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 11). La FIG. 7B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 11; (SEQ ID NO: 12).
- La FIG. 8A representa otro ejemplo de una secuencia de polipéptido homóloga a SEQ ID NO: 1; (SEQ ID NO: 13). La FIG. 8B representa una porción de una secuencia de polinucleótido con al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 2, y codifica una porción del polipéptido de SEQ ID NO: 13; y codifica una porción del polipéptido de (SEQ ID NO: 14).
- 30 La FIG. 9 representa el análisis de cromatografía en capa fina (TLC) de TAG producido mediante expresión de TpDGAT2 y AtDGAT1 en levadura mutante H1246 *MAT α* (*DGAT*, *PDAT*, *ASAT1*, *ASAT2*, el cual es deficiente en la formación de TAG). El carril 1 representa la expresión de AtDGAT1, los carriles 2 – 6 representan la expresión de TpDGAT2. Se observaron bandas nítidas de TAG (triacilglicerol) en los carriles 2 – 6. El carril 8 representa un vector vacío (pYES2.1) control, y no hay banda de TAG (triacilglicerol) en este carril. El carril a la derecha del carril 8 se cargó con un estándar de TAG el cual puede ser utilizado como un marcador de TAG.
- 35 La FIG. 10 muestra la actividad DGAT en la levadura mutante H1246 *MAT α* transformada con el plásmido vacío (pYES2.1 Con; barras vacías), con el ADNc de DGAT2 de *T. pseudonana* (pYES:DGAT; barras punteadas) y con el ADNc de DGAT1 de *A. thaliana* (barras sólidas negras). Se realizaron ensayos de la actividad de la DGAT en las fracciones de membrana microsomal preparadas a partir de lisados de las células de levadura inducidas utilizando como donadores de grupo acil diferentes acil-CoA marcados con ¹⁴C, y como receptores sn-1,2 dioleína no marcada. La actividad relativa de DGAT aquí se expresó como DPM (la cantidad de sustratos marcados con ¹⁴C incorporados en los TAG). Los resultados ilustran la preferencia de sustrato y la actividad relativa de TpDGAT2 y AtDGAT1.
- 40 La FIG. 11 representa una comparación de la homología de las secuencias de aminoácidos de la TpDGAT2 (TpDGAT2-1) con los miembros de su familia de *T. pseudonana* o de otras especies de algas (Cr – *Chlamydomonas reinhardtii*; Ol – *Ostreococcus lucimarinus*; Ot – *Ostreococcus tauri*; Pt – *Phaeodactylum tricornutum*). TpDGAT2 (TpDGAT2-1) comparte un 24%, 25% y 17% de identidad de secuencia con los miembros de su familia TpDGAT2-2, TpDGAT2-3, y TpDGAT2-4, respectivamente. Entre diferentes especies de algas, TpDGAT2 (TpDGAT2-1) exhibe gran similitud de secuencia con PtDGAT2-1 (48% de identidad de secuencia), y relativamente gran similitud con CrDGAT2-1, CrDGAT2-2, y CrDGAT2-4 (20%, 23%, y 24% respectivamente).
- 50

Mejores maneras de llevar a cabo la invención

I. Resumen de varias realizaciones

En la presente memoria se describe la diacilglicerol aciltransferasa tipo 2 (DGAT2) aislada y purificada de *T. pseudonana*. La sorprendente habilidad de este polipéptido para modificar la síntesis de ácidos grasos

poliinsaturados de cadena muy larga (VLCPUFA) en otros organismos, y en células de otros organismos, se utiliza para transformar plantas y semillas de plantas para producir plantas y semillas de plantas transgénicas con composiciones deseadas de ácidos grasos. En esta descripción se incluyen los polipéptidos con actividad DGAT2 que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con aquella de DGAT2 de *T. pseudonana*. En algunas realizaciones, estas secuencias de polipéptidos comprenden, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 13. También se describen polipéptidos que comprenden secuencias con al menos 90% de identidad de secuencia con el dominio catalítico diacilglicerol aciltransferasa de DGAT2 de *T. pseudonana*. En algunas realizaciones, estas secuencias de polipéptidos comprenden, por ejemplo, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19. El dominio catalítico diacilglicerol aciltransferasa de DGAT2 de *T. pseudonana* se representa en la FIG. 2; consiste en los residuos de aminoácidos 236 – 365 en la secuencia completa de polipéptido descrita de DGAT2 de *T. pseudonana*.

El polipéptido de la SEQ ID NO: 15 comprende el dominio diacilglicerol aciltransferasa de DGAT2 de *T. pseudonana*. Algunas realizaciones están relacionadas con polipéptidos aislados o purificados que comprenden secuencias con al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7% de identidad de secuencia con el polipéptido aislado o purificado de la SEQ ID NO: 15, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. En realizaciones particulares, estos polipéptidos tienen actividad diacilglicerol aciltransferasa. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la actividad diacilglicerol mediante, por ejemplo, un ensayo enzimático *in vitro*. Este método se describe en detalle en el Ejemplo 4, y los resultados típicos de este ensayo se muestran en la FIG. 10. Como apreciarán los expertos en la técnica, la descripción también está relacionada con secuencias de ADN sustancialmente homólogas de plantas y algas que codifican proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos deducidas de 90% o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

Otros polipéptidos aislados o purificados de algas que son miembros de la familia DGAT2 comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos 90% idénticas a, por ejemplo, SEQ ID NO: 25 (TpDGAT2-2), SEQ ID NO: 27 (TpDGAT2-3), SEQ ID NO: 29 (TpDGAT2-4), SEQ ID NO: 31 (CrDGAT2-1), SEQ ID NO: 33 (Cr DGAT2-2), SEQ ID NO: 35 (CrDGAT2-3), SEQ ID NO: 37 (CrDGAT2-4), SEQ ID NO: 39 (CrDGAT2-5), SEQ ID NO: 41 (OIDGAT2-1), SEQ ID NO: 43 (OIDGAT2-2), SEQ ID NO: 45 (OIDGAT2-3), SEQ ID NO: 47 (OIDGAT2-4), SEQ ID NO: 49 (OtDGAT2-1), SEQ ID NO: 51 (OtDGAT2-2), SEQ ID NO: 53 (OtDGAT2-3), SEQ ID NO: 55 (OtDGAT2-4), SEQ ID NO: 57 (PtDGAT2-1), SEQ ID NO: 59 (PtDGAT2-2), SEQ ID NO: 61 (PtDGAT2-3), o SEQ ID NO: 63 (PtDGAT2-4).

Algunas realizaciones se relacionan con ácidos nucleicos (polinucleótidos) aislados o purificados que codifican los polipéptidos descritos anteriormente. Las secuencias de estos polinucleótidos pueden comprender, por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26 (TpDGAT2-2), SEQ ID NO: 28 (TpDGAT2-3), SEQ ID NO: 30 (TpDGAT2-4), SEQ ID NO: 32 (CrDGAT2-1), SEQ ID NO: 34 (CrDGAT2-2), SEQ ID NO: 36 (CrDGAT2-3), SEQ ID NO: 38 (CrDGAT2-4), SEQ ID NO: 40 (CrDGAT2-5), SEQ ID NO: 42 (OIDGAT2-1), SEQ ID NO: 44 (OIDGAT2-2), SEQ ID NO: 46 (OIDGAT2-3), SEQ ID NO: 48 (OIDGAT2-4), SEQ ID NO: 50 (OtDGAT2-1), SEQ ID NO: 52 (OtDGAT2-2), SEQ ID NO: 54 (OtDGAT2-3), SEQ ID NO: 56 (OtDGAT2-4), SEQ ID NO: 58 (PtDGAT2-1), SEQ ID NO: 60 (PtDGAT2-1), SEQ ID NO: 62 (PtDGAT2-3), o SEQ ID NO: 64 (PtDGAT2-4). En algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos tienen un porcentaje de identidad con las bases de una secuencia de nucleótidos descrita que codifica un polipéptido descrito de al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6% o 99,7%. Varios ejemplos de tales polinucleótidos son SEQ ID NOS: 21 – 24. Como apreciará el experto en la técnica, pequeños cambios en la secuencia de ácidos nucleicos no alteran necesariamente la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. Los expertos en la técnica apreciarán que cambios en la identidad de los nucleótidos en una secuencia específica de un gen que cambian la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado pueden resultar en una efectividad reducida o aumentada de los genes y que, en algunas aplicaciones (i.e., antisentido, co-supresión, o ARNi), las secuencias parciales a menudo funcionan tan efectivamente como las versiones completas. Las formas en las cuales se puede variar o acortar la secuencia del gen son bien conocidas para los expertos en la técnica, así como las formas de analizar la efectividad de los genes alterados. En algunas realizaciones, la efectividad se puede analizar fácilmente mediante, por ejemplo, cromatografía de gas convencional. Todas estas variaciones de los genes están por tanto incluidas como parte de la presente memoria.

Algunas realizaciones están relacionadas con un vector que contiene un polinucleótido aislado o purificado que tiene al menos 80% de homología con la SEQ ID NO: 2; por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 – 24. Por consiguiente, se proporciona un método para preparar un vector que incluye una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2; por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, o SEQ ID NO: 21 – 24, o una parte de las mismas, para la introducción de la secuencia o secuencia parcial en una orientación antisentido, o el complemento de la misma, en una célula de planta.

Ciertas realizaciones están relacionadas con un vector que contiene polinucleótidos que tienen al menos 80% de homología con miembros de la familia DGAT2 en algas. Estos vectores pueden comprender secuencias de polinucleótidos de, por ejemplo, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48,

SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, o SEQ ID NO: 64.

5 En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados y purificados, y los vectores que comprenden estos polinucleótidos aislados y purificados, se pueden utilizar para crear plantas transgénicas que produzcan polipéptidos con actividad DGAT2. Por lo tanto, una realización hace referencia a plantas y semillas de plantas transgénicas que incluyen un polinucleótido aislado o purificado que tiene al menos 80% de homología con la SEQ ID NO: 2; por ejemplo, una molécula de ácido desoxirribonucleico con la secuencia de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, o SEQ ID NO: 21- 24. Otras realizaciones están relacionadas con plantas y semillas de plantas transgénicas que incluyen un polinucleótido aislado o purificado que

10 tiene al menos 80% de homología con otro miembro de la familia DGAT2 en algas; por ejemplo una molécula de ácido desoxirribonucleico con la secuencia de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, o SEQ ID NO: 64.

15 Una realización comprende un método para producir tales plantas y semillas de plantas. El método comprende crear una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1 y 15 e introducir la construcción en una planta. El método de esta realización se puede consumir mediante cualquier medio conocido por cualquier experto corriente en la técnica, a modo de ejemplo no limitante, transformación mediada por

20 *Agrobacterium*. En realizaciones específicas, el método comprende además introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad piruvato deshidrogenasa quinasa de *Brassica*, un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad diacilglicerol aciltransferasa, y/o un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa en la planta. Este método se puede poner en práctica en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, *Borago* spp., *Canola*, *Ricinus* spp., *Theobroma* spp.,

25 *Zea* spp., *Gossypium* spp., *Crambe* spp., *Cuphea* spp., *Linum* spp., *Lesquerella* spp., *Limnanthes* spp., *Linola*, *Tropaeolum* spp., *Oenothera* spp., *Olea* spp., *Elaeis* spp., *Arachis* spp., colza, *Carthamus* spp., *Glycine* spp., *Soja* spp., *Helianthus* spp., *Nicotiana* spp., *Vernonia* spp., *Triticum* spp., *Hordeum* spp., *Oryza* spp., *Avena* spp., *Sorghum* spp., *Secale* spp., *Brassicaceae*, y otros miembros de la familia de las plantas *Gramineae*.

30 En algunas realizaciones, el método además comprende recolectar una semilla de la planta que incluye la construcción de ácido nucleico introducido, y extraer aceite de la semilla recolectada. Por lo tanto, otras realizaciones incluyen una planta producida mediante el método.

Algunas de las manipulaciones y productos finales que son posibles utilizando el gen DGAT2 o una parte del mismo, incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes: semillas con contenido en aceite aumentado o disminuido; semillas que contienen aceites con un contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga aumentado,

35 y plantas que exhiben una capacidad aumentada o alterada de acumular ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga.

II. Abreviaturas

CaMV	virus del mosaico de la coliflor
ADNc	ADN complementario
40 CERV	virus del anillo grabado del clavel
CrDGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2 de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
DAG	sn-1,2-diacilglicerol
DGAT	diacilglicerol aciltransferasa
DGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2
45 DHA	ácido docosahexaenoico
ADN	ácido desoxirribonucleico
EPA	ácido eicosapentaenoico
GPAT	glicerol 3-fosfato aciltransferasa
LPAT	ácido lisofosfatídico aciltransferasa
50 OIDGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2 de <i>Ostreococcus lucimarinus</i>

	OtDGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2 de <i>Ostreococcus tauri</i>
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	PtDGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2 de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
	ARN	ácido ribonucleico
5	ARNi	ARN de interferencia
	RT-PCR	PCR de transcripción reversa
	T35S	terminador 35S de CaMV
	TAG	triacilglicerol
	TLC	cromatografía en capa fina
10	Tmas	terminador de la manopina sintasa
	Tnos	terminador de la nopalina sintasa
	TpDGAT2	diacilglicerol transferasa tipo 2 de <i>T. pseudonana</i>
	TrbcS	región terminadora de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa
	VLCPUFA	ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga

15 III. Términos

Para facilitar la revisión de las diferentes realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos específicos:

20 Secuencia complementaria de nucleótidos: Se entiende como “secuencia complementaria de nucleótidos” de una secuencia como cualquier ADN cuyos nucleótidos son complementarios a aquellos de la secuencia de la descripción y cuya orientación está invertida (secuencia anti-paralela).

25 Grado o porcentaje de homología de secuencia: El término “grado o porcentaje de homología de secuencia” se refiere al grado o porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias después del alineamiento óptimo. El porcentaje de identidad de secuencia (o el grado de identidad) se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia del péptido o del polinucleótido en la ventana de comparación pueda comprender adiciones o deleciones (i.e. huecos) en comparación con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se da un residuo de aminoácido o base de ácido nucleico idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la
30 ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

35 Secuencia homóloga aislada y/o purificada: Se entiende como “secuencia homóloga aislada y/o purificada” una secuencia aislada y/o purificada que tiene un porcentaje de identidad con las bases de una secuencia de nucleótidos, o los aminoácidos de una secuencia de polipéptidos, de al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94,% 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%. Este porcentaje es puramente estadístico, y es posible distribuir las diferencias entre las dos secuencias de nucleótidos aleatoriamente y sobre la totalidad de sus longitudes. La identidad de secuencia se puede determinar, por ejemplo, mediante programas de ordenador diseñados para realizar alineamientos de una sola secuencia y múltiples. Se apreciará que esta descripción abarca el uso de un codón degenerado tal y como lo entenderá un experto corriente en la técnica. Además, un experto en la técnica entenderá que se pueden hacer sustituciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido sin desbaratar la estructura o la función del polipéptido. El experto en la técnica lleva a cabo las sustituciones conservadoras sustituyendo unos aminoácidos por otros con similar hidrofobia, polaridad, y longitud de la cadena R. Adicionalmente, se pueden identificar sustituciones conservadoras comparando secuencias alineadas de proteínas homólogas de diferentes especies, localizando residuos de aminoácidos que han mutado entre especies sin alterar las funciones básicas de las proteínas
45 codificadas.

Aislado: como apreciará un experto en la técnica, “aislado” se refiere a polipéptidos que han sido “aislados” de su entorno natural.

50 Nucleótido, polinucleótido, o secuencia de ácidos nucleicos: Se entenderá como “nucleótido, polinucleótido, o secuencia de ácidos nucleicos” ambos ADN de cadena doble o de cadena simple en la forma monomérica y dimérica (también llamada en tándem) y los productos de transcripción de dichos ADNs.

Identidad de secuencia: Se dice que dos aminoácidos o secuencias de nucleótidos son “idénticas” si la secuencia de aminoácidos o residuos nucleotídicos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una máxima correspondencia como se describe más adelante. Las comparaciones de secuencia entre dos (o más) péptidos o polinucleótidos se realizan típicamente comparando las secuencias de dos secuencias alineadas óptimamente en un segmento o “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Ad. App. Math* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 85: 2444 (1988), mediante la aplicación informatizada de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual.

La definición de identidad de secuencia que se ha dado anteriormente es la definición que utilizaría un experto en la técnica. La definición por sí misma no necesita la ayuda de ningún algoritmo, siendo dichos algoritmos útiles únicamente para conseguir el alineamiento óptimo de las secuencias, en lugar del cálculo de identidad de secuencia.

De la definición que se da arriba, resulta que hay un único valor bien definido para la identidad de secuencia entre dos secuencias comparadas cuyo valor corresponde al valor obtenido para el mejor u óptimo alineamiento.

En el software “BLAST 2 sequence” BLAST N o BLAST P, que está disponible en el sitio web [blast\(PUNTO\)ncbi\(PUNTO\)nlm\(PUNTO\)nih\(PUNTO\)gov/Blast\(PUNTO\)cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), y que es usado habitualmente por los inventores y en general por los expertos para comparar y determinar la identidad entre dos secuencias, el software selecciona directamente el coste del hueco que depende de la longitud de la secuencia a comparar (i.e. 11,2 para una matriz de sustitución BLOSUM-62 para longitud > 85).

Hibridación rigurosa: Se entiende como hibridación con una secuencia de nucleótidos bajo condiciones de rigor una hibridación bajo condiciones de temperatura y fuerza iónica elegidas de tal forma que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios. Los homólogos de los genes DGAT2 descritos en la presente memoria que se obtienen de otros organismos, por ejemplo plantas, se pueden obtener mediante el cribado de genotecas apropiadas que incluyen los homólogos, en donde el muestreo se realiza con la secuencia de nucleótidos de los genes específicos DGAT2 descritos en la presente memoria, o porciones o sondas de los mismos, o se identifican mediante la búsqueda de homología de secuencia que utilizando programas de búsqueda de alineamiento de secuencia tales como BLAST, FASTA.

III. Modificación de los niveles de ácidos grasos por DGAT2 de algas

A. Resumen

Estudios recientes en DGAT2 del árbol tung y del ricino sugieren que en plantas que contienen ácidos grasos inusuales, la DGAT2 puede jugar un papel importante en la canalización de ácidos grasos inusuales hacia aceites de almacenamiento de semilla. Mientras que la DGAT2 puede ser una diana potencial en la modificación genética de la biosíntesis de lípidos de plantas en plantas oleaginosas, las enzimas caracterizadas recientemente contribuyeron a la utilización de los ácidos grasos conjugados ácido eleostearico (DGAT2 del árbol tung) y ácido ricinolénico (DGAT2 del ricino) respectivamente. Ninguna de las enzimas (DGAT2 del árbol tung o DGAT2 del ricino) está implicada en la incorporación de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena muy larga deseables comercialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en triacilglicerol (TAG).

Armbrust E. V. *et al.*, *Science*, vol. 306, 01.10.04 describe el borrador de un genoma nuclear de 34 millones de pares de bases de la alga diatomea marina *T. pseudonana*. En Tonon T. *et al.*, *Phytochemistry* 61 (2002), 15 – 24, se describe que cualquiera de las muchas enzimas aciltransferasas candidatas (p. ej. glicerol 3-fosfato aciltransferasa, ácido lisofosfatídico aciltransferasa, acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa, lisofosfatidilcolina aciltransferasa, y diacilglicerol aciltransferasa dependiente de fosfolípido, etc.) media la incorporación de EPA y DHA en un esqueleto de glicerol en *T. pseudonana*. La publicación de patente de EE.UU. US 2006/0.094.088 describe organismos de algas como candidatos para identificar y aislar cualquiera de muchas enzimas, que incluyen PUFA desaturasas, elongasas, y aciltransferasas para influenciar el contenido de PUFA de los aceites de almacenamiento. Específicamente, la publicación de patente de EE. UU. US 2006/0.094.088 reduce la actividad de las enzimas aciltransferasas endógenas para aumentar el contenido de PUFA de aceites de almacenamiento.

T. pseudonana es capaz de producir y acumular ácidos grasos omega-3 poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA en TQG y es una buena fuente aceites acumulados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (VLCPUFA) de alto nivel. Por esta razón, el gen de la diacilglicerol aciltransferasa 2 de *T. pseudonana* (TpDGAT2) se ha investigado y caracterizado ahora. Sorprendentemente, se descubrió que TpDGAT2, a diferencia de DGAT2 del árbol tung o del ricino, puede incorporar eficientemente ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga en TAG. Se identificaron otros miembros de la familia DGAT2 en algas utilizando el gen TpDGAT2 para buscar secuencias de polinucleótidos de *T. pseudonana* y especies relacionadas de algas. Por tanto, se determinó la utilidad de genes DGAT2 de algas en herramientas transgénicas y para la modificación de la composición y la acumulación de TAG en semillas.

B. Polipéptidos homólogos al DGAT2 de *T. pseudonana* con actividad diacilglicerol transferasa tipo 2

Se pueden encontrar proteínas que son homologas a la secuencia completa de DGAT2 de *T. pseudonana* mediante la búsqueda en bases de datos de proteínas, tales como la base de datos de proteínas NCBI, con motores de búsqueda, tales como BLAST. También se pueden identificar mediante diseño racional. El proceso de diseño racional puede comprender identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de la longitud de la secuencia de polipéptido deseada, y hacer esas sustituciones en la proteína codificada.

La búsqueda con la secuencia completa de aminoácidos de DGAT2 de *T. pseudonana* en la base de datos de proteínas NCBI (BLASTP) revela polipéptidos con una homología de secuencia significativa a TpDGAT2, varios de los cuales se muestran alineados con TpDGAT2 en la FIG. 2. El dominio conservado diacilglicerol transferasa tipo 2 se alinea en la FIG. 2, y consiste en los residuos de aminoácidos 236 – 365 en TpDGAT2 y los residuos correspondientes de los otros polipéptidos DGAT2 representados. El dominio conservado diacilglicerol transferasa tipo 2 se describe dentro de la base de datos de dominios conservados de NCBI ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi. Las secuencias de polipéptidos que son homólogas a este dominio conservado confieren a las proteínas que las contienen la actividad de diacilglicerol de tipo 2 de TpDGAT2.

Los expertos corrientes en la técnica entienden que los polipéptidos con secuencias homólogas se pueden diseñar para exhibir la misma estructura y funciones que sus homólogos. El experto en la técnica está capacitado para diseñar polipéptidos homólogos a aquellos descritos específicamente en los ejemplos de esta descripción mediante el alineamiento de secuencias de la FIG. 2. Tales polipéptidos homólogos pueden ser aquellos que contienen sustituciones conservadoras con polipéptidos de la presente descripción, por ejemplo los polipéptidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, o SEQ ID NO: 19. Aquellos que son expertos en la técnica conocen ensayos experimentales simples que determinan qué proteínas homólogas exhiben actividad diacilglicerol transferasa de tipo 2 sustancialmente similar a TpDGAT2. Tales ensayos no son excesivamente costosos en tiempo, caros, o difíciles técnicamente. Por ejemplo, se puede utilizar cromatografía de gases convencional para detectar TAG producido por TpDGAT2. Se describen varios de estos ensayos en los ejemplos detallados más adelante.

C. Uso de moléculas de ácido nucleico para transformar con actividad DGAT2

Se debe entender que las realizaciones descritas no incluyen las secuencias genómicas de nucleótidos tomadas en su ambiente natural; esto quiere decir, en el genoma natural de *T. pseudonana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri*, o *Phaeodactylum tricorutum*. Algunas realizaciones se refieren a secuencias que ha sido posible aislar, purificar o purificar parcialmente, a partir de métodos de separación tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, mediante exclusión basada en tamaño molecular, o mediante afinidad, o alternativamente técnicas de fraccionamiento basadas en la solubilidad en diferentes disolventes, o a partir de métodos de ingeniería genética tales como amplificación, clonar, y subclonar, siendo posible que vectores porten las secuencias.

Se incluyen además moléculas de ácidos nucleicos que hibridan con las secuencias anteriormente descritas. Las condiciones de hibridación pueden ser estrictas en las que la hibridación ocurrirá si hay al menos 90%, 95% o 97% de identidad con las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de DGAT2 descritas. Las condiciones estrictas pueden incluir aquellas utilizadas para las hibridaciones Southern conocidas, tales como, por ejemplo, incubación durante la noche a 42°C en una disolución que tiene un 50% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5 x de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 microgramos/mililitro de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y triturado, seguida de un lavado del soporte de la hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Se conocen bien otras condiciones conocidas de hibridación y se describen en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

El aislamiento y clonaje de ADN está bien establecido. De manera similar, mediante técnicas convencionales se puede insertar ADN que codifica una enzima aislada en un vector y transformar células de levadura. Sin embargo, como no se ha clonado ningún gen DGAT2 que pueda utilizar eficientemente VLCPUFA, no ha sido posible abordar la posibilidad de modificaciones genéticas mediante la modulación de la actividad DGAT2. Nosotros confirmamos que la DGAT2 está involucrada en la síntesis de TAG y que utiliza VLCPUFA más eficientemente que DGAT.

Moléculas de ácido nucleico que codifican para DGAT2, por ejemplo secuencias que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, o SEQ ID NO: 61, se pueden transformar en un organismo, por ejemplo una planta. Tales secuencias homólogas se ejemplifican mediante las SEQ ID NOS: 21 – 24. Tal y como se conoce en la técnica, hay varias maneras mediante las cuales se pueden introducir genes y construcciones de genes en organismos, por ejemplo plantas, y se han integrado con éxito una combinación de técnicas de transformación y cultivo de tejido en estrategias efectivas para crear organismos transgénicos, por ejemplo, plantas de cultivo. Se han descrito estos

- métodos en otros lugares (Potrykus, 1991; Vasil, 1994, Walden y Wingender, 1995; Songstad, *et al.*, 1995), y son bien conocidos para expertos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica será ciertamente consciente de que, además de la transformación de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium* mediante infiltración al vacío (Bechtold *et al.*, 1993) o inoculación de heridas (Katavic, *et al.*, 1994), es igualmente posible transformar otras plantas y especies de cultivo, utilizando transformación mediada por Ti-plásmido de *Agrobacterium* (p. ej. infección de heridas de hipocotilo (DeBlock, *et al.*, 1989) o de peciolo de cotiledón (Moloney, *et al.* 1989)), bombardeo de partículas/métodos de biolística (Sanford, *et al.*, 1987; Nehra, *et al.*, 1994; Becker, *et al.*, 1994) o métodos de transformación de protoplastos asistida por polietilenglicol (Rhodes, *et al.*, 1988; Shimamoto, *et al.*, 1989).
- Hay muchos ejemplos de modificaciones exitosas del metabolismo de plantas que se han conseguido mediante ingeniería genética para transferir genes nuevos o para alterar la expresión de los genes existentes, en plantas. Ahora es posible introducir rutinariamente genes en muchas especies de plantas de importancia agronómica para mejorar el rendimiento de cultivo (p. ej. aceite de semillas o contenido/composición de almidón del tubérculo; mejora de la harina; resistencia a herbicidas, enfermedades o insectos; tolerancia a metales pesados etc.) (Mackenzie y Jain, 1997; Budziszewski *et al.*, 1996; Somerville, 1993; Kishore y Somerville, 1993).
- Como también será evidente para expertos en la técnica, y tal y como se describe en otros lugares (Meyer, 1995; Dada, *et al.*, 1997), es posible utilizar promotores de plantas para dirigir cualquier regulación al alza o a la baja que se pretenda de la expresión del transgén utilizando promotores constitutivos (p. ej., aquellos basados en CaMV35S), o utilizando promotores que pueden dirigir la expresión génica a células, tejidos particulares (p. ej. el promotor napin, para expresión de transgenes en cotiledones de semilla en desarrollo), órganos particulares (p. ej. raíces), a una etapa del desarrollo particular, o en respuesta a un estímulo externo particular (p. ej., un choque térmico).
- Promotores para uso en la presente memoria pueden ser inducibles, constitutivos o específicos de tejido, o pueden tener varias combinaciones de dichas características. Los promotores que son útiles incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos, p. ej., el promotor 35S del virus del anillo grabado del clavel (CERV), del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), o más particularmente el promotor del virus del mosaico de la coliflor doblemente mejorado, que comprende dos promotores CaMV 35S en tándem (referido como un promotor "35S Doble").
- En algunas circunstancias se puede desear el uso de un promotor específico de tejido o regulado por el desarrollo en lugar de un promotor constitutivo. Un promotor específico de tejido permite la sobreexpresión en ciertos tejidos sin afectar la expresión en otros tejidos. A modo ilustrativo, un promotor ACP es un promotor utilizado en la sobreexpresión de enzimas en tejido de semillas, tal y como se describe en la PCT International Publication WO 92/18634, publicada el 29 de octubre de 1992.
- El promotor y las regiones reguladoras terminadoras pueden ser funcionales en la célula de la planta huésped y pueden ser heterólogas (esto es, que no ocurren naturalmente) u homólogas (derivadas de la especie de planta huésped) para la célula de la planta y el gen. Los promotores adecuados que se pueden utilizar se han descritos anteriormente.
- La región reguladora terminadora se puede derivar de la región 3' del gen a partir del cual se obtuvo el promotor o a partir de otro gen. Las regiones terminadoras adecuadas que se pueden utilizar son bien conocidas en la técnica e incluyen el terminador de la nopalina sintasa (Tnos) de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador de la manopina sintasa (Tmas) de *A. tumefaciens* y el terminador 35S (T35S) de CaMV, la región terminadora de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa (TrbcS) de guisante o la región terminadora de Tnos. Se pueden cribar adecuadamente la actividad de dichas construcciones genéticas y los niveles incrementados de isoprenoides mediante la transformación en una planta huésped mediante *Agrobacterium*.
- Adecuadamente, las secuencias de nucleótidos de los genes se pueden extraer de la base de datos de nucleótidos GenBank® (una marca registrada del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.) y se pueden utilizar para buscar enzimas de restricción que no corten. Se pueden añadir a los genes estos sitios de restricción mediante métodos convencionales tales como incorporar estos sitios en cebadores de PCR o mediante subclonaje.
- Preferiblemente, una construcción de ADN para uso en la presente memoria está comprendido dentro de un vector, lo más adecuadamente un vector de expresión adaptado para la expresión en una célula (de planta) hospedadora apropiada. Se apreciará que cualquier vector que sea capaz de producir una planta que comprenda la secuencia de ADN introducida será suficiente.
- Los vectores que son adecuados son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica y están descritos en referencias técnicas generales tales como Pouwels *et al.*, Cloning Vectors. A Laboratory Manual, Elsevier, Amsterdam (1986). Los vectores particularmente adecuados incluyen los vectores del plásmido Ti.
- Las técnicas de transformación para introducir las construcciones de ADN en las células huésped son bien conocidas en la técnica e incluyen tales métodos como microinyección, usar polietilenglicol, electroporación, penetración balística de alta velocidad, o transformación mediada por *Agrobacterium*. Tras la transformación de las células de la planta o de la planta, se pueden seleccionar aquellas células de la planta o plantas dentro de las cuales se ha incorporado el ADN deseado mediante métodos tales como la resistencia a antibióticos, resistencia a herbicidas, tolerancia a análogos de aminoácido, o utilizando marcadores fenotípicos.

Se pueden utilizar varios ensayos para determinar si la célula de la planta muestra un aumento en la expresión del gen, por ejemplo, la detección mediante Northern blot o PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT-PCR). Se pueden regenerar plantas transgénicas completas a partir de células transformadas mediante métodos convencionales. Dichas plantas transgénicas que tienen niveles mejorados de isoprenoides se pueden propagar y autopolinizar para producir líneas homocigotas. Dichas plantas producen semillas que contienen los genes para el rasgo introducido y se pueden hacer crecer para producir plantas que producirán el fenotipo seleccionado.

Las plantas particularmente preferidas para modificación de acuerdo con la descripción presente incluyen *Arabidopsis thaliana*, borraja (*Borago* spp.), Canola, ricino (*Ricinus communis*) (*Ricinus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*) (*Theobroma* spp.), maíz (*Zea mays*) (*Zea* spp.), algodón (*Gossypium* spp.), *Crambe* spp., *Cuphea* spp., lino (*Linum* spp.), *Lesquerella* spp. y *Limnanthes* spp., Linola, capuchina (*Tropaeolum* spp.), soja (*Glycine* spp. y *Soja* spp.), girasol (*Helianthus* spp.), tabaco (*Nicotiana* spp.), *Vernonia* spp., trigo (*Triticum* spp.), cebada (*Hordeum* spp.), arroz (*Oryza* spp.), avena (*Avena* spp.), sorgo (*Sorghum* spp.), centeno (*Secale* spp.) u otros miembros de la familia de plantas *Gramineae*.

Algunas realizaciones se utilizan para modificar el rendimiento o la composición del aceite de semillas producido a partir de cultivos oleaginosos. Los cultivos oleaginosos son especies de plantas que son capaces de generar aceites comestibles o útiles industrialmente en rendimientos comercialmente importantes, e incluyen muchas de las especies de plantas enumeradas anteriormente. Dichos cultivos oleaginosos son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En un ejemplo, se hacen crecer plantas transformadas con una secuencia de nucleótidos que codifica para una DGAT2. Se recolectan semillas de las plantas transgénicas y se extraen ácidos grasos de las semillas. Los ácidos grasos extraídos se utilizan para su incorporación subsecuente en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, una composición nutricional o una composición alimentaria.

En ciertas realizaciones, se pueden utilizar con la planta a transformar otros métodos para aumentar o alterar la producción de aceite (p. ej., incorporar, para su expresión en la planta, una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que tiene, por ejemplo, actividad piruvato deshidrogenasa quinasa de Brassica (ver, p. ej., Patente de EE.UU. 7.214.859 de Marilla, *et al.* (8 de mayo de 2007), Patente de EE.UU. 6.500.670 de Zou, *et al.* (diciembre de 2002), y Patente de EE.UU. 6.256.636 de Randall, *et al.* (julio de 2001), una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que tiene actividad diacilglicerol aciltransferasa (ver, p. ej., Patente de EE.UU. 7.015.373 y Patente de EE.UU. 6.500.670 de Zou, *et al.* (diciembre de 2002), y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que tiene actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (ver, p. ej., Patente de EE.UU. 7.112.724 y combinaciones de las mismas).

Las realizaciones son susceptibles de varias modificaciones y formas alternativas además de aquellos ejemplos específicos descritos en detalle en la presente memoria. Por tanto, las realizaciones no se limitan a las formas particulares descritas. Más bien, el objetivo de la descripción abarca todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas que se comprenden dentro de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Manipulación de ADN

Se utilizaron métodos y procedimientos estándar para la preparación de ADN, la propagación de plásmidos y el aislamiento (Sambrook, *et al.*, 1989). La secuenciación se realizó en un Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System utilizando el Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.). Se compararon las secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducidas con secuencias disponibles en bancos de datos utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Se identificaron los clones de la DGAT2 en base a la homología con otros genes de diacilglicerol aciltransferasa de ácidos grasos en las bases de datos de nucleótidos y proteínas de NCBI como se conoce en la técnica.

Ejemplo 2: Triacilglicerol (TAG) formado *in vivo* en levaduras transformadas mediante la expresión de TpDGAT2

Se insertó el gen DGAT2 en pYES2.1 (Invitrogen). Se confirmó la construcción mediante secuenciación y se utilizó pYES2.1/TpDGAT2 para transformar la cepa H1246 MAT – α de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta cepa mutante es un mutante cuádruple (DGAT -, PDAT -, ASAT -, ASAT2 -). Se aisló ADN del plásmido a partir de transformantes putativos y se confirmó la presencia de pYES2.1/TpDGAT2 mediante análisis Southern. Se utilizaron transformantes H1246 MAT – α que contenían únicamente el vector (pYES2.1) como control. H1246 MAT – α transformadas con DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* sirvieron como control positivo.

Se cultivaron colonias individuales durante la noche en 20 ml de medio SD (medio de Dextrosa Sintética con glucosa y sin uracilo, como se describe en Ausubel, *et al.* 1995, Vol. 2, p. 13.1.3) en un agitador rotatorio (270 rpm) a 28°C. Se formó un pellet de células a partir del cultivo durante la noche y se resuspendió en 50 ml de medio para la inducción de la expresión (medio SD que contiene galactosa y sin uracilo). Se volvieron a incubar las células a 28°C, con agitación a 270 rpm, y se recolectaron después de cuatro a seis horas. Se recolectaron levaduras

transformantes inducidas por GAL mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min. y se resuspendieron en 100 mM Hepes NaOH, pH 7,4, que contenía 1 mM EDTA y 1 mM DTT.

En referencia a la FIG. 9, no se produjo TAG en el vector vacío, control negativo (carril 8), mientras que el control positivo (carril 1) mostró una banda de TAG. Cada uno de los vectores que contenían DGAT2 (carriles 2 - 6) mostró una banda de TAG que confirmó que DGAT2 tiene la capacidad de sintetizar TAG. El carril a la derecha del carril 8 se cargó con un estándar de TAG que se utilizó como un marcador de TAG.

Ejemplo 3: Preferencia de sustrato de la DGAT2

Se prepararon lisados de células utilizando bolas de cristal lavadas con ácido como se describe en Ausubel, *et al.*, (1995). Se midió la proteína en los lisados de levadura utilizando el ensayo de Bradford (1976), se normalizaron los niveles de proteína en cada lisado y se realizaron ensayos de actividad de DGAT2 de alícuotas (250 µg de proteína).

Los ensayos de DGAT se llevaron a cabo a pH 7,4, con agitación a 100 rev/min en un baño de agua a 30°C durante 10 min. Las mezclas de ensayo (0,5 ml de volumen final) contenían 100 µg de lisado de proteína, 90 mM de HEPES-NaOH, 200 µM de *sn*-1,2 dioleína, y 18 µM de ¹⁴C Acil-CoAs (actividad específica 2 nCi/nmol) como el donante de acil. Los TAGs marcados con ¹⁴C se aislaron mediante TLC en placas de gel G de sílice desarrolladas en hexano:diétiléter:ácido acético (70:30:1 v/v/v), las bandas de TAG radiomarcado se visualizaron en un escáner de radio-TLC Bioscan AR-2000 utilizando el programa Win-Scan 2D[®] (Bioscan Inc., Washington D.C., EE.UU.) y las bandas se rascaron y cuantificaron como se describe en Taylor, *et al.* (1991).

Ejemplo 4: Composición de ácidos grasos de los transformantes TpDGAT2

Se transformó la cepa H1246 MAT – α de *S. cerevisiae* con *A. thaliana*/pYES2.1 o *T. pseudonana*/pYES2.1. Los transformantes se hicieron crecer durante 3 días a 28°C y se indujeron mediante galactosa. Los transformantes se trataron o con nada (control), o con 50 µM DHA o con 150 µM DHA. El perfil de ácidos grasos en base al análisis de cromatografía de gas convencional de tres transformantes que contienen AtDGAT1/pYES2.1 y tres transformantes que contienen TpDGAT2/pYES2.1 se muestran en la Tabla 1.

Los ácidos grasos se identificaron como 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 (ácido oleico), y 22:6 (DHA); y la composición de cada uno se presenta como un porcentaje del total de ácidos grasos. La expresión de DHA aumentó desde cero en la cepa control hasta 6,01% en la TpDGAT2/pYES2.1 de 150µM y fue más del doble que aquella de AtDGAT/pYES2.1 de 150 µM (Tabla 1). Estos resultados confirman además que TpDGAT2 utiliza ácidos grasos DHA más eficientemente que DGAT1.

En términos de composición de ácidos grasos, las líneas mutantes que contienen ADnc de DGAT2 mostraron una disminución en los saturados totales, y un aumento en los insaturados como se muestra en la Tabla 1. Dichos cambios van todos hacia un perfil de aceite “más saludable” y se pueden aplicar directamente a Canola, otras oleaginosas en las *Brassicaceae* y otros cultivos oleaginosos comestibles para producir mejoras similares en la composición de aceite.

Tabla1. Composición de ácidos grasos de TAG expresados mediante DGAT2 y DGAT1 en la levadura mutante H1246 MAT – α.

Tratamiento	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	%22:6	Composición de ácidos grasos	
						% Sat.	% Insat.
AtDGAT/pYES2.1 – sin alimentación	13,93	35,71	17,84	32,51	0,00	31,78	68,22
AtDGAT/pYES2.1 – 50 µM DHA	19,68	27,54	16,51	34,82	1,46	36,18	62,36
AtDGAT/pYES2.1 – 150 µM DHA	19,24	27,83	15,21	35,08	2,63	34,45	62,91
TpDGAT2/pYES2.1 – sin alimentación	10,03	30,23	13,83	45,90	0,00	23,87	76,13
TpDGAT2/pYES2.1 – 50 µM DHA	6,43	35,39	8,49	45,07	4,62	14,92	80,47
TpDGAT2/pYES2.1 – 150 µM DHA	5,77	31,73	11,57	44,93	6,01	17,34	76,66

Ejemplo 5: Sobreexpresión del ADNc de DGAT2 en *A. thaliana* silvestre

Se utiliza el ADNc de tamaño completo de DGAT2 como un molde para la amplificación por PCR. Se escinde un fragmento mediante digestión con endonucleasa de restricción y se liga en los sitios correspondientes de un vector. La integridad de la construcción se confirma mediante secuenciación.

- 5 El vector se introduce en *A. tumefaciens*, utilizado para transformar *A. thaliana* silvestre, y se analiza mediante la progenie.

Ejemplo 6: Construcción del vector de transformación de plantas de ADNc de DGAT2 para la expresión específica en semillas

- 10 Se utiliza el ADNc de tamaño completo de DGAT2 como un molde para la amplificación por PCR con cebadores para proporcionar nuevos sitios de restricción en cada extremo de la secuencia. El perfil de la PCR es como sigue: 94°C 1 minuto; 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto; y 72°C 5 minutos. El producto de PCR es entonces ligado dentro del vector de PCR 2.1 (Invitrogen). Se escinde un fragmento y se liga dentro de los sitios correspondientes de un vector. La integridad de la construcción se confirma mediante secuenciación.

Ejemplo 7: Transformación de *Agrobacterium* con construcciones de vector de DTAG2 de planta

- 15 Se preparan las células de *Agrobacterium* electrocompetentes, cepa GV3101 (pMP90), como sigue: se hace crecer un cultivo de *Agrobacterium* 24 a 48 horas en 2YT, y cuando la absorbancia a 600 nm alcanza 0,5 a 0,7, se enfrían las células en hielo y se forma un pellet mediante centrifugación (5.000 x g, 10 minutos en un rotor GSA a 4°C). El pellet se lava en 1, 0,5 y 0,02 volúmenes de glicerol 10% estéril frío y se resuspende en 0,01 volúmenes de glicerol 10% frío. Entonces, las células electrocompetentes se congelan en N₂ líquido y se almacenan a -70°C.
- 20 *Agrobacterium* se transforman mediante electroporación con 20 – 50 ng de ADN de transformación de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se siembran en placas en medio selectivo (LB con 50 µg/ml de kanamicina) y se incuban durante la noche a 28°C. Las células transformantes individuales se hacen crecer durante la noche (28°C, 225 rpm) en 5 ml de LB con 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de gentamicina. Se realizan extracciones y purificaciones de ADN. La fidelidad de la construcción se vuelve a verificar mediante secuenciación de ADN antes de la transformación de la planta.
- 25

Ejemplo 8: Transformación de *Arabidopsis thaliana*

- 30 Se hacen crecer semillas de *A. thaliana* a 22°C bajo iluminación fluorescente (120 µE·m⁻²S⁻¹) en un régimen de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Se cultivaron de cuatro a seis plantas en un tiesto de 10 cm² en TERRA-LITE REDI-EARTH húmeda (W. R. Grace & Co. Canadá Ltd. Ajax, ON, Canadá). Para prevenir que la mezcla de tierra del tiesto caiga en el medio de inoculación, la tierra se amontona a modo de plataforma con las semillas sembradas en lo alto, y todo el tiesto se cubre con una tela mosquitera de nailon y se asegura con una goma elástica. Las plantas se infiltran al vacío con una suspensión de *Agrobacterium* cuando las primeras flores comienzan a abrirse.

- 35 Para hacer crecer *Agrobacterium*, se cultiva durante la noche a 28°C una suspensión de 5 ml en medio LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de gentamicina. El día anterior a la infiltración, este "cultivo semilla" se divide en cuatro matraces que contienen 250 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de gentamicina. Estos cultivos se hacen crecer durante la noche a 28°C. En la mañana siguiente se comprueba la absorbancia a 600 nm (aproximadamente = 1,0), se recolectan las células mediante centrifugación (5.000 x g, 10 minutos en un rotor GSA a temperatura ambiente) y se resuspenden en el medio de infiltración (5% sacarosa; 0,005% Silwet-77 en agua) para obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,8.

- 40 La suspensión de *Agrobacterium* se vierte en un matraz y las plantas cultivadas en tiestos se invierten dentro del matraz de modo que las flores y los tallos florales se sumergen. El matraz se sitúa dentro de una campana de cristal y se realiza vacío utilizando una bomba de vacío, hasta que se forman burbujas en la superficie del tallo y la disolución comienza a burbujear ligeramente, y entonces se libera el vacío rápidamente. El tiempo y presión necesarios variará de un montaje de laboratorio a otro, pero una buena infiltración es visiblemente aparente como un tejido empapado en agua uniformemente oscurecido. Se quitan los tiestos del matraz, se sitúan de lado en una bandeja de plástico y se cubren con una cúpula de plástico, para mantener la humedad. El día siguiente, las plantas se descubren, se sitúan en posición vertical y se dejan crecer durante aproximadamente cuatro semanas en una cámara de cultivo bajo condiciones de luz continua, tal y como se describe en Katavic, *et al.*, (1995). Cuando las silicuas maduran y se secan, se recogen las semillas y se realiza una selección de transformantes positivos.

50 Ejemplo 9: Transformación de *Brassica napus*

La transformación se realiza esencialmente como describen Moloney, *et al.*, 1989, Plant Cell Reports 8:238 – 242.

- 55 Para los estudios de transformación se utiliza la cepa GV3101/pMP90 de *A. tumefaciens* (Koncz C. y Schell, J., 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383 – 396). Se recolecta un cultivo bacteriano en fase estacionaria en caldo de cultivo LB (Difco, EE.UU.) (100 ml) mediante centrifugación y se resuspende en 10 ml de caldo de cultivo LB fresco con 1% de DMSO (dimetil sulfoxido) (Sigma, EE.UU.) como un crioprotector. Se almacenan alícuotas de 200 µl a -20°C

hasta su uso para transformación, en donde se añade una alícuota de bacteria a 2 ml de Caldo de Cultivo de Infusión de Cerebro y Corazón (Difco, EE.UU.) que contiene un 2% de sacarosa, 50 µM de acetosiringona, pH 5,6 y se incuba durante la noche a 28°C. La densidad de células bacterianas es aproximadamente 1×10^9 células por ml.

5 Se exponen explantes de cotiledón a *Agrobacterium* que contiene el vector de transformación de planta de acuerdo con el método de Moloney, *et al.* (1989), Plant Cell Rep 8:238 – 242. La superficie de corte del peciolo de los explantes se sumerge brevemente en el cultivo de bacterias. Los explantes se insertan en el medio de co-cultivo de modo que la superficie de corte está en contacto con el medio. Se colocan diez explantes en cada placa de Petri de 100 x 15 mm. Las placas de co-cultivo se sellan con plástico de envolver STRETCH'N SEAL™. Las placas se incuban durante tres días en una cámara de crecimiento con condiciones de temperatura y fotoperiodo, como
10 anteriormente, respecto a la etapa de germinación de las semillas. Los explantes se transfieren entonces al medio de selección.

Tras 3 o 4 semanas en el medio de selección, los brotes verdes que se regeneran (transformantes putativos) se escinden y se transfieren a un medio de selección fresco para un crecimiento continuado. Cuando los brotes verdes consiguen una longitud de 1,5 – 2,0 cm se transfieren a un medio de enraizamiento. Los brotes transgénicos
15 putativos se criban para detectar la expresión del gen *gus* esencialmente como describe Jefferson, R. A. (1987), Plant Mol. Biol. Rep. 5:387 – 405. La presencia de una mancha azul se considera como una prueba de la transformación.

La confirmación de la transformación se establece mediante selección con kanamicina, Southern blots, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y análisis de progenie.

20 Ejemplo 10: Selección de transformantes putativos (plantas transgénicas) y análisis de plantas transgénicas

Las semillas se recolectan en masa para cada construcción. Se esteriliza la superficie de las semillas sumergiéndolas en una disolución que contiene un 20% de lejía y 0,01% de Triton X-100 durante 20 minutos, seguido de tres lavados con agua estéril. Las semillas esterilizadas se cultivan en placas volviéndolas a suspender en fitoagar al 0,1% estéril a temperatura ambiente (alrededor de 1 ml de fitoagar por cada 500 – 1.000 semillas), y
25 aplicando un volumen que contiene 2.000 – 4.000 semillas en una placa de selección con kanamicina de 150 x 15 mm. Las placas se incuban durante dos días en frío sin luz, y se hacen crecer durante siete a diez días en un ambiente controlado (22°C bajo iluminación fluorescente ($120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en un régimen de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad). El medio de selección contiene 1/2 de medio MSG, 0,8% de fitoagar, 3% de sacarosa, 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de Timentin. Las placas de Petri y las tapas se sellan con un esparadrado Micropore™ (3M Canadá, London, ON, Canadá). Tras siete a diez días, las plantas resistentes a antibiótico que tienen hojas verdes y raíces bien consolidadas dentro del medio se identifican como transformantes, y en la etapa de tres a cinco hojas, los transformantes seleccionados se trasplantan en semilleros rellenos con una mezcla de tierra muy húmeda. Los transformantes se hacen crecer hasta la madurez y la semillas maduras (generación T₂ tal y como se define en
30 Katavic, *et al.* (1994)) de las plantas individuales se recolectan, y después se analizan.

Se aísla ADN genómico a partir de plantas individuales T₁. Se realiza una amplificación por PCR para confirmar la presencia del ADNc o del gen, respectivamente, en los transformantes T₁. Se realizan análisis Southern para seleccionar los transformantes que contienen una sola copia del fragmento insertado. Las muestras de ADN se digieren con enzimas de restricción, y se determinan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se realizan Southern blots utilizando un filtro de nailon (Hybond-N+, Ámsterdam). El fragmento de ADNc DGAT2, marcado con
40 α -[³²P] dCTP (NEN/DuPont), se utiliza como una sonda. La hibridación se realiza a 60°C. El filtro se expone entonces a una película Kodak X-OMAT-AR.

Referencias

- Ausubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, y K. Stuhl, eds (1995). Current Protocols in Molecular Biology, Vols 1, 2, y 3. Wiley, New York.
- 45 Bechtold N., J. Ellis, y G. Pelletier (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences 316:1194-1199.
- Becker D., R. Brettschneider y H. Lorz (1994). Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. Plant J. 5:299-307.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- 50 Budziszewski G.J., K.P.C. Croft, y D.F. Hildebrand (1996). Uses of biotechnology in modifying plant lipids. Lipids 31:557-569.
- Datla R., J.W. Anderson, y G. Selvaraj (1997). Plant promoters for transgene expression. Biotechnology Annual Review 3:269-296.

DeBlock M., D. DeBrouwer, y P. Tenning (1989). Transformation of Brassica napus and Brassica oleracea using Agrobacterium tumefaciens and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol. 91:694-701.

5 Jefferson R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405.

Katavic V., G.W. Haughn, D. Reed, M. Martin, y L. Kunst (1994). In planta transformation of Arabidopsis thaliana. Mol. Gen. Genet. 245:363-370.

Listado de secuencias

10 <110> National Research Council Canada, Plant Biotechnology Institute and Dow
AgroSciences LLC
Zou, Jitao
Xu, Jingyu
Zheng, Zhifu

<120> Gen de la diacilglicerol aciltransferasa 2 procedente de algas

15 <130> 3015-8471US

<160> 64

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

20 <211> 456

<212> PRT

<213> T. pseudonana

<400> 1

```

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

```

ES 2 610 482 T3

Val Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro
 225 230 235 240
 Glu Arg Gly His Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala
 245 250 255
 Thr Ala Thr Lys Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met
 260 265 270
 Asn Gly Val Asp Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro
 275 280 285
 Pro Tyr Thr Ser Asp His Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Pro Gly Gly
 290 295 300
 Ile Ala Glu Met Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn
 305 310 315 320
 Asp Glu Ala Ala Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala
 325 330 335
 Met Lys His Lys Leu Pro Ile Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr
 340 345 350
 Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Glu Thr Leu Ser
 355 360 365
 Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu
 370 375 380
 Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Leu
 385 390 395 400
 Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly
 405 410 415
 Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys
 420 425 430
 Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp
 435 440 445
 Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val
 450 455

<210> 2

<211> 1432

<212> DNA

<213> T. pseudonana

<400> 2

```

atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta 60
ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc 120
tcgtcgttga ttgtcgttgg atctcccgtt tggttctacg gaggcatcat ttatttttac 180
aggaagtggg agaagtatcg ttctcttgct gctgctactg aggctcgcag acatgagagt 240
ggtggcggtg gtgcacatgc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct 300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag 360
acacaaacac aatcacatcg acaacaaaca gagcaataca acaactacaa acgattagca 420
acaagatacg gagtagcact cgtcgtcaatc atttctcatat ccatctgggg gcctcatcgt 480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtggga tgcattggtg 540
aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa 600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtttg acatacacac atctccatca 660
atcttcgcat ctgtaccoca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctacc 720
gaacgaggac acgaacaaac atggggcttc ttccgaccag tcggtgcaac agccaccaaa 780
ctctttccgc tggtagaac cttcatttct tggatgaacg gagtggatgc ttcgcttccg 840
gcggtgtctc gtgctcttgc tcctccgat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt 900
tcgcccggtg gtattgcca gatgtttgag acgtatccaa agccgggggt tcatccta 960
gacgaggcag cattgttaaa agatcggaaat ggattgttca agcttgcatg gaacacaag 1020
ctgccgattg ttccgggtga ctgctttgga gctacaaaaga tgttgagacg agtgcaatta 1080
cctgcgtttg tggagacggt gagcagaatg ctcaagatca gtctttggtt attccttgg 1140
aagcttgggt tgcctattcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacggtg 1200
tttctcctc tgcgagaga tggcgtgaa acttctatga tggaggagg agagaattt 1260
gatgaacgag tgaacagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag 1320
cgaacaaaag accactcagg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag 1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaag ccacagacca cacaggcaca aa 1432
  
```

5

ES 2 610 482 T3

<210> 3
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Mutante de K171R

<400> 3
 Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
 1 5 10 15
 Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu
 20 25 30
 Val Asp Arg Leu Leu Val Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Val Gly Ser
 35 40 45
 Pro Val Trp Phe Tyr Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Tyr Arg Lys Trp Lys
 50 55 60
 Leu Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Ala Thr Phe Ala Ala Arg His Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Thr Val Arg Cys Arg Gly Thr Arg Gln
 85 90 95
 Arg Thr Ser Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Gly Glu Ser
 100 105 110
 Ser Gln Glu Met Asn Glu Gln Glu Thr Gln Thr Gln Ser His Arg Gln
 115 120 125
 Gln Thr Glu Gln Tyr Asn Asn Tyr Lys Arg Leu Ala Thr Arg Tyr Gly
 130 135 140
 Val Ala Lys Ala Ala Ile Ile Lys Ile Ser Ile Trp Gly Pro His Arg
 145 150 155 160
 Asp Lys Arg Val Gly Glu Trp Leu Gly Val Arg Lys Trp Arg Leu Trp
 165 170 175
 Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Gly Phe Thr Val Leu Lys Asp Asn Gly
 180 185 190

ES 2 610 482 T3

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

<210> 4
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de K171R

<400> 4

10

atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta

60

ES 2 610 482 T3

```

ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc 120
tcgtcgttga ttgtcgttgg atctcccgtt tggttctacg gaggcacatc ttatttttac 180
aggaagtgga agaagtatcg ttctcttgct gctgctactg aggctgctgag acatgagagt 240
ggtggcggtg gtgcatcgtc aacggttcgt tgacagagga cagctcaacg tacatcgtct 300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag 360
acacaaaacac aatcacatcg acaacaaaaca gagcaataca acaactacaa acgattagca 420
acaagatacg gagtagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt 480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aggaagtgga gattgtggga tgcatgggtg 540
aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa 600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtgtg acatacacac atctccatca 660
atcttcgcat tcgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctaccc 720
gaacgaggac acgaacaaac atgggggtctc ttccgaccag tcggtgcaac agccacacaa 780
ctctttccgc tggtagcaac ctctcattctc tggatgaacg gagtggatgc ttcgcggtcg 840
gcggtgtctc gtgctcttgc tcctccgtat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt 900
tcgcccggtg gtattgccga gatgtttgag acgtatccaa agccggggtt tcataccta 960
gacgaggcag cattgttaaa agatcggaaat ggattgttca agcttgcgat gaaacacaag 1020
ctgccgattg ttccgggtgta ctgctttgga gctacaaaga tgttgagacg agtgcaatta 1080
cctgcgtttg tggagacgtt gagcagaatg ctcaagatca gtctttgttt attctttgga 1140
aagcttgggt tgccctattcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacggtg 1200
tttctcctc tgccgagaga tggcgtgaac acttctatga tgggaaggagg agaagaattt 1260
gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag 1320
cgaacaaaag accactacgg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag 1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaag ccacagacca cacaggcaca aa 1432

```

<210> 5

<211> 456

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mutante de F224Y

<400> 5

```

Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
1          5          10          15

Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu
20          25          30

Val Asp Arg Leu Leu Val Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Val Gly Ser
35          40          45

Pro Val Trp Phe Tyr Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Tyr Arg Lys Trp Lys
50          55          60

Leu Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Ala Thr Phe Ala Ala Arg His Glu Ser
65          70          75          80

Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Thr Val Arg Cys Arg Gly Thr Arg Gln
85          90          95

Arg Thr Ser Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Gly Glu Ser
100         105         110

Ser Gln Glu Met Asn Glu Gln Glu Thr Gln Thr Gln Ser His Arg Gln
115         120         125

Gln Thr Glu Gln Tyr Asn Asn Tyr Lys Arg Leu Ala Thr Arg Tyr Gly
130         135         140

10 Val Ala Lys Ala Ala Ile Ile Lys Ile Ser Ile Trp Gly Pro His Arg

```

ES 2 610 482 T3

145	150	155	160
Asp Lys Arg Val Gly Glu Trp Leu Gly Val Lys Lys Trp Arg Leu Trp	165	170	175
Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Gly Phe Thr Val Leu Lys Asp Asn Gly	180	185	190
Asp Asp Asp His Thr Ile Ile Glu Thr Asn Pro His Ser Ala Ile Pro	195	200	205
Asn Gln Glu Glu Phe Asp Ile His Thr Ser Pro Ser Ile Phe Ala Tyr	210	215	220
Val Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro	225	230	235
Glu Arg Gly His Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala	245	250	255
Thr Ala Thr Lys Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met	260	265	270
Asn Gly Val Asp Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro	275	280	285
Pro Tyr Thr Ser Asp His Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Pro Gly Gly	290	295	300
Ile Ala Glu Met Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn	305	310	315
Asp Glu Ala Ala Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala	325	330	335
Met Lys His Lys Leu Pro Ile Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr	340	345	350
Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Glu Thr Leu Ser	355	360	365
Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu	370	375	380
Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Leu	385	390	395
Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly	405	410	415
Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys	420	425	430
Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp	435	440	445
Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val	450	455	

<210> 6
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de F224Y

ES 2 610 482 T3

<400> 6

```

atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta      60
ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc      120
tcgctggtga ttgctggttg atctcccgtt tggttctacg gaggcacatc ttatttttac      180
aggaagtgga agaagtatcg ttctcttctg gctgctactg aggctgcgag acatgagagt      240
ggtggcggtg gtgcatcgtc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct      300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag      360
acacaacac aatcacatcg acaacaacaa gagcaataca acaactacaa acgattagca      420
acaagatacg gactagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt      480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtggga tgcattggtg      540
aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa      600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtgtt acatacacac atctccatca      660
atcttcgcat acgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctaccc      720
gaacgaggac acgaacaaac atggggctctc ttccgaccag tcggttgcaac agccacaaa      780
ctctttccgc tggtagcaac ctctcatttt tggatgaacg gagtggatgc ttcgcggttcg      840
gcggtgtctc gtgctcttgc tcctccgtat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt      900
tcgcccggtg gtattgccga gatggttgag acgtatccaa agccgggggtt tcatccta      960
gacgaggcag cattgttaaa agatcggatg ggattgttca agcttgcgat gaaacacaag     1020
ctgccgattg ttccgggtgta ctgctttgga gctacaaaga tgttgagacg agtgcaatta     1080
cctgcgtttg tggagacggt gagcagaatg ctcaagatca gtctttgttt attctttgga     1140
aagcttgggt tgctatttcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacggtg     1200
tttctctctc tggcagagaga tggcgtgaac acttctatga tgggaaggagg agaagaat      1260
gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag     1320
cgaacaaaag accactacgg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag     1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaaag ccacagacca cacaggcaca aa              1432

```

<210> 7

<211> 456

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Mutante de V298I

<400> 7

```

Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
 1          5          10          15

Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu
          20          25          30

Val Asp Arg Leu Leu Val Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Val Gly Ser
          35          40          45

Pro Val Trp Phe Tyr Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Tyr Arg Lys Trp Lys
          50          55          60

Leu Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Ala Thr Phe Ala Ala Arg His Glu Ser
          65          70          75          80

Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Thr Val Arg Cys Arg Gly Thr Arg Gln
          85          90          95

Arg Thr Ser Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Gly Glu Ser
          100          105          110

```

10

ES 2 610 482 T3

Ser Gln Glu Met Asn Glu Gln Glu Thr Gln Thr Gln Ser His Arg Gln
 115 120 125

Gln Thr Glu Gln Tyr Asn Asn Tyr Lys Arg Leu Ala Thr Arg Tyr Gly
 130 135 140

Val Ala Lys Ala Ala Ile Ile Lys Ile Ser Ile Trp Gly Pro His Arg
 145 150 155 160

Asp Lys Arg Val Gly Glu Trp Leu Gly Val Lys Lys Trp Arg Leu Trp
 165 170 175

Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Gly Phe Thr Val Leu Lys Asp Asn Gly
 180 185 190

Asp Asp Asp His Thr Ile Ile Glu Thr Asn Pro His Ser Ala Ile Pro
 195 200 205

Asn Gln Glu Glu Phe Asp Ile His Thr Ser Pro Ser Ile Phe Ala Phe
 210 215 220

Val Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro
 225 230 235 240

Glu Arg Gly His Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala
 245 250 255

Thr Ala Thr Lys Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met
 260 265 270

Asn Gly Val Asp Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro
 275 280 285

Pro Tyr Thr Ser Asp His Pro Gly Arg Ile Gly Val Ser Pro Gly Gly
 290 295 300

Ile Ala Glu Met Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala
 325 330 335

Met Lys His Lys Leu Pro Ile Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr
 340 345 350

Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Glu Thr Leu Ser
 355 360 365

Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu
 370 375 380

Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Leu
 385 390 395 400

Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly
 405 410 415

Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys
 420 425 430

Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp
 435 440 445

Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val
 450 455

<210> 8
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

ES 2 610 482 T3

<220>

<223> Mutante de V298I

<400> 8

```

atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta      60
ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc      120
tcgtcgttga ttgtcgtttg atctcccgtt tggttctacg gaggcacatc ttatttttac      180
aggaagtgga agaagtatcg ttctcttgct gctgctactg aggctgcgag acatgagagt      240
ggtggcggtg gtgcatcgtc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct      300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag      360
acacaaacac aatcacatcg acaacaacaa gagcaataca acaactacaa acgattagca      420
acaagatacg gagtagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt      480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtggga tgcattggtg      540
aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa      600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtttg acatacacac atctccatca      660
atcttcgcat tcgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctacc      720
gaacgaggac acgaacaac atgggggtctc ttccgaccag tcggtgcaac agccacaaa      780
ctctttccgc tggtagaac ctctatttct tggatgaacg gagtggatgc ttcgcgttcg      840
gcggtgtctc gtgctcctgc tcctccgtat accagtgatc atccgggaag aatcggagtt      900
tcgcccggtg gtattgccga gatgtttgag acgtatccaa agccgggggt tcatacctaat      960
gacgagggcag cattgttaaa agatcggatg ggattgttca agcttgcatg gaaacacaag     1020
ctgccgattg ttccgggtgta ctgctttgga gctacaaaga tgttgagacg agtgcaatta     1080
cctgcgtttg tggagacggt gagcagaatg ctcaagatca gtctttgttt attctttgga     1140
aagcttgggt tgccatttcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacgttg     1200
tttctcctc tgcagagaga tggcgtgaac acttctatga tgggaaggagg agaagaattt     1260
gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag     1320
cgaaacaaag accactacgg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag     1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaaag ccacagacca cacaggcaca aa              1432

```

5

<210> 9

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Mutante de I343L

<400> 9

```

Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
 1                5                10                15

Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu
 20                25                30

Val Asp Arg Leu Leu Val Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Val Gly Ser
 35                40                45

Pro Val Trp Phe Tyr Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Tyr Arg Lys Trp Lys
 50                55                60

```

ES 2 610 482 T3

Leu Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Ala Thr Phe Ala Ala Arg His Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Thr Val Arg Cys Arg Gly Thr Arg Gln
 85 90 95
 Arg Thr Ser Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Gly Glu Ser
 100 105 110
 Ser Gln Glu Met Asn Glu Gln Glu Thr Gln Thr Gln Ser His Arg Gln
 115 120 125
 Gln Thr Glu Gln Tyr Asn Asn Tyr Lys Arg Leu Ala Thr Arg Tyr Gly
 130 135 140
 Val Ala Lys Ala Ala Ile Ile Lys Ile Ser Ile Trp Gly Pro His Arg
 145 150 155 160
 Asp Lys Arg Val Gly Glu Trp Leu Gly Val Lys Lys Trp Arg Leu Trp
 165 170 175
 Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Gly Phe Thr Val Leu Lys Asp Asn Gly
 180 185 190
 Asp Asp Asp His Thr Ile Ile Glu Thr Asn Pro His Ser Ala Ile Pro
 195 200 205
 Asn Gln Glu Glu Phe Asp Ile His Thr Ser Pro Ser Ile Phe Ala Phe
 210 215 220
 Val Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro
 225 230 235 240
 Glu Arg Gly His Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala
 245 250 255
 Thr Ala Thr Lys Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met
 260 265 270
 Asn Gly Val Asp Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro
 275 280 285
 Pro Tyr Thr Ser Asp His Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Pro Gly Gly
 290 295 300
 Ile Ala Glu Met Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn
 305 310 315 320
 Asp Glu Ala Ala Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala
 325 330 335
 Met Lys His Lys Leu Pro Leu Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr
 340 345 350
 Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Glu Thr Leu Ser
 355 360 365
 Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu
 370 375 380
 Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Leu

ES 2 610 482 T3

```

385                390                395                400
Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly
      405                410                415
Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys
      420                425                430
Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp
      435                440                445
Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val
      450                455

```

<210> 10
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de I343L

```

<400> 10
atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta 60
ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc 120
tcgctcgttga ttgtcgttgg atctcccgtt tggttctacg gaggcacatc ttatttttac 180
aggaagtgga agaagtatcg ttctcttgcg gctgctactg aggctgcgag acatgagagt 240
ggtggcgggtg gtgcacgtgc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct 300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag 360
acacaaacac aatcacatcg acaacaaaca gagcaataca acaactaaa acgattagca 420
acaagatacg gagtagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt 480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtgga tgcatggttg 540
aactatgttg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa 600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagttt acatacacac atctccatca 660
atcttcgcat tcgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctaccc 720
gaacgaggag acgaacaaac atgggggtctc ttccgaccag tcggtgcaac agccacaaa 780
ctctttccgc tggtagaac cttcatttct tggatgaacg gagtggatgc ttcgcgttcg 840
gcggtgtctc gtgctccttg tcctccgtat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt 900
tcgcccgggtg gtattgccga gatgtttgag acgtatccaa agccgggggtt tcatccta 960
gacgagcgag cattgttaaa agatcggaat ggattgttca agcttgcgat gaaacacaag 1020
ctgccgcttg ttccgggtgta ctgctttgga gctacaaaga tgttgagacg agtgcaatta 1080
cctgcgtttg tggagacggt gagcagaatg ctcaagatca gtctttggtt attctttgga 1140
aagcttgggt tgcctattcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacggtg 1200
tttctcctc tgccgagaga tggcgtgaac acttctatga tgggaaggagg agaagaattt 1260
gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag 1320
cgaacaaaag accactacg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag 1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaa ccacagacca cacaggcaca aa 1432

```

10 <210> 11
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Mutante de E365K

```

<400> 11
Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
1                5                10                15
Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu

```


ES 2 610 482 T3

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

ES 2 610 482 T3

Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Lys Thr Leu Ser
355 360 365

Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu
370 375 380

Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Leu
385 390 395 400

Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly
405 410 415

Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys
420 425 430

Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp
435 440 445

Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val
450 455

<210> 12
<211> 1432
<212> DNA
<213> Artificial

5

<220>
<223> Mutante de E365K

<400> 12
atgacaacaa agaagcgtcc actaccccgt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta 60
ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc 120
tcgtcgttga ttgtcgtttg atctcccgtt tggttctacg gaggcacatc ttatttttac 180
aggaagtgga agaagtatcg ttctcttgcg gctgctactg aggctgcgag acatgagagt 240
ggtggcggtg gtgcatcgtc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct 300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag 360
acacaaacac aatcacatcg acaacaaaca gagcaataca acaactacaa acgattagca 420
acaagatacg gtagtagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt 480
gacaagcgtg taggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtggga tgcattggtg 540
aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa 600
acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtttg acatacacac atctccatca 660
atcttcgcat tcgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctacc 720
gaacgaggac acgaacaaac atggggctctc ttccgaccag tcggttgcaac agccaccaa 780
ctctttccgc tggtagaac cttcatttct tggatgaacg gagtggatgc ttccgcttcc 840
gcggtgtctc gtgctccttg tcctccgtat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt 900
tcgcccggtg gtattgcccga gatgtttgag acgatccaa agccgggggt tcatccta 960
gacgaggcag cattgttaaa agatcggatg ggattgttca agcttgatg gaaacacaag 1020
ctgccgattg ttccgggtga ctgctttgga gctacaaaga tggtgagacg agtgcaatta 1080
cctgcgtttg tgaagacgtt gagcagaatg ctcaagatca gtctttgttt attctttgga 1140
aagcttgggt tgccatttcc tttccgacag cggctgatgt atgtcatggg caagacgttg 1200
tttctcctc tgccgagaga tggcgtgaac acttctatga tggaggagg agaagaattt 1260
gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag 1320
cgaacaaag accactacg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag 1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaaag ccacagacca cacaggcaca aa 1432

10 <210> 13
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> Mutante de L400I

ES 2 610 482 T3

<400> 13

```

Met Thr Thr Lys Lys Arg Pro Lys Pro Arg His Lys His Leu Pro Pro
1          5          10          15

Gly Val Glu Val Leu Val Ser Pro Pro Pro Tyr Glu Val Cys Thr Leu
20          25          30

Val Asp Arg Leu Leu Val Tyr Ala Ser Ser Leu Ile Val Val Gly Ser
35          40          45

Pro Val Trp Phe Tyr Gly Gly Ile Ile Tyr Phe Tyr Arg Lys Trp Lys
50          55          60

Leu Tyr Arg Ser Lys Ala Ala Ala Thr Phe Ala Ala Arg His Glu Ser
65          70          75          80

Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ser Thr Val Arg Cys Arg Gly Thr Arg Gln
85          90          95

Arg Thr Ser Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Thr Ser Ser Thr Gly Glu Ser
100         105         110

Ser Gln Glu Met Asn Glu Gln Glu Thr Gln Thr Gln Ser His Arg Gln
115         120         125

Gln Thr Glu Gln Tyr Asn Asn Tyr Lys Arg Leu Ala Thr Arg Tyr Gly
130         135         140

Val Ala Lys Ala Ala Ile Ile Lys Ile Ser Ile Trp Gly Pro His Arg
145         150         155         160

Asp Lys Arg Val Gly Glu Trp Leu Gly Val Lys Lys Trp Arg Leu Trp
165         170         175

Asp Ala Trp Leu Asn Tyr Val Gly Phe Thr Val Leu Lys Asp Asn Gly
180         185         190

Asp Asp Asp His Thr Ile Ile Glu Thr Asn Pro His Ser Ala Ile Pro
195         200         205

Asn Gln Glu Glu Phe Asp Ile His Thr Ser Pro Ser Ile Phe Ala Phe
210         215         220

Val Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro
225         230         235         240

Glu Arg Gly His Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala
245         250         255

Thr Ala Thr Lys Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met
260         265         270

Asn Gly Val Asp Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro
275         280         285

Pro Tyr Thr Ser Asp His Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Pro Gly Gly
290         295         300

```

ES 2 610 482 T3

Ile Ala Glu Met Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala
 325 330 335

Met Lys His Lys Leu Pro Ile Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr
 340 345 350

Lys Met Leu Arg Arg Val Gln Leu Pro Ala Phe Val Glu Thr Leu Ser
 355 360 365

Arg Met Leu Lys Ile Ser Leu Cys Leu Phe Phe Gly Lys Leu Gly Leu
 370 375 380

Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Met Tyr Val Met Gly Lys Thr Ile
 385 390 395 400

Phe Pro Pro Leu Pro Arg Asp Gly Val Asn Thr Ser Met Met Glu Gly
 405 410 415

Gly Glu Glu Phe Asp Gly Arg Val Gln Glu Met His Asp Ala Phe Cys
 420 425 430

Asn Glu Ile Thr Arg Ile Phe Glu Arg Asn Lys Asp His Tyr Gly Trp
 435 440 445

Gly Asn Lys Asn Leu Arg Leu Val
 450 455

<210> 14
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de L400I

<400> 14
 atgacaacaa agaagcgtcc actaccccggt catctgcacc ttccacctgg agtagaagta 60
 ctcgtctctc caccacccta cgaagtatgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc 120
 tcgctggtga ttgctggttg atctcccggt tggttctacg gaggcatcat ttatttttac 180
 aggaagtgga agaagtatcg ttctcttgct gctgctactg aggctgcgag acatgagagt 240
 ggtgcccgtg gtgcatcgtc aacggttcgt tgcagaggta cacgtcaacg tacatcgtct 300
 gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aagaaatgaa cgaacaagag 360
 acacaaacac aatcacatcg acaacaaaca gagcaataca acaactaaa acgattagca 420
 acaagatcac gagtagcact cgctgcaatc attctcatat ccatctgggg gcctcatcgt 480
 gacaagcgtg tagggagaatg gctcgggtgc aagaagtgga gattgtggga tgcattggtt 540
 aactatggtg gattcactgt actaaaggac aatggagatg atgaccacac aataatacaa 600
 acgaatccac actcagcaat acccaatcaa gaagagtttg acatacacac atctccatca 660
 atcttcgcat tcgtacccca cggcatcttt cctttcggac tcgccttttc atgtctaccc 720
 gaacgaggac acgaacaaac atggggctctc ttccgaccag tcggttgaac agccacaaa 780
 ctctttccgc tggtagaac ctctatttct tggatgaacg gagtggatgc ttccgcttcg 840
 gcggtgtctc gtgctcttgc tcctccgat accagtgatc atccgggaag agtgggagtt 900
 tcgcccgggtg gtattgccga gatggttgag acgatccaa agccggggtt tcatccta 960
 gacgaggcag cattgttaaa agatcggaaat ggattgttca agcttgatg gaaacacaag 1020
 ctgcccattg ttccgggtgta ctgctttgga gctacaaaga tgttgagacg agtgaatta 1080
 cctgcgtttg tggagacgtt gagcagaatg ctcaagatca gtctttggtt attctttgga 1140
 aagcttgggt tgccatttcc tttccgacag cggtgatgt atgtcatggg caagacgatc 1200
 tttcctctc tgccgagaga tggcgtgaac acttctatga tgggaaggagg agaagaattt 1260
 gatgaacgag tgcaagagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag 1320

cgaacaaag accactacg ttggggtaac aaaaacttga gactcgtatg agagtgtgag 1380
 tgatattcat atgcaactct taacttaaa ccacagacca cacaggcaca aa 1432

10

<210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

ES 2 610 482 T3

<220>

<223> Dominio catalítico

<400> 15

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

5 <210> 16

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> Dominio catalítico

<400> 16

atctttcctt tcggactcgc cttttcatgt ctacccgaac gaggacacga acaaacatgg 60
 ggtctcttcc gaccagtcgt tgcaacagcc accaaactct ttccgctggt acgaaccttc 120
 atttcttggg tgaacggagt ggatgcttcg cgttcggcgg tgtctcgtgc tcttgctcct 180
 ccgtatacca gtgatcatcc gggaagagtg ggagtttcgc ccggtggtat tgccgagatg 240
 tttgagacgt atccaaagcc ggggtttcat cctaatgacg aggcagcatt gttaaaagat 300
 cggaatggat tgttcaagct tgcgatgaaa cacaagctgc cgattgttcc ggtgtactgc 360
 tttggagcta ca 372

<210> 17

<211> 124

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio catalítico del mutante de V298I

ES 2 610 482 T3

<400> 17

```

Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro Glu Arg Gly His
1           5           10           15

Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala Thr Ala Thr Lys
                20           25           30

Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met Asn Gly Val Asp
                35           40           45

Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro Pro Tyr Thr Ser
                50           55           60

Asp His Pro Gly Arg Ile Gly Val Ser Pro Gly Gly Ile Ala Glu Met
65           70           75           80

Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn Asp Glu Ala Ala
                85           90           95

Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala Met Lys His Lys
                100          105          110

Leu Pro Ile Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr
                115          120
  
```

<210> 18

<211> 372

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio catalítico del mutante de V298I

<400> 18

```

atctttcctt tcggactcgc cttttcatgt ctacccgaac gaggacacga acaaacatgg      60
ggctctcttc gaccagtcgt tgcaacagcc accaaactct ttccgctggg acgaaccttc      120
atttcttgga tgaacggagt ggatgcttcg cgttcggcgg tgtctcgtgc tcttgctcct      180
ccgtatacca gtgatcatcc gggaagaatc ggagtttcgc ccggtggtat tgccgagatg      240
tttgagacgt atccaaagcc ggggtttcat cctaatagac aggcagcatt gttaaaagat      300
cggaatggat tgttcaagct tgcgatgaaa cacaagctgc cgattgttcc ggtgtactgc      360
tttgagctca ca                                     372
10
  
```

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Dominio catalítico del mutante de I343L

<400> 19

```

Ile Phe Pro Phe Gly Leu Ala Phe Ser Cys Leu Pro Glu Arg Gly His
1           5           10           15

Glu Gln Thr Trp Gly Leu Phe Arg Pro Val Val Ala Thr Ala Thr Lys
                20           25           30

Leu Phe Pro Leu Val Arg Thr Phe Ile Ser Trp Met Asn Gly Val Asp
                35           40           45

Ala Ser Asp Ser Ala Val Ser Arg Ala Leu Ala Pro Pro Tyr Thr Ser
  
```

ES 2 610 482 T3

50	55	60	
Asp His Pro Gly Arg Val Gly Val Ser Pro Gly Gly Ile Ala Glu Met			
65	70	75	80
Phe Glu Thr Tyr Pro Lys Pro Gly Phe His Pro Asn Asp Glu Ala Ala			
	85	90	95
Leu Leu Lys Asp Arg Asn Gly Leu Phe Lys Leu Ala Met Lys His Lys			
	100	105	110
Leu Pro Leu Val Pro Val Tyr Cys Phe Gly Ala Thr			
	115	120	

<210> 20
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dominio catalítico del mutante de I343L

<400> 20
 atctttcctt tcggactcgc cttttcatgt ctacccgaac gaggacacga acaaacatgg 60
 ggtctcttcc gaccagtctg tgcaacagcc accaaactct ttccgctggg acgaaccttc 120
 atttcttggg tgaacggagt ggatgcttcg cgttcggcgg tgtctcgtgc tcttgctcct 180
 ccgtatacca gtgatcatcc gggaagagtg ggagtttgc ccggtggtat tgccgagatg 240
 tttgagacgt atccaaagcc ggggtttcat cctaatgacg aggcagcatt gttaaaagat 300
 cggaatggat tgttcaagct tgcgatgaaa cacaagctgc cgcttgttcc ggtgtactgc 360
 tttggagcta ca 372

10

<210> 21
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> 80% de homología de la secuencia nucleotídica con TpDGA2

<400> 21
 atgactacta aaaaacgacc tcttccgcga catctccacc tacctccagg tgttgaagtt 60
 ctggtgtcac ctctccgta cgaagtttgc acctgggtgg acagattggt ggtgtacgcg 120
 tcctccttga tagtggttagg ttcaccggtg tggttctacg gtgggatcat atatttttac 180
 aggaaatgga aaaaatatcg atcactagca gcagcaacag aggcagccag acatgagagt 240
 ggagggggag gagcttcctc taccgtacga tcagagggaa ctcgacagcg aacttcctca 300
 gatgacggga actacacttc ctctacaggg gaaagctccc aggaaatgaa cgaacaggag 360
 actcagactc agtctcatcg tcagcagact gagcagtaca acaactacaa gcgtttagct 420
 actagatacg gtggtgctct ggcagctatc atactgattt cgatctgggg cccacatcga 480
 gacaaacgag ttggtgaatg gctgggagtg aaaaaatgga gattgtggga tgcttggttg 540
 aactatgtag gtttcacagt tcttaaagac aatggtgatg atgaccacac tattattcag 600
 accaatcctc actctgctat tccgaatcag gaagagtttg acattcacac ttcaccttct 660
 atcttcgctt tcgttccgca cgggatcttt ccattcggtc tggcgttttc ttgtcttccg 720
 gaacgtggtc acgaacagac ttggggactg ttccgtcctg tggtagctac tgcgacgaag 780
 ctggttcccc tcgttcgtac gttcatatca tggatgaacg gtgtcgatgc atcccgatcc 840
 gccgtctcac gagcactagc accaccctat acgagtgatc atcccggtag agtcggtgta 900
 tccccgggag gaatagcggg gatgtttgag acctatccta aaccggctt tcatccaaat 960
 gacgaggtg cttingttaa ggatcgcaat ggtttgttca aactagccat gaagcacaaa 1020
 ctcccatag taccgcgtca ctgctttggt gcaactaaaa tgttgagacg tgtccagtta 1080
 ccagcctttg tcgagacctt gagcagaatg ctgaaaatca gtctatgttt attcctttggt 1140
 aaactaggct tgccaatacc attccgtcaa cgctcatgt atgtgatggg gaaaaccttg 1200
 tttccaccac tccccagaga tggggtcaac acatcaatga tgggaagtggt tgaagaattt 1260

20

gatgaacgtg tccaggagat gcatgatgct ttctgcaatg agattacacg gatcttcgag 1320
 cgtaacaagg accactacgg atggggaaac aagaacttga gactggtttg agagtgtgag 1380
 tgatattcct atgctacact aaacttaaaa cctcaaacga ctcaagctca ga 1432

<210> 22
 <211> 1432

ES 2 610 482 T3

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 85% de homología de la secuencia nucleotídica conTpDGA2

5 <400> 22

atgacaacta	aaaaacgacc	tcttccgcgt	catctccacc	tacctcctgg	tgttgaagtt	60
ctcgtgtcac	ctccaccgta	cgaagtttgc	accctcgtgg	acagattggt	ggtgtacgcg	120
tcgtccttga	tagtggttgg	ttcaccggtt	tggttctacg	gtgggatcat	atatttttac	180
aggaaatgga	aaaaatatcg	atctctagca	gcagctacag	aggcagccag	acatgagagt	240
ggtgggggag	gagcatcctc	taccgttcga	tgagaggaa	ctcgtcagcg	aacttcgtca	300
gatgacggga	actacacttc	gtctacaggg	gaaagctcgc	aggaaatgaa	cgaacaggag	360
acacagactc	agtctcatcg	acagcagaca	gagcagtaca	acaactaaa	gcgtttagct	420
acaagatacg	gtgttgctct	cgcagctatc	atactcattt	cgatctgggg	ccctcatcga	480
gacaaacgag	taggtgaatg	gctgggagtc	aaaaaatgga	gattgtggga	tgcttggttg	540
aactatgttg	gtttcacagt	tctaaaagac	aatggatgatg	atgaccacac	tataattcag	600
accaatccac	actctgctat	tcccaatcag	gaagagtttg	acattcacac	ttctccttct	660
atcttcgctt	tcgtaccgca	cgggatcttt	ccattcggac	tggcgttttc	ttgtctaccg	720
gaacgtggag	acgaacagac	ttggggactg	ttccgacctg	tggtagcaac	tgcgaccaag	780
ctgtttcccc	tcgtacgtac	gttcatatct	tgatgaacg	gtgtcgatgc	atcgcgatcc	840
gccgtgtcac	gagcacttgc	accaccctat	accagtgatc	atccccgtag	agtcggagta	900
tccccgggtg	gaatagcggg	gatgtttgag	acgtatccta	aaccgggtt	tcattccaaat	960
gacgaggctg	ctttgttaaa	cgatcgcaat	ggtttgttca	aacttgccat	gaagcacaaa	1020
ctgccatag	taccggctta	ctgctttggt	gcaacaaaaa	tggtgagacg	tgtgcagtta	1080
ccagcctttg	tcgagacgtt	gagcagaatg	ctgaaaaatca	gtctatgttt	attctttgga	1140
aaactaggct	tgctataacc	attccgacaa	cgctcatgt	atgtgatggg	caaaaccttg	1200
tttccaccgc	tccccagaga	tgggggtgaac	acatcaatga	tgggaaggtgg	agaagaattt	1260
gatgaacgtg	tccaggagat	gcatgatgca	ttctgcaatg	agattacacg	gatcttcgag	1320
cgaacaag	accactacgg	atggggtaac	aagaacttga	gactggtttg	agagtgtgag	1380
tgatattctt	atgcaaacact	aaacttaaaa	ccacaaacga	cacaagctca	ga	1432

<210> 23
<211> 1432

10 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 90% de homología de la secuencia nucleotídica con TpDGA2

15 <400> 23

atgacaacta	aaaaacgtcc	tcttccgcgt	catctgcacc	tacctcctgg	agtagaagtt	60
ctcgtgtcac	caccaccgta	cgaagtttgc	accctcgtcg	acagattggt	ggtgtacgcg	120
tcgtcgttga	ttgtggttgg	ttcaccggtt	tggttctacg	gtggcatcat	atatttttac	180
aggaaatgga	aaaaatatcg	atctcttgc	gcagctacag	aggcagcgag	acatgagagt	240
ggtgggggag	gagcatcgtc	taccgttcgt	tgagaggta	ctcgtcagcg	aacatcgtca	300
gatgacggga	actacacttc	gtcaactggc	gaaagctcgc	aggaaatgaa	cgaacaggag	360
acacagactc	agtcacatcg	acagcagaca	gagcagtaca	acaactaaa	gcgattagct	420
acaagatacg	gtgtagcact	cgcagctatc	attctcattt	cgatctgggg	ccctcatcgt	480
gacaaacgag	taggtgaatg	gctcgggtgc	aaaaatgga	gattgtggga	tgcatggttg	540
aactatgttg	gtttcacagt	tctaaaagac	aatggagatg	atgaccacac	tataattcag	600
acgaatccac	actcagctat	acccaatcag	gaagagtttg	acattcacac	ttctccatct	660
atcttcgctt	tcgtaccgca	cggcatcttt	ccattcggac	tcgctgtttc	atgtctaccg	720
gaacgtggag	acgaacagac	atggggactg	ttccgacctg	tcgtagcaac	agcgaccaag	780
ctctttcccc	tcgtacgaac	gttcatatct	tgatgaacg	gtgtggatgc	atcgcgttcc	840
gccgtgtcac	gagcacttgc	tccaccctat	accagtgatc	atccccggaag	agtcggagtt	900
tccccgggtg	gaatagcggg	gatgtttgag	acgtatccaa	aaccgggtt	tcattccaaat	960
gacgaggcag	ctttgttaaa	cgatcgcaat	ggtttgttca	aacttgccat	gaagcacaaa	1020
ctgccatag	taccggctta	ctgctttgga	gctacaaaaa	tggtgagacg	tgtgcagtta	1080
cctgcctttg	tcgagacgtt	gagcagaatg	ctcaaaatca	gtctatgttt	attctttgga	1140
aaacttggtt	tgctatttcc	attccgacaa	cggctcatgt	atgtgatggg	caaaacgttg	1200
tttccaccgc	tccccagaga	tgggggtgaac	acttcaatga	tgggaaggagg	agaagaattt	1260
gatgaacgtg	tccaggagat	gcatgatgca	ttctgcaatg	agataacacg	gatcttcgag	1320
cgaacaag	accactacgg	ttggggtaac	aagaacttga	gactggtttg	agagtgtgag	1380
tgatattcat	atgcaaacact	taacttaaaa	ccacaaacca	cacaagcaca	ga	1432

<210> 24
<211> 1432

ES 2 610 482 T3

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> 95% de homología de la secuencia nucleotídica con TpDGA2

5 <400> 24

```

atgacaacaa aaaaacgtcc actaccgcgt catctgcacc ttccacctgg tgtagaagta      60
ctcgtgtctc caccacccta cgaagtttgc acgctcgtcg acagattggt ggtctacgcc      120
tcgtccttga ttgtcgttgg atctcccgtt tggttctacg gaggcatcat atatTTTTac      180
aggaatgga aaaaatatcg ttctcttgca gcagcaacag aggcagcgag acatgagagt      240
ggtgggggtg gtgcttcgtc tacggttcgt tcagaggtta cagtcagcg aacatcgtct      300
gatgacggca actacacatc gtcaactggc gaaagctcgc aggaaatgaa cgaacaggag      360
acacagacac agtcacatcg acagcagaca gacgagtaca acaactacaa gcgattagca      420
acaagatacg gagtagcact cgcagcaatc attctcatat ccatctgggg ccctcatcgt      480
gacaacagtg taggagaatg gctcgggtgc aaaaaatgga gattgtggga tgcattggtg      540
aactatggtg gattcactgt actaaaagac aatggagatg atgaccacac aataatacag      600
acgaatccac actcagctat acccaatcag gaagagtttg acatacacac atctccatca      660
atcttcgcat tcgtaccgca cggcatcttt cctttcggac tggccttttc atgtctaccg      720
gaacgtggac acgaacagac atgggtctct tcccgaccag tcgtagcaac agccaccaag      780
ctctttccgc tggtagaac gttcatttct tggatgaacg gtgtggatgc atcgcgttcc      840
gcggtgtctc gtgcacttgc acctccctat accagtgatc atccgggaag agtgggagta      900
tcgcccgtg gtatagccga gatgtttgag acgtatccaa aaccggggtt tcatcctaatt      960
gacgaggcag ctttgttaaa cgatcggat ggattgttca aacttgcgat gaaccacaaa     1020
ctgccgattg ttccggtcta ctgctttgga gcaacaaaaa tggtagagac agtgcagtta     1080
cctgcgcttg tggagacgtt gagcagaatg ctcaaaatca gtctttggtt attctttgga     1140
aaacttgggt tgcctattcc ttccgacaa cggctgatgt atgtcatggg caaacggttg     1200
tttctccgc tgccgagaga tgggtgaaac acttcaatga tgggaaggagg agaagaatTT     1260
gatgaacgag tgcaggagat gcatgatgca ttctgcaatg agataactcg catcttcgag     1320
cgaacaagg accactacgy ttgggtaaac aagaacttga gactcgtatg agagtgtgag     1380
tgatattcat atgcaactct taacttaaaa ccacaaacca cacaagcaca ga              1432
  
```

<210> 25
 <211> 309
 <212> PRT

10 <213> T. pseudonana

<400> 25

```

Leu Ala Val Thr Leu Trp Leu Gly Trp Asn Gly Ile Val Val Cys Ile
1              5              10              15

Ala Val Tyr Leu Leu Phe Ile Ala Asn Asn Ile Glu Arg Met Val Ile
20              25              30

Ile Gly Leu Ala Thr Met Ser Leu Ile Leu Pro Ala His Phe Pro Gly
35              40              45

Ala Leu Gly Tyr Lys Ile Gly Asp Trp Ile Met Arg Gln Ala Glu Lys
  
```

ES 2 610 482 T3

```

      50          55          60
Tyr Phe Gly Leu Lys Thr Val Ile Glu Asp Glu Glu Asp Leu Ile Arg
65          70          75          80
His Ala Asn Glu Asn Lys Ala Val Ile Phe Ala Phe Asn Pro His Asp
      85          90          95
Met Leu Pro Tyr Ala Val Phe Ala Phe Ala Pro Thr Leu Lys Arg Leu
      100         105         110
Pro Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Thr Cys Leu Met Ser Ser Ala Ile
      115         120         125
Phe Asn Ile Pro Phe Leu Arg Gln Val Tyr Thr Trp Val Asn Ser Leu
      130         135         140
Pro Val Asp Lys Lys Thr Phe Leu Gly Arg Leu Lys Arg Gly Gln Ser
145         150         155         160
Phe Ala Phe Val Pro Gly Gly Val Gln Glu Val Ile Met Leu Asp Pro
      165         170         175
Asn Gln Pro Lys Asp Val Val Leu Tyr Leu Lys Asn Arg Lys Gly Phe
      180         185         190
Val Lys Leu Ala Leu Ala Thr Gly Ser Pro Ile Val Pro Val Phe Gly
      195         200         205
Phe His Leu Asp Gly Ser Tyr Gly Tyr Trp Leu Pro Lys Gly Lys Leu
      210         215         220
Val Glu Arg Leu Ser Arg Thr Leu Gly Phe Leu Pro Leu Leu Phe Trp
225         230         235         240
Gly Arg Trp Met Ile Pro Phe Gly Ile Pro His Pro Lys Lys Ile His
      245         250         255
Val Val Val Gly Ser Ala Ile Asp Val Pro Asn Glu Gly Glu Asp Val
      260         265         270
Ser Gln Glu Ser Ile Glu Lys Tyr His Ala Ile Phe Leu Lys Glu Leu
      275         280         285
Glu Ala Leu Phe Glu Arg His Lys Glu Glu Ala Gly Tyr Gly His Arg
      290         295         300

```

```

Gln Leu Lys Ile Val
305

```

- <210> 26
- <211> 930
- <212> DNA
- <213> *T. pseudonana*

5

```

<400> 26
ctggcagtc cattgtggtt ggggtggaat gggatcgttg tgtgtatcgc agtctacctc      60
ttgttcattg ccaacaatat tgaacgaatg gtgattattg gattggcaac gatgtcgttg      120
atactgcctg ctcactttcc aggagctttg ggctacaaga ttggggattg gattatgcgt      180
caggcagaga agtacttttg attaaagacg gtgattgaag acgaagagga tttgattcgg      240
catgccaatg agaacaaagc agtgateattt gccttcaatc cacatgatat gttgccgtat      300

```

ES 2 610 482 T3

gcagtatattg cattcgcctcc tacattgaag agactaccgg gtaagatcgg gaaggatgga 360
 acgtgcctca tgtcatcggc aatcctcaac attccttttt tgagacaagt gtatacgtgg 420
 gtgaacagcc ttccagtaga caagaaaaca tttctgggga ggctgaagag agggcaaagc 480
 tttgcttttg ttcctggggg agtgcaagag gtcattatgc ttgatccgaa ccagccaaaa 540
 gatgtgggtgc tataatctcaa gaaccgcaaa ggattcgtga agctggcggtt ggcgacaggc 600
 tcgcccacgc tgcccgtggt tggccttcat ctggatggaa gctatggcta ttggctgccg 660
 aaagggaaac tggtcgagag actttcacga acattgggct ttcttcctct tctcttttgg 720
 gggcgttgga tgataccttt cggcatacca caccocaaaa agattcacgt tgcgcttgga 780
 tcagcaatag atgtaccgaa cgagggagaa gatgtctcac aagagtcaat tgaaaagtac 840
 catgccatct ttctgaagga gcttgaagca ttgtttgaga ggcacaagga agaagcggga 900
 tacggacatc ggcaattgaa gattgtctaa 930

<210> 27

<211> 158

5 <212> PRT

<213> T. pseudonana

<400> 27

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

<210> 28

<211> 477

10 <212> DNA

<213> T. pseudonana

<400> 28

atggaagact atctgaaaaa tggagaggat gtggcacttc ctccctggggg atttgaggag 60
 gctaccctga cttgtacaac gcaggatagg gtgtttatca agaagcggta tggctttgtg 120
 aggctgtggt tgaagtatgg agtggcgata cgaccagtct atgtgtttgg agaggggaaga 180
 ttgtttggca acgtacaagg aatgtggaag acaagacttg ccttgaatcg atggggcatt 240
 ccgactatat tggtatgggg tagttggttc tttcccttgc ttccgaagaa ggggtgcaac 300
 ctacatattg ttgttggaaa gcctttgatt gtgccaaaga ttgacaatcc aacaaaggaa 360
 gaggttattg cgtggcatga aaagtatatt accgagttga agaggattta tgaagagtac 420

15 aaggaggttg cgtacggtaa cgaggacgga aaggttgcaa agcttgaggt ttggtga 477

<210> 29

<211> 376

20 <212> PRT

<213> T. pseudonana

ES 2 610 482 T3

<400> 29

```

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

Thr Lys Gln Thr Asp Val Lys Glu Trp Met Ala Leu Thr Thr Thr Ser
20           25           30

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

Lys Arg Asp Ile Glu Ile Glu Arg Ile Ile Gly Thr Ser Tyr Tyr Met
50           55           60

Ile Gly Asn Thr Val Pro Phe Ala Val Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser
65           70           75           80

Tyr Phe Ser Ala Val Gly Ala Leu Ile Phe Lys Val Tyr Met Val Tyr
85           90           95

Phe Thr Thr Leu Phe Val Val Phe Thr Tyr Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr
100          105          110

Met Lys Arg Tyr Asn Arg Pro Lys Ser Met Ser Lys Thr Asp Ile Lys
115          120          125

Asp Asn Gln Tyr Leu Tyr Thr Glu Arg His Thr Gln Lys Tyr Leu Ser
130          135          140

Met Gln Phe Val Trp Pro Glu Ser Ile Gln Arg Pro Ala Leu Asn Asp
145          150          155          160

Gln Pro Val Ile Phe Ala Ala Ile Pro His Gly Leu Ser Pro Leu Gly
165          170          175

Ile Thr Ala Tyr Pro Met Trp Ser Lys Leu Phe Asn Asp Lys Leu Cys
180          185          190

His Trp Thr Cys Ala Pro Val Val Leu Lys Leu Pro Leu Ile Ser Ser
195          200          205

Phe Met Lys Ala Ile Gly Tyr Ile Pro Ala Lys Ala Lys Asn Ile Thr
210          215          220

Asp Thr Leu Ile Lys Lys Glu Glu Asn Val Gly Ile Ile Leu Asp Gly
225          230          235          240

Ile Ala Gly Met Phe Gln Ala His Asp Glu Val Ala His Val Lys Arg
245          250          255

Arg Lys Gly Ile Ile Lys Ile Ala Leu Arg Ala Gly Ala Ala Val Val
260          265          270

Pro Val Tyr Gly Phe Gly His Thr Ser Leu Trp Lys Ile Val Val Asp
275          280          285

```

ES 2 610 482 T3

Pro Phe Gly Phe Leu Glu Trp Leu Ser Thr Lys Ser Asp Val Ser Val
 290 295 300

Thr Pro Phe Phe Gly Arg Phe Asn Trp Phe Leu Gly Pro Pro Lys Arg
 305 310 315 320

Val Ala Val Cys Val Cys Met Gly Asp Ala Ile Lys Cys Pro Lys Ile
 325 330 335

Glu Glu Pro Thr Gln Gln Asp Ile Asp Lys Tyr His Gly Leu Leu Leu
 340 345 350

Lys Gly Tyr Asp Gln Leu Phe Glu Gln His Lys Val Ala Tyr Gly Trp
 355 360 365

Gly Asp Lys Lys Leu Gln Phe Val
 370 375

<210> 30
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> T. pseudonana

5

<400> 30
 atgaagtatc gcaaactcaa cctagccacc ctaccagacg aactcttcac caaacagaca 60
 gatgtgaaag agtggatggc gcttaccaca acgtcagcgg aaggaggctt tccaccatcg 120
 tcattaaaca aagtgttgcc tgtgaagaga gacatcgaga ttgaacgtat catcggcact 180
 tcctactata tgattgggaa tacggttcca ttgacagttc cgcttctgtt ggctgcatcg 240
 tacttttagtg cagttgggtgc tctgatthtc aaggtgtaca tgggtgtactt taccacactg 300
 ttcgtagtgt tcacgtatta tttctaccca aagtacatga aacgatacaa tcgtccgaag 360
 tccatgtcta agactgacat caaggacaac caatatctgt acacagaacg tcacacccaa 420
 aagtatctct ccatgcaatt cgtgtggcca gaatcaatcc aaagaccagc tcttaacgat 480
 caaccagtaa tctttgcagc cattccacat ggattaagcc cgttaggaat cacggcatat 540
 ccaatgtggt caaagttggt caatgataaa ctttgccatt ggacttgtgc accagtgggtg 600
 ttgaagttgc ctttgatatac ttctgtttatg aaggctattg gttacattcc agcgaagca 660
 aagaatatca cggacacact gatcaagaag gaagagaatg ttggtatcat tcttgatgga 720
 atcgctggaa tgtttcagcg tcatgatgaa gtggcacacg tgaagagaag gaaggggatt 780
 atcaagattg cattgagggc cggagccgca gttgtacctg tgtacggttt cggtcatact 840
 tcgttgtgga aaatcgctcg tgatcccttt ggattcttgg aatggctgag taaaaatcg 900
 gatgtctctg tcacaccttt cttcgggagg ttcaactggg ttttgggtcc tccgaaacga 960
 gttgtgtgct gtgtctgcat gggagacgca ataaagtgtc ctaagatcga ggaaccgacg 1020
 caacaagaca ttgataagta tcatggactc ttattgaaag gatacgatca actatthgaa 1080
 cagcacaag tagcatacgg atgggggtgat aagaaaactgc agtttgttta a 1131

<210> 31
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas reinhardtii

10

<400> 31
 Met Ala Gly Gly Lys Ser Asn Gly Thr Gly Ala Ala Asp Ala His Val
 1 5 10 15

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

Val Arg Ile Tyr Ser Asp Gly Ile Lys Pro Asp Ala Arg Gln Asn Leu
 35 40 45

Leu Val Gln Ile Leu Ala Gly Ile Thr Met Ser Ile Tyr Val Gly Phe

ES 2 610 482 T3

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

- <210> 32
- <211> 1041
- <212> DNA
- <213> Chlamydomonas reinhardtii

5

ES 2 610 482 T3

<400> 32

```

atggcagggtg gaaagtcaaa cggcacgggc gcggcgggac cgcacgtgcg tacctcgcac      60
ttgaccctga aagctgggga ggaccgcccc ccgaatgttc gcatctacag tgacggcatc      120
aagccgggacg cgcggcagaa cctgcttggt agatcctgg ccggcatcac gatgtcgatt      180
tatgtaggct tcatgaacta tttcatgctg ctggtgggtc tctcctactg gagccgcac      240
tgccgctatg tggctctggc gctgctaggg acaactggcg tgccctgcaa gcccggtgctg      300
tggcctgctt tcaacaagct gtggatcttc aagacctggc gtcactactt ccaactacagt      360
ttcctgattg aggagccgct tgaccccaac aagcgctaca tctttgtcga gttcccgcac      420
ggcgcgttcc ccattgggtc catcgtggcg ggacgctca tgcagactct gttcccgcac      480
atgatgatct acagcgtggc cgcctccgct gtgttctaca tccccttctg gcgccatttc      540
atcacgtgga tcggctcggg gcccgcaacg cccggcaact tcaagcggct gctgaagaag      600
ggcagtggtg cggtggtggt gggcggcatt gccgagatgt acatgggcaa caagaagaag      660
gagcgcatta agctagtggg ccgcccgggc ttcgcacgca tcgcgctgga ggagcaggtg      720
gacgcgattg tgtgcgtgta ctacttcggt cagagccaag tgctggactt cgggccctcc      780
tggttgggcg actttagccg ccgcatgctc accagcttcg gctacctcac gggatggatg      840
gggctgccgg tgccgcggcc catccccatc tacatggtga atgggaagcc catcccgtg      900
cccaagggtg ctcgtgactc gcccgagttc gacaaggagg tggataagct gcttgacgcc      960
accatcacgg agctgggcga gatgtacaac aggcacagag gcgagtacgg ctggggcgac     1020
cgcccgtgtt ccacgagta g                                     g                               1041

```

<210> 33

<211> 413

5

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 33

```

Met Thr Pro Arg Asp Pro Pro Val Pro Arg Pro Pro Pro Gly Val Arg
1                               5                               10                               15

Gln Tyr Thr Asp Gly Arg Ser Ala Ser Tyr Val Leu Pro Leu Pro Tyr
20                               25                               30

Arg Leu Leu Ala Gln Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Val Gly Phe Pro Tyr
35                               40                               45

Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Gly Ser Arg Ala Ala
50                               55                               60

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

Pro His Ile Arg Gln Gly Met Leu Asp Ser Ala Leu Phe Arg Leu Trp
85                               90                               95

Arg Ala Tyr Phe Asn Tyr Ser Tyr Ala Tyr Asp Gln Leu Pro Asp Phe
100                              105                              110

Asn Arg Pro His Ile Phe Val Asn Ser Pro His Gly Ala Phe Pro Leu
115                              120                              125

Ser Gln Ile Leu Cys Ile Ser Leu Ser Asn Ile Val Trp Pro Gly Phe
130                              135                              140

Pro Val His Ser Leu Ala Ala Ser Val Leu Trp Tyr Ile Pro Leu Trp
145                              150                              155                              160

Arg His Met Lys Ala Ala Leu Gly Ala Ala Pro Ala Ser Arg Asp Asn
165                              170                              175

Ala Arg Met Leu Leu Arg His Arg Gly Ser Val Ala Val Leu Ala Gly
180                              185                              190

```

ES 2 610 482 T3

Gly Ile Ala Glu Met Tyr Thr Ser Ser Pro Ser Arg Ala Ala Ala Ala
 195 200 205
 Thr Glu Pro Asp Glu Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ile Asp Thr Thr
 210 215 220
 Glu Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ser Ser Ser Thr Thr Thr Ser Pro Pro
 225 230 235 240
 Gln Pro Lys Glu Gln Gln Arg Asp Gly Glu Gln Arg Gln Gly Pro Arg
 245 250 255
 Lys Gly Leu Lys Gly Leu Leu Lys Gly Pro Lys Asp Asp Pro Asp Pro
 260 265 270
 Ala Ala Glu Glu Glu Gln Gly Leu Gly Leu Ala Pro Glu Arg Ile Lys
 275 280 285
 Leu Leu Gly Arg Arg Gly Phe Val Arg Leu Ala Val Glu Met Gly Val
 290 295 300
 Pro Ile Val Pro Ile Tyr His Met Gly Asn Ser Lys Ile Leu Thr Phe
 305 310 315 320
 Gly Pro Gln Ser Leu Gln Gln Leu Ser Arg Arg Leu Arg Met Ala Leu
 325 330 335
 Gly Ala Val Phe Gly Val Trp Gly Leu Pro Val Pro Arg Pro Gln Pro
 340 345 350
 Leu Met Met Cys Val Gly Ser Pro Ile Pro Val Pro Tyr Val Asp Pro
 355 360 365
 Ala Ala Glu Pro Glu Arg Phe Glu Ala Val Val Ala Ala Val His Gly
 370 375 380
 Gln Val Val Ala Ala Phe Gln Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr Arg Val Gln
 385 390 395 400
 Tyr Gly Cys Gly Trp Glu Arg Arg Pro Leu Glu Val Cys
 405 410

<210> 34

<211> 1241

5 <212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 34

```

atgaccccgc gggatccgcc ggtgccgcgg ccgccgcgg gcgtacggca gtacactgac 60
ggccggctcg cgtcgtacgt actgccctg ccgtatcgcc tgctggccca gctgactctg 120
ggtttgtacg tgggctttcc ctacatcctg ctggggttgt tgctgggcac ggctgccggc 180
tcgcgcgcgc ccgccgcgc cctggctctg acgctgggca gcctgctggt gccggcccca 240
ccgcacatcc ggcagggcat gctggactcg gcaactgttc ggctgtggcg cgcctacttc 300
aactacagct acgcctacga ccaactgcc gacttcaacc gcccacacat ctttgtcaac 360
agcccgcacg gcgccttccc gctgtcgcag atcctgtgca tctccctgtc caacatcgtg 420
tggccgggct tccccgtgca cagcctggcg gcctcgggtg tgtggtacat accgctgtgg 480
cgccacatga aggcggcgct gggggccgcg cccgccagcc gggacaacgc gcgcatgctg 540
ctgaggcacc gcgggtcggg ggcgggtgct gcggggcgca ttgctgggat gtacacgtca 600
tcgccctccc gcgccgcgcg tgccaccgaa ccagatgagg ctgctggctgc ggggtggggc 660
atcgacacga ctgaagccgc cggcgcacc ggctcaagca gcaccaccac tagcccgcg 720
  
```


ES 2 610 482 T3

```

cagccaaagg agcagcagcg cgatggggag cagcgccagg ggccgcgcaa ggggctgaag 780
gggctgctga aaggccccaa ggacgatccc gatccggcgg cggaggagga gcagggcctc 840
gggttgccac ctgaacgcat caagctgctg ggccggcgcg gcttcgtgcg gctggcggtg 900
gagatgggtg tgcccattgt acccatatac cacatgggca acagcaagat cctgaccttc 960
gggcccagcag cactgcagca gctgtcgcgc cgctgcgca tggcgctggg cgccgtgttc 1020
ggcggtgtgg gctgcctgt gccgcgcccc cagccgctca tgatgtgtgt gggcagcccc 1080
attcccgtgc cgtacgtgga tccagccgcc gagccggagc gcttcgaggc cgtggtggcg 1140
gcggtgcacg gccaggtggt ggccgccttt caggatctgt acaacaggta ccgctgcag 1200
tacggctgcg gttgggagcg ccggccgctg gaggtgtgct g 1241

```

<210> 35

<211> 320

<212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 35

```

Met Gln Ser Lys Arg Cys Ala Glu Leu Ala Ser Gly Ala Leu Trp Pro
1          5          10          15

Met Asp Arg Asp Gln Met Arg Asp Arg Asp Pro Trp Lys Leu Arg Asp
20        25        30

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

Leu Tyr Val Gln Ser Thr Thr Leu Thr Ile Ala Phe Leu Leu Trp His
50        55        60

Ile Trp Lys Val Met Ala Ser Tyr Phe Pro Gly Ala Arg Leu Ile Lys
65        70        75        80

Thr Ala Asp Leu Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Ile Phe Val Ser His Pro
85        90        95

His Gly Val Ile Ala Ile Ser Asp Trp Leu Ala Phe Ala Thr Glu Ala
100       105       110

Leu Gly Phe Ser Lys Leu Phe Pro Gly Leu Asp Leu Arg Cys Ala Thr
115       120       125

Leu Ala Ser Asn Phe Trp Val Pro Gly Leu Arg Glu Tyr Ile Leu Ser
130       135       140

His Gly Met Cys Gly Val Gly Arg Asp Thr Leu Ala Arg Val Leu Thr
145       150       155       160

Gly Lys Pro Gly Arg Ala Val Val Leu Val Val Gly Gly Ala Ser Glu
165       170       175

Ala Leu Leu Ala Ala Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Val Leu Arg Asn Arg
180       185       190

Lys Gly Phe Val Arg Leu Ala Leu Gln Thr Gly Ala Ser Leu Val Pro
195       200       205

Val Leu Ser Tyr Gly Glu Thr Asp Thr Phe His Thr Tyr Ile Pro Pro
210       215       220

Pro Cys Ser Arg Ala Ala Ala Val Met Lys Val Leu Lys Gln Val Phe
225       230       235       240

```

5

ES 2 610 482 T3

Gly Phe Ser Thr Pro Leu Cys Trp Gly Thr Gly Leu Phe Gly Gly Trp
 245 250 255

Gly Met Leu Ala Leu Gln Val Pro Leu Thr Val Val Val Gly Ala Pro
 260 265 270

Ile Gln Val Asp Lys Val Ser Ser Pro Thr Glu Ala Glu Val Ala Ala
 275 280 285

Leu His Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Leu Gln Lys Leu Trp Asp Asp Thr
 290 295 300

Val Asp Lys Tyr Gly Lys Gly Val Lys Arg Pro Leu Ala Ile Val Gln
 305 310 315 320

<210> 36

<211> 963

5

<212> DNA

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 36

```

atgcaaagta agcgttgtgc agagctggcc tctggggctc tgtggcccat ggaccgcgac      60
cagatgcgcg accgcgaccc atggaagctg cgcgaccgag ctataagcca agcatgggtg      120
tggcctctgc tcatcggcac attgctttac gtgcagagca ccacgctcac aattgccttc      180
ctgctgtggc atatctggaa ggttatggcc tcttacttcc cggcgcccgc cctgattaag      240
accgccgacc tggatccggc tggccgctat atattcgtga gccacccgca cggcgctcatc      300
gccatttccg actggctggc atttgccaca gaggcgctgg gcttctccaa actgttccca      360
ggcctggacc tgcgctgcgc cacgctggct tcaaacttct ggggtgcctgg tttgctgag      420
tacatcctat cgcacggcat gtgcgcgctg ggcgagaca ctctggcgcg cgtgctgaca      480
ggaaagccgg gccgtgcggt tgtgttggtg gtggcgggcg cgtctgaggc gctgttggcg      540
gcbgagggaa cttatgacct ggtgctgcgc aaccgcaagg gctttgtgcg cctggcgctg      600
cagaccggcg ccagtctggt gccggtgctg tcgtacggtg agacagacac cttccacacc      660
tacatcccgc gcacctgcag ccgggcggcc gcggtcatga aggtgctgaa gcaggtgttt      720
ggcttctcca cgcacctgtg ctggggcacc ggactgttcg ggggctgggg catgctagcg      780
ctgcaggtgc cgctcactgt ggtggtgggg gcacccatac aggtggacaa ggtgtccagt      840
cccacggagg ctgaggtggc ggcgctgcat aagacctaca cggaggcact gcagaagctg      900
tgggatgaca cagtggacaa gtacggcaag ggtgtcaagc ggccgctggc catcgtgcaa      960
tga
    
```

<210> 37

10

<211> 324

<212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 37

Met Ala Ile Asp Lys Ala Pro Thr Asn Val Arg Ile Trp Ser Asp Gly
 1 5 10 15

Val Thr Glu Lys Gly Lys Gln Ser Ile Phe Ser Ser Leu Val Ala Met
 20 25 30

Leu Thr Leu Phe Ile Tyr Cys Gly Trp Met His Val Leu Leu Ala Leu
 35 40 45

Val Ile Leu Ser Phe Trp Tyr Arg Trp Ala Leu Val Thr Val Leu Leu
 50 55 60

Leu Tyr Ser Thr Leu Leu Leu Pro Pro Lys Pro Val Leu Trp Gly Pro
 65 70 75 80

Val Cys Arg Ser Trp Ile Phe Gln Thr Trp Arg Glu Tyr Phe Lys Phe

ES 2 610 482 T3

85	90	95
Ser Tyr Val Phe Asp Glu Val Leu Asp Ser Lys Lys Lys Tyr Ile Phe 100 105 110		
Ala Glu Phe Pro His Gly Val Phe Pro Met Gly Pro Leu Ile Gly Ala 115 120 125		
Thr Glu Cys Gln Ile Met Phe Pro Gly Phe Asp Ile Phe Gly Leu Ala 130 135 140		
Ala Asn Val Val Phe Thr Val Pro Phe Trp Arg His Phe Val Ala Trp 145 150 155 160		
Leu Gly Ser Val Pro Ala Thr Thr Arg Asp Phe Lys Arg Val Leu Lys 165 170 175		
Gln Gly Ser Val Ala Val Ile Val Gly Gly Ile Ala Glu Met Tyr Met 180 185 190		
Gln Ser Pro Thr Lys Glu Gln Ile Met Leu Lys Asp Arg Lys Gly Phe 195 200 205		
Val Arg Val Ala Val Glu Glu Gly Val Asp Gly Gly Ile Val Pro Val 210 215 220		
Tyr His Phe Gly Asn Ser Gln Val Leu Asp Phe Gly Pro Gln Ala Met 225 230 235 240		
Ala Ser Val Ser Arg Arg Leu Arg Ala Ala Leu Gly Phe Leu Tyr Gly 245 250 255		
Val Ala Tyr Leu Pro Leu Pro Arg Arg Arg Asn Ile Tyr Met Val Cys 260 265 270		
Gly Lys Pro Val Pro Val Thr Arg Thr Ala Arg Asp Asp Pro Lys Phe 275 280 285		
Glu Glu Val Val Asp Ala Thr His Ala Ala Val Met Ala Ala Leu Gln 290 295 300		
Glu Ala Tyr Asp Arg His Lys Thr Glu Tyr Gly Trp Ala Asp Arg Pro 305 310 315 320		
Leu Val Ile Ser		

<210> 38

<211> 975

5 <212> DNA

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 38

atggcgattg ataaagcacc gacaaatgtg cgaatttggg gcgatggcgt cacggagaag	60
ggcaagcaaa gcatcttctc atcgctggtg gctatgttga cgctcttcat ctactgtggc	120
tggatgcatg tgctgctggc gcttgtgatc ctgtccttct ggtaccgctg ggcgctgggtg	180
acggtgctgc tgctgtactc caccctgctg ctgccgccta agccggtgct gtggggaccg	240
gtctgtcgct cctggatctt ccagacctgg cgggagtact tcaagttctc ttactgtttt	300
gatgaggtgc tggactcgaa gaagaagtac atcttcgagg agttcccgca cggtgtcttc	360
cccatgggcc cactcattgg cgccacagaa tgccagatca tgtttcccgg ctttgacatc	420
ttcgggctgg cggcgaatgt ggtgttcacg gtccccttct ggcggcattt cgtggcgtgg	480

ES 2 610 482 T3

```

ctgggctccg  tgccggccac  cacacgcgac  ttcaagcggg  tgctgaagca  aggaagcgtg  540
gcggtcatcg  tgggaggcat  cgcagagatg  tacatgcaga  gccccacgaa  ggagcagatc  600
atgttgaagg  accgcaaggg  ctttgttcgt  gtggcgggtg  aggagggcgt  ggatggcggc  660
atcgtgccgg  tctaccactt  tggcaactct  caggtgctgg  acttcggccc  ccaggccatg  720
gccagtgtgt  cccgccggct  gcgtgcggcc  ctgggcttcc  tgtacggagt  ggcctacctg  780
ccctgcccc  ggcgccgcaa  catttacatg  gtgtgcggca  agcccgttcc  cgtcacgcgc  840
accgcccgcg  acgaccccaa  gtttgaggag  gtggttgacg  cactcacgc  cgctgtgatg  900
gcggcctgc  aggaggccta  cgaccgccac  aagaccgagt  acggctgggc  cgaccgaccg  960
ctggtcatca  gctga

```

<210> 39

<211> 327

5

<212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 39

```

Met Pro Leu Ala Lys Leu Arg Asn Val Val Leu Glu Tyr Ala Ala Ile
1           5           10           15

Ala Ile Tyr Val Ser Ala Ile Tyr Thr Ser Val Val Leu Leu Pro Ser
20           25           30

Ala Leu Ala Leu Phe Tyr Leu Phe Gly Ala Thr Ser Pro Ser Ala Trp
35           40           45

Leu Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ala Leu Thr Phe Thr Pro Leu Gln Leu
50           55           60

Thr Thr Gly Ala Leu Ser Glu Arg Phe Val Gln Phe Ser Val Ala Arg
65           70           75           80

Ala Ala Ala Tyr Phe Pro Thr Arg Val Val Val Thr Asp Pro Glu Ala
85           90           95

Phe Arg Thr Asp Arg Gly Tyr Leu Phe Gly Phe Cys Pro His Ser Ala
100          105          110

Leu Pro Ile Ala Leu Pro Ile Ala Phe Ala Thr Thr Ser Pro Leu Leu
115          120          125

Pro Lys Glu Leu Arg Gly Arg Thr His Gly Leu Ala Ser Ser Val Cys
130          135          140

Phe Ser Ala Pro Ile Val Arg Gln Leu Tyr Trp Trp Leu Gly Val Arg
145          150          155          160

Pro Ala Thr Arg Gln Ser Ile Ser Gly Leu Leu Arg Ala Arg Lys Val
165          170          175

Ala Val Leu Val Pro Gly Gly Val Gln Glu Val Leu Asn Met Glu His
180          185          190

Gly Lys Glu Val Ala Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Gly Phe Val Arg Leu
195          200          205

Ala Val Gln His Gly Ala Pro Leu Val Pro Val Trp Ala Phe Gly Gln
210          215          220

Thr Arg Ala Tyr Ser Trp Phe Arg Pro Gly Pro Pro Leu Val Pro Thr
225          230          235          240

```

ES 2 610 482 T3

Trp Leu Val Glu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Gly Ala Val Pro Ile Gly
 245 250 255
 Met Phe Gly Gln Tyr Gly Thr Pro Met Pro His Arg Glu Pro Leu Thr
 260 265 270
 Ile Val Val Gly Arg Pro Ile Pro Val Pro Glu Leu Ala Pro Gly Gln
 275 280 285
 Leu Glu Pro Glu Pro Glu Val Leu Ala Ala Leu Leu Lys Arg Phe Thr
 290 295 300
 Asp Asp Leu Gln Ala Leu Tyr Asp Lys His Lys Ala Gln Phe Gly Lys
 305 310 315 320
 Gly Glu Glu Leu Val Ile Met
 325

<210> 40

<211> 984

5 <212> DNA

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 40

atgccgctcg caaagctgcg aaacgtggtg ctggagtagc cggccatagc catctacgtc 60
 agcgccatct acacctcggg ggtgctgctg cctcggcgc tcgcgctggt ctacctgttt 120
 ggggccacca gccctcggc ctggctgctg ctagccgcct tcctggccct caccttcacg 180
 ccgctgcagc tgaccaccgg tgcgctgctg gagcggttcg tgcagttcag tgtggcgcgg 240
 gcgcgggcct acttccccac ccgcgtggtg gtcacggacc cggaggcctt ccgcactgac 300
 cgcggctact tgttcggatt ctgcccgcac tcggctctgc ccatcgcact gcccatcgcc 360
 ttcgccacca cctcggcctg gctgcccagg gagctgcgcg gccgcacaca cggcttggcg 420
 tcgtccgtgt gcttcagcgc gcccatagtg cggcagctgt actggtggct gggcgtgcgg 480
 cccgccacgc ggcagagcat cagcggcctg ttgcgggcgc gcaaggtggc ggtgctggtg 540
 ccggggggcg tgccaggagt gctcaacatg gagcacggca aggaggtggc ctacctctcc 600
 agccgcaccg gcttcgtgcg actggccgtg cagcacggcg cgcgctggt gccagtgtgg 660
 gcgctcggcc agacgcgcgc gtacagctgg ttccggccgg gcccgccgct cgtgccacg 720
 tggtcgtgg agcgcatttc acgtgccgcc ggcgcgtac ccatcggcat gtttgggcag 780
 tacggcacgc ccatgccgca ccgcgagccc ctaccattg tgggtgggtcg ccccatcccg 840
 gtgccggagc tggcgcggg ccagctcgag cccgagccc aggtgctggc ggcgctcctc 900
 aagcgttca cggacgacct gcaggcgtg tacgacaagc acaaggcga gttcggcaag 960
 ggcgaggagc tggtcataat gtag 984

<210> 41

10 <211> 469

<212> PRT

<213> Ostreococcus lucimarinus

<400> 41

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

15

ES 2 610 482 T3

65	70	75	80
Val Trp Arg Asp	Ala Arg Asp Ala Arg Asp	Asp Asp Gly Thr Arg	Glu Arg
	85	90	95
Arg Leu Ala Val	Ala Ala Leu Ser Trp Thr Ser	Leu Gly Leu Ser	Val
	100	105	110
Ala Ser Glu Ala	Ala Val Ala Ala Ser Leu Ala Phe	Phe Asp Val	Gln
	115	120	125
Asp Glu Gly Glu	Ala Gly Arg Gly Ala Ala Arg Gly Arg	Glu Gly Leu	
	130	135	140
Asp Phe Arg Asp	Val Ala Arg Val Ala Thr Leu Leu Ser	Ile Ala His	
	145	150	155
Val Leu His Ala	Pro His Ala Val Ile Phe Ala Thr	Leu Ala Thr	Val
	165	170	175
Tyr Ala Leu Gly	Ser Ser Gly Ala Leu Ala Ser Ile Val	Val Leu Tyr	
	180	185	190
Ala Ser Thr Tyr	Phe Leu Gln Arg Asp Leu Glu Arg Gly	Arg Arg Lys	
	195	200	205
Trp Asp Ala Phe	Arg Ala Trp Ser Ser Arg Trp Ile Glu Gly	Ala Ala	
	210	215	220
Lys Ala Trp His	Gly Ser Val Arg Met Ile His Asp Gly	Ala His Gly	
	225	230	235
Ala Gly Ser Thr	Pro Leu Val Phe Ala Tyr His Pro His	Ser Leu Ile	
	245	250	255
Pro Ala Gly Ala	Val Trp Phe His Phe Leu Pro Gln Phe	Gly Arg Arg	
	260	265	270
Phe Glu Asn Val	Lys Pro Val Thr Leu Ala Ala Ser Val	Leu Phe Lys	
	275	280	285
Pro Pro Phe Val	Arg Glu Leu Ala Ala Trp Leu Gly Val	Arg Ser Val	
	290	295	300
Ser Gln Glu Ile	Phe Arg Ser Thr Leu Arg His Glu Arg	Ala Val Val	
	305	310	315
Val Cys Pro Gly	Gly Gln Gly Glu Met Cys Glu His Val	Gly Gly Leu	
	325	330	335
Lys Glu Glu Thr	Ile Thr Leu Cys Thr Lys His Arg Gly	Phe Val Arg	
	340	345	350
Leu Ala Ile Glu	Glu Lys Ala Arg Leu Val Pro Val Val	Cys Phe Gly	
	355	360	365
Glu Ser Ser Ser	Trp Arg Asn Leu Leu Arg His Pro Gly	Arg Tyr Leu	
	370	375	380
Tyr Arg Arg Phe	Arg Val Ala Thr Pro Leu Leu Ala Val	Gly Tyr Leu	
	385	390	395
			400

ES 2 610 482 T3

Gly Ile Leu Pro Ile Pro Ala Arg Val Pro Leu Thr Phe Val Val Gly
 405 410 415
 Asp Pro Met Ser Leu Pro Glu Pro Asp Asp Ala Gly Arg Ala Arg Glu
 420 425 430
 Ser Asp Val Glu Ile Ala His Ala Ala Tyr Tyr Arg Glu Val Ala Arg
 435 440 445
 Leu Phe Ala Lys His Lys Gly Ala Ser Gly Phe Pro Asn Leu Asn Leu
 450 455 460
 Lys Leu Leu His Glu
 465

<210> 42
 <211> 1410
 <212> DNA

5 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 42
 atgcgcgcg cgcgaggacg ggcgatcgat tggcgcgcg cgctccgcggg cgcgctcgcg 60
 tgcctgctcg cgggtggcgat cacgaacttt ggcgtcgggt ggcgctggt cggaggacga 120
 ggatggcgcg cgtggcaacc gtccgcgcga ggacgatcgt ggaggttcac gctggcgcaa 180
 gcgatcggat ggacgctggc gagcgcgctg ctggcgctgc tgatggcgtg cgggacgctg 240
 gtgtggcgag acgcgaggga cgcgaggac gacgggacgc gcgagcggcg actggcgggtg 300
 ggcgcgctga gttggacgag cctgggactg agcgtcgcga gcgagggcgc ggtggcggcg 360
 tcgctggcgt tcttcgacgt ccaggacgag ggcgaggcgg ggcgaggcgc ggcgagggga 420
 agggaaggtt tggattttag agacgtcgcg cgcgtcgcga cgctggtgtc catcgcgcac 480
 gtgttgacag cgcgcgacgc ggtgatattc gcgacgctgg cgacggtgta cgcgctcggg 540
 tcgtcgggag cgctggcgtc catcgttgtt ctgtacgcga gcacgtattt cttgcagcgc 600
 gatctcgagc gcgggcgcgc gaagtgggac gcgtttcgag cgtggtcgtc gcgatggata 660
 gagggcgcg cgaaggcgtg gcacgggagc gtgcgcatga ttcacgacgg cgcgcacggc 720
 ggcggctcga gcctctcgt ctttgctat caccgcact cgctcattcc ggcgggcgcc 780
 gtgtggtttc actttttacc tcagtttggg cgtcgtttg aaaacgtcaa gcccgtagcg 840
 ttggccgcga gcgttctttt caagccgcgc ttcgtgcgag agctcgcgcg gtggttgggc 900
 gtgcgcagcg tgtcgcaaga aatattcgt tcgacgctt ctcacgagcg cgcggtcgtc 960
 gtgtgtccgg gcggtcaggc cgagatgtgc gacacgctc gcgattgaa ggaggagacc 1020
 atcacgctct gcacgaaaca tcgcggttc gttcgactcg ccatcgaaga aaaagcgcgt 1080
 ctctgcccgc tcgtgtgttt cggcgagagt agcagctggc gcaatctctt gcggcaccgc 1140
 ggtcgatatt tgtacagacg ctttcgcgct gcgacgcgcg ttttagcggg gggctacctc 1200
 ggcattctcc cgattccggc ccgagtgccg ctcacgttcg tcgtcggcga cccgatgtcg 1260
 cttcccgcgc ccgatgacgc gggacgagcg agggagagcg acggttagat cgctcacgcg 1320
 gcgtattacc gcgaggtggc gcgcttgttc gcaaagcaca agggcgcgag cggatttccg 1380
 aatttaaact tgaattgct gcacgagtga 1410

<210> 43
 <211> 316
 <212> PRT

10 <213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 43
 Met Phe Ala Trp Leu Gly Leu Ile His Val Asp Val Ala Val Thr Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Trp Thr Leu Pro Ser Ala Met Ala Val Thr Ala Leu Ala
 20 25 30
 Thr Leu Val Ala Ala Ala Ala Ile Pro Arg Thr Val Ala Thr Pro Arg
 35 40 45

ES 2 610 482 T3

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

<210> 44

<211> 951

<212> DNA

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 44

atgttcgcgt ggctcggatt gattcacgtc gacgtcgcgg tgacggcgct ggcggtgtgg	60
acgctgccga gcgcgatgac ggtgacggcg ctccgcgacgc tggctcgcggc ggcgcgatc	120
ccgcggacgg tggcgacgcc gaggtggggc gcgcggttgg cgcgcgcggt gacgaggacg	180

5

ES 2 610 482 T3

```

gcgacggcgt actttccgac gcgattgga ttcgaagacg aggagggcgta tctgcgagcg 240
gtgaggaacg aagagggcgtg cgtgatagga ctggaaccgc acgggggtgct gccgctgagc 300
gtgatatcgt tcgcgggagta ttttatgcac gatgaggagg gggcgcgcgcg acgaggattg 360
acgccggcgg cgagacgagg cgcgcggggc ctggcgagcg cggcgatatt taaagtcccg 420
ctcgtgaaac atctgtggac gtggttgggg ttggatccga tctcgaaggc gtgcatgctg 480
aggatgctgc gagcggggaa gacggcggtg atcattcccg gcggcgctgc cgagtgcagtg 540
gcgatggaac gcggcgtgga gacgttgtat ttgcgaagc gatacggatt cgtgaagatc 600
gccatcgtga ccggagcgaa actgattccc gcgtacacgt tcggacaaag tcggacgtac 660
gggtactggc ggctcggggc gccgatcgtg ccgaaattcg tggcgggattg gatcgggaag 720
acgttttcgt tcgcgccgat tttttctgg gggaaatctt gcacgcccat cccgtacgcg 780
acggcgctca acacggtcgt gggcaaaccg atcgaggttg aaaaaaaccc agatccgagc 840
aaggaagagg ttcaggcgaa attggacgag tttatcgacg ccatgcgttc gctgtacgac 900
agtcacaagg cgagattcgg ttacgaagac gttcgactcg tgatttgta g 951

```

<210> 45

<211> 338

5

<212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 45

```

Met Ile Tyr Ala Trp Ile Leu Ser Ala Ile Phe Val Tyr Pro Ala Tyr
1           5           10           15

Cys Val Phe Gly Pro Ser Met Trp Leu Lys Asn Phe Phe Leu Gly Tyr
          20           25           30

Ile Ala Trp Tyr Ala Thr Leu Asp Arg Lys Thr Ala Ser Ser Gly Lys
          35           40           45

Arg Phe Ala Arg Trp Ser Arg Arg Leu Pro Phe Trp Arg Ile Leu Ala
50           55           60

Glu Tyr Phe Pro Val Arg Leu His Val Ser Ala Lys Leu Asp Pro Ser
65           70           75           80

Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Tyr His Pro His Gly Val Ile Gly Val Gly
          85           90           95

Ala Leu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Ala Thr Gly Phe Tyr Glu Ala Phe
          100          105          110

Pro Gly Leu Asp Leu Arg Leu Leu Thr Leu Ser Met Asn Phe Lys Phe
115          120          125

Pro Phe Thr Arg Glu Val Leu Met Gly Leu Gly Ile Asn Ser Val Thr
130          135          140

Lys Ser Ser Val Glu Thr Asn Leu Thr Arg Ala Pro Gly Ala Ser Val
145          150          155          160

Ala Ile Val Ile Gly Gly Ala Ser Glu Ala Leu Asp Ala Arg Pro Gly
          165          170          175

Trp Ala Thr Leu Thr Leu Ala Arg Arg Lys Gly Phe Val Lys Met Ala
180          185          190

Leu Arg Thr Gly Ala Ser Leu Val Pro Val Phe Ala Phe Gly Glu Asn
195          200          205

Asp Ile Phe Glu Gln Val Glu Asn Pro Glu Gly Gly Arg Leu Arg Asn
210          215          220

```

ES 2 610 482 T3

Phe Gln Met Tyr Ile Lys Gln Leu Ile Gly Ile Thr Pro Pro Ala Phe
 225 230 235 240
 Tyr Gly Arg Ser Leu Ser Arg Gly Met Trp Arg Arg Ile Phe Gly Arg
 245 250 255
 Lys Gly Val Leu Pro Lys Arg Glu Pro Ile Glu Val Val Val Gly Asn
 260 265 270
 Pro Ile Ala Val Pro Lys Val Val Asp Pro Ser Asn Glu Ile Ile Asp
 275 280 285
 Lys Tyr His Ala Leu Tyr Thr Glu Ser Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu
 290 295 300
 His Arg Arg Gln Phe His Arg Leu Asn Arg Gly Gly Ser Ser Asp Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Ser Asp Leu Leu Thr Arg Gln Gly Lys Leu Gln Asn Met Gln
 325 330 335

Phe Lys

<210> 46

<211> 1017

5 <212> DNA

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 46

```

atgatatacg cgtggatact gagcgcgata ttcgtatatac ccgcgtattg cgtgttcggg 60
ccgtcgatgt ggttgaagaa tttcttcctg ggttacatcg cgtggtagcg gacgctcgac 120
aggaagacgg cgagctcggg gaagcgtttc gtcgatgggt ctcggcgggt accgttttgg 180
aggattttgg cggagtattt tccggtgcca ttacacgtga gcgcgaagtt agatccgagc 240
ggtaattact tgttcggtta tcatccgcac gccgtcatcg gcgtcggcgc gttgttgacg 300
ttcgccaccg aggcgacggg attttacgaa gcatttcggg gactcgattt gcgtcttctc 360
acgctgtcca tgaacttcaa gttcccgttc actcgcgagg tgttgatggg gctcgggatc 420
aatagcgtga ccaagtcgag cgtggagacg aatctgacgc gcgcgccggg ggcgtccgtc 480
gccatagtca tcggcggcgc ctccgaagcg ttggacgcgc gtccgggctg ggccacgctc 540
acgctcgcca gacgcaaggg gttcgtaaag atggctcttc gcacaggagc atcgctcgtg 600
cccgtgttcg cgttcggcga gaatgacatc ttcgaacaag tggaaaatcc cgaaggcgga 660
cgattgagga atttccaaat gtacatcaaa caactcattg gcatcacgcc gcctgctttt 720
tacggcgggt cgctcagtcg aggcattgtg cgtcgaatct ttggtcgcaa aggtgtgctt 780
ccgaagcgtg agccgatcga agtcgctcgtg ggcaatccca tcgccgtgcc caaagtcgctc 840
gatccgtcaa acgaaatcat cgacaagtac cacgccctgt acaccgaatc tttgaaagag 900
ctttacgagt tacatcgtcg acagtttcat agactcaatc gcggggggtc gtcggatgat 960
cttctgagcg atctcctgac tcggcaagga aaactgcaaa acatgcagtt caagtag 1017
  
```

<210> 47

10 <211> 350

<212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 47

Met Gly Ser Asn Ala Gln Arg Gly Ala Leu Trp Arg Glu His Arg Ala
 1 5 10 15
 Val Glu Ala Ala Thr Ile Ala Ala Met Arg Ala Arg Gly Val Arg Asp
 20 25 30

ES 2 610 482 T3

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

<210> 48

<211> 1053

<212> DNA

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

5

ES 2 610 482 T3

<400> 48

```

atgggctcga acgcgcagcg cgggtgcgctc tggcgcgaac accgcgccgt ggaggcggcg      60
acgatcgcgg cgatgcgcgc gcgcgcgctg cgcgacgtgc cgtggagctc cgcgaagcgc      120
atgctcgcgg tgctgtgctg cagcgcgatt tacacgtcgt ggatcctgtc cccggtcgtg      180
tccgcggtgg cggtgatttt gataccgtcg ttgcgagcgt acgtcgggtg ttatctcttc      240
gcgtcgtacg cgctcggggt gcgtgtgccc atgaatgggc tttataaatt cttttgcggg      300
ctcgagtgcg gagaagaaaa tggatgggaa ctctgctgctg aggacgcgac ggcgggagag      360
aaagagattg attgctctaa gcgcgcgctg ttgttcgccg cgcacccgca cgggttattc      420
gcgtctgggtt gcgtggggaa tatcgtattg agcgcgcggt cgttgaggcg attccgagcg      480
cggcacgtta gattcttcat caacaacttg ctcataagcg tgtttccgat catcaaagat      540
gtgctgtcgt cgcttggggt cttaccatgc acagcaaaaa tgatgcgacg ggttttaggg      600
cgtggggaga ctgggatgat tgttgttggc gccgttcaag aggtggtgct gacgggcaac      660
gtcgcagctcg aagagctata cttgaagaat tgtttcggat tcgtcaaggt agccatccaa      720
gtcggaacgc ccttagtgcc agtatacacg tttggcgagt ctctggctac tggtcgggat      780
tgggtgccgt ttcgtgagat acgaaaacgc ctgagctata aatttgtatt tccgttccgc      840
tcgctcggca tcgtccatcg ttggggattc tgctttccgc gaggcaagct cagcacagtg      900
gtgggaccac ctattgaagt taagcagaac gatagaccgt cgcgcgagga agtggctcgc      960
gtgcatgcgc agtattgtaa gtcgcttttg gcactcattg aacgaaacaa agccgccgcg      1020
ggatacccaa cccaggtgac aagattgta tag                                     1053
  
```

<210> 49

<211> 421

5 <212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> caract_misc

<222> (58)..(65)

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

<400> 49

```

Met Ala Ala Ala Asp Ala Lys Ala Ile Val Leu Ala Ser Thr Cys
1           5           10           15

Val Leu Val Ala Thr Cys Ala Thr His Phe Gly Ala Gly Arg Ala Leu
          20           25           30

Trp Ser Asp Arg Gly Trp Arg Ala Trp Gln Pro Met Arg Gly Arg Arg
          35           40           45

Ala Phe Val Ala Leu Gln Pro Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50           55           60

Xaa Gly Ala Gly Glu Pro Leu Val Gly Val Ser Leu Ala Phe Phe Asp
65           70           75           80

Glu Thr Arg Ala Gly Gly Arg Thr Ser Glu Thr Met Asp Ala Arg Asn
          85           90           95

Val Ala Arg Val Val Gln Met Leu Thr Val Leu His Val Val His Ala
          100          105          110

Pro His Met Ala Val Phe Ala Val Leu Gly Thr Ala Tyr Ala Leu Gly
          115          120          125

Arg Trp Arg Thr Leu Ala Ala Val Val Ala Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr
          130          135          140
  
```

ES 2 610 482 T3

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

<210> 50
 <211> 1266
 5 <212> DNA
 <213> *Ostreococcus tauri*

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (174)..(193)
 10 <223> n e s a , c , g , o t

ES 2 610 482 T3

<400> 50

```

atggcggcgg cggcgggacgc gaaagccatc gtcttggcct cgacgtgctg cctcgtcgcg      60
acgtgcgcga cgcacttcg cgcgggccga gcgctgtgga gcgatcgagg atggcggggc      120
tggcagccga tgcgcggacg gcgcgcgttc gtggcgctgc agccgggtggg gtgnnnnnnn      180
nnnnnnnnnn nnnnggggtgc ggggtgagccc ttggtggggg tgcgctggc gttttttgat      240
gagacgcgcg cgggcggggcg gacgtcggag acgatggacg cgcgaaactg cgcgcgcgtg      300
gtgcagatgt tgaccgtctt gcacgtcgtg cacgcgcgcg acatggcggg gtttgcgggtg      360
ttggggacgg cgtacgcgctt gggtcgatgg cgtacgctcg cggcgggtggg cgcgttgtac      420
gcgtcgacgt acgtgacgag acagaagtcg ctcgagcggg gacagagaaa gtgggagcag      480
ttccagacgt ggacgcttcg gacggtggag gggcgggcga aatcgtggtg cgggagcgtg      540
cgcgtggtgc acgacgggaa ggtttcggaa gcggcgcatt cgtcgcgcga cgtcttcgcg      600
taccaccgac actcgatggt tcccgcgggc gccgtgtggt ttcacatgct cccggatttt      660
agcgcgccgtt ttcgcgggat tcaaccggtg acgctcgcag cctcggtttt gtttaaggca      720
ccgatcgtcc gggagccttc ggcgtggtt gccgttcgtg cggtgagcag agagattttc      780
cgttcgacgc tacgagagca aggcgcggtt gtcgtgtgcc cgggaggaca gcacgagatg      840
caagagcacg gaggctccgat ggaggagacg atcgttttat gcaccaaaca taaaggattc      900
attcgaatag cgatecgagga gcgcgcgcgc gtcgtccccg tgatttgttt cggcgagagc      960
aagagttgga ccaacatcat ggcaaagccg ggcggttacc tctacagacg ctttcgattc     1020
ggtttcacc cgttactagc cgtgggctac ctccgaattc ttccgctccc gagacgcgta     1080
cccacacgt tcgtcatcgg cgagccgatg gtacttctctg atccggatgc cttgacggga     1140
ctggcgaagg aatcggatgt cgacgcgttc cacgcgtcgt attacagtca agtggagaga     1200
ctgttcgacg agcacaatc caaagccggg ttcctgagc tttgcctcgt gatgaaaaac     1266
gattag

```

<210> 51

<211> 325

5

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 51

```

Met Ser Arg Ser Ile Val Asp His Gly Val Leu Leu Val Trp Leu Gly
 1          5          10          15

Leu Phe His Ala Leu Val Val Val Val Val Val Ala Ile Val Ala Leu
          20          25          30

Glu Arg Arg Arg Ala Met Thr Val Leu Ala Ala Leu Met Ser Leu Ser
          35          40          45

Val Val Pro Arg Arg Ile Arg Pro Arg Trp Gly Val Thr Leu Ala Arg
          50          55          60

Ala Ile Thr Arg Thr Ala Lys Ser Tyr Phe Pro Cys Ala Leu Thr Phe
          65          70          75          80

Glu Asn Glu Glu Ala Tyr Leu Lys Gly Ala Arg Lys Gly Val Gly Arg
          85          90          95

Leu Val Gly Leu Glu Pro His Gly Ala Leu Pro Leu Ser Val Ile Ala
          100          105          110

Phe Ala Asp Tyr Phe Met Phe Asp Glu Asp Gly Ile Glu Ala Arg Gly
          115          120          125

Met Asn His Ala Ala Ser Met Asn Ser Arg Ala Leu Ala Ser Gly Ala
          130          135          140

```

ES 2 610 482 T3

Ile Phe His Val Pro Leu Val Arg His Leu Trp Thr Trp Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Pro Ile Ser Arg Arg Arg Met Thr Ser Met Leu Ser Asp Gly Ser
 165 170 175
 Thr Cys Val Ile Val Pro Gly Gly Val Ala Glu Cys Met Ala Met Glu
 180 185 190
 Arg Gly Val Glu Thr Leu Tyr Leu Lys Arg Arg Tyr Gly Phe Val Lys
 195 200 205
 Ile Ala Ile Gln Thr Gly Ala Ala Leu Val Pro Ala Tyr Thr Phe Gly
 210 215 220
 Gln Thr Arg Ala Tyr Lys Tyr Trp Arg Leu Gly Pro Pro Leu Val Pro
 225 230 235 240
 Thr Ser Val Ala Asn Trp Phe Ser Lys Thr Phe Ser Phe Ala Pro Met
 245 250 255
 Val Phe Trp Gly Lys Trp Phe Thr Pro Ile Pro Tyr Ala Thr Pro Leu
 260 265 270
 His Thr Val Val Gly Glu Leu Ile Glu Thr Thr Gln Asn Asp Asn Pro
 275 280 285
 Ser Arg Glu Glu Val Gln Ala Lys Leu Asp Glu Phe Ile Val Ala Met
 290 295 300
 Arg Ser Leu Tyr Asp Arg His Lys Ser Ala His Gly Tyr Ala Asp Val
 305 310 315 320
 Asp Leu Val Val Cys
 325

<210> 52

<211> 978

5 <212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 52

```

atgtcgcgct cgatecgtcga tcacggcgtg ctgctcgtgt ggttggggtt gttccacgcc 60
ctggtcgtcg tcgtcgtcgt cgcgatcgtc gcgctcagac gacgacgcgc gatgacggtg 120
ctcgcgcgct tgatgtcttt gagcgtcgtc ccgcggcgca tccgaccgcg ctggggcgtg 180
acgtgggcgc gcgcgatcac gcgcacggcg aagtcgtatt tcccgtgcgc gttgacgttt 240
gagaacgagg aggcgtacct gaaggggtgct cgaaggggtg tcgggcggtt ggtggggttg 300
gagccgcacg gagcgtgccc gctctcggtg atcgcgttcg cggattactt catgttcgat 360
gaagatggga tcgaggcgag ggggatgaat cacgctgcgt cgatgaattc gcgagcgttg 420
gcgtcggggg cgatatttca cgtcccgttg gtgcgacacc tgtggacgtg gttgggattg 480
gaaccgatat ctcgaaggcg gatgacgagt atgttaagcg acggttcgac gtgcgtgac 540
gtgccgggtg gggtggcgga gtgcatggcg atggagagag gggttgagac gctgtatctc 600
aagcgaaggt acgggttcgt gaagattgcg atacagacgg gcgcggcact cgtgccggcg 660
tacacgtttg gccagacgcg ggcgtacaag tactggcgac tcggtccgcc gttgtgccc 720
acgtccgttg caaattggtt ctcgaaaacg ttttctttcg cacccatggt tttttgggga 780
aagtggttca cgcccattcc gtacgtacc cctctgcaca cggtggttg cgagctcatc 840
gagaccacgc aaaacgacaa tccgagtcgc gaggaggtgc aggcgaaagct tgacgagttc 900
atcgtcgcta tgcgttcgct gtacgaccga cacaaatctg cacacgggta tgccgacgtc 960
gacctcgtcg tgtgctga 978
  
```

<210> 53

10 <211> 314

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

ES 2 610 482 T3

<400> 53

```

Met Arg Asn Ala Phe Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Tyr Val Leu Leu Asp
1           5           10           15

Arg Arg Ser Asp Ser Ser Gly Thr Arg Phe Val Ala Trp Ser Arg Arg
20           25           30

Leu Pro Phe Trp Arg Ile Leu Ala Asp Tyr Phe Pro Val Arg Leu Tyr
35           40           45

Lys Ser Gly Glu Leu Asp Pro Lys Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Tyr His
50           55           60

Pro His Gly Val Ile Gly Val Gly Ala Leu Met Thr Phe Ala Thr Glu
65           70           75           80

Ala Thr Gly Phe Tyr Glu Ala Phe Pro Gly Leu Asp Leu Arg Leu Leu
85           90           95

Thr Leu Ser Val Asn Phe Lys Phe Pro Phe Thr Arg Glu Val Leu Met
100          105          110

Ala Leu Gly Ile Asn Ser Val Thr Lys Ala Ser Val Met Thr Asn Leu
115          120          125

Thr Arg Ala Pro Gly Ala Ser Val Ala Ile Val Ile Gly Gly Ala Ala
130          135          140

Glu Ala Leu Asp Ala Arg Pro Gly Ser Ala Thr Leu Thr Leu Ala Arg
145          150          155          160

Arg Lys Gly Phe Val Lys Met Ala Leu Arg Thr Gly Ala Ser Leu Val
165          170          175

Pro Val Phe Ala Phe Gly Glu Asn Asp Ile Phe Glu Gln Val Glu Asn
180          185          190

Pro Asp Gly Gly Arg Leu Arg Lys Phe Gln Thr Tyr Ile Lys Gln Leu
195          200          205

Ile Gly Ile Ser Pro Pro Ala Phe Tyr Gly Arg Ser Leu Ser Arg Gly
210          215          220

Val Trp Arg Arg Ile Phe Gly Arg Lys Gly Val Leu Pro Lys Arg Glu
225          230          235          240

Pro Ile Glu Val Ile Ile Gly Asn Pro Ile His Val Pro Gln Val Asp
245          250          255

Asp Pro Ser Pro Asp Val Ile Asp Lys Tyr His Gln Leu Tyr Thr Val
260          265          270

Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Leu His Arg Arg Gln Phe His Gln Leu
275          280          285

Asn Arg Gly Gly Ser Ser Asp Asp Leu Leu Ser Asp Leu Ile Lys Arg
290          295          300

Lys Asn Asn Leu Gln Ala Met Thr Phe Lys
305          310

```

- 5 <210> 54
- <211> 945
- <212> DNA
- <213> *Ostreococcus tauri*

ES 2 610 482 T3

<400> 54

```

atgcggaacg cgttcttggg atacattggt tggtacgtgc tgttgaccg gcgctcggat    60
agctcgggca ctgatattcg ggcgtggtcg agacgtctac ctttttggcg catcctggct    120
gattacttcc cagttcgatt atacaagagc ggcgagctcg atccaaaagg gaattacttg    180
ttcgggtatc atccgcacgg cgtcatcggc gtcggggcgt tgatgacggt tgccaccgaa    240
gcgacgggat ttacgaagc atttccagga ttggatttac ggctcttgac gttatcggtg    300
aacttcaagt ttccatttac gcgagaggtg ttgatggcgc tcgggattaa ctccgtcact    360
aaggcgagcg tcatgaccaa tcttaccgcg gcaccaggcg cgagcgtcgc catcgtcatc    420
ggcggcgccg cagaggcgtt ggacgctcgt ccgggatcgg ccacgctcac gctggcgaga    480
cgtaaagggt tcgtgaaaat ggctctgcgc acgggtgcat cgctcgtgcc tgtttttgcc    540
ttcggggaga acgatatttt cgagcaagtc gagaatcccg acggcgggcg cctgcgcaag    600
tttcagacgt acatcaagca actcatcggg atctcaccgc cggcttttta cggccgctcg    660
ctcagtcggg ggggtggtcg tcgcattttt gggcgtaagg gagtgcgtcc gaagcgtgaa    720
ccgatcgaag tgatcatcgg taatcccata cacgtccctc aggtggacga tccgtcgccc    780
gacgtcatcg acaagtatca tcaattgtac accgtgggac tcaaggaact ttacgagctg    840
catcgcagac aatttcacca gttgaatcgc ggaggttctt ccgacgatct gctaagcgat    900
ctgatcaagc gtaagaacaa cctccaagcc atgacattca aatag                                945
  
```

<210> 55

<211> 354

5

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 55

```

Met Arg Thr Ser Ser Gly Ala Gly Gly Thr Arg Ala Arg Arg His Cys
 1          5          10          15

Ala Thr Thr Asp Val Ala Arg Ser Phe Asp Ala Val Arg Arg Glu Met
      20          25          30

Arg Glu Ala Arg Gly Ile Ala Asp Val Pro Trp Ser Ser Leu Lys Arg
      35          40          45

Leu Leu Gly Val Ser Cys Val Ser Ala Ile Tyr Thr Ser Trp Ile Leu
 50          55          60

Ser Pro Val Met Ser Ala Leu Ala Val Trp Arg Tyr Glu Trp Leu Arg
65          70          75          80

Ala Tyr Val Ala Cys Tyr Leu Phe Ala Ser Tyr Ala Leu Gly Val Ala
      85          90          95

Met Pro Met Asn Ala Leu His Arg Phe Phe Cys Trp Leu Glu Thr Gly
      100          105          110

Glu Glu Asn Gly Trp Gln Leu Val Val Glu Asp Asp Cys Asp Val Asp
      115          120          125

Cys Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Thr Ala His Pro His Gly Leu Phe
      130          135          140

Ala Ser Gly Cys Val Gly Asn Val Val Leu Ser Gly Arg Ala Leu Lys
  
```

ES 2 610 482 T3

145	150	155	160
Arg Phe Arg Ala Arg Arg Ile Trp Phe Phe Ile Asn Glu Leu Leu Ile	165	170	175
Arg Val Phe Pro Ile Ile Lys Asp Val Leu Ser Met Leu Gly Phe Val	180	185	190
Pro Cys Thr Ala Lys Met Met Lys Lys Val Leu Gly Arg Gly Glu Thr	195	200	205
Gly Leu Ile Val Val Gly Gly Val Gln Glu Val Val Leu Thr Gly Asn	210	215	220
Val Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Leu Lys Asn Cys Phe Gly Phe Val Lys	225	230	235
Val Ala Met Gln Ala Gly Thr Pro Leu Val Pro Val Tyr Thr Phe Gly	245	250	255
Glu Ser Leu Ala Thr Gly Pro Asp Trp Val Pro Phe Arg Glu Leu Arg	260	265	270
Lys Arg Leu Ser Tyr Lys Phe Val Phe Pro Phe Arg Ser Leu Gly Ile	275	280	285
Ile His Arg Trp Gly Leu Cys Phe Pro Lys Ala Lys Leu Thr Thr Val	290	295	300
Val Gly Ala Pro Ile Glu Val Lys Gln Asn Pro Asn Pro Thr Arg Glu	305	310	315
Glu Val Ala Ala Val His Gln Gln Tyr Cys Asp Ala Leu Leu Ala Met	325	330	335
Ile Glu Arg Asn Lys Ala Arg Ala Gly Tyr Pro Thr Gln Arg Thr Lys	340	345	350

Leu Val

<210> 56
 <211> 1065
 <212> DNA
 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 56
 atgcgaacct cctcggggcgc gggaggaacg cgcgcgcgtc gtcactgtgc gacgacggac 60
 gtcgcgcgat cgttcgacgc cgttcgcagg gagatgcgag aggcgcgagg gatcgcggac 120
 gtcccctgga gctcgcctcaa gcgcttgctc ggtgtctcgt gcgtgagcgc gatttacacg 180
 tcgtggatcc tctccccggt gatgagcgcg ctccgcgggtgt ggcggtagca gtggttgaga 240
 gcgtacgtcg cgtgctatct ctccgcgtcc tacgcgctcg gcgtggcgat gccgatgaac 300
 gcgctgcatc gtttcttctg ttggctcgag acgggagagg aaaacgggtg gcagctcgtc 360
 gtcgaggacg actgcgatgt ggactgctcg aagagggcgt acttggtcac ggcgcatccg 420
 cacggggtgt tcgcgctcggg atgcgctcggg aacgtcgttt tgagcggacg cgcgctcaag 480
 aggttccggg cgagacggat ttggttcttc atcaacgagc tgtaaatccg agtgtttccg 540
 atcatcaagg acgtggttgc gatgctggga ttctgtgccg gcacggcgaa aatgatgaag 600
 aaggtggttg gaagggggcga gaccggattg atcgtcgtcg gtggggttca ggaggttggt 660
 ttgactggta acgtcgacga agaggaactt tatctaaaaa attggttcg cttgtcaca 720
 gtggccatgc aggcggggac gccgctcgtg cccgtataca cattcggcga atcgctagcc 780
 accgcccggg actgggtacc gttcagagag ctgcgtaaac ggctgagcta caagtttgtg 840

ttcccgtttc gctcgccttg cataatccat cgtcgggggc tctgctttcc caaggcaaa 900
 ctcacgaccg tggtaggcgc gccgattgag gtgaaacaaa acccaaatcc cacgcgcgag 960
 gaagttgcgg cgggtgcatca gcagatttgc gacgcaactg tggcgatgat tgagcgaaac 1020
 aaggcccgcg cgggggtatcc gacgcaacgc acaaagttgg tgtaa 1065

<210> 57
 <211> 359

5

10

ES 2 610 482 T3

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 57

```

Met Lys Glu Arg Arg Ser Gly Leu Asn Pro Ser Gly Ser Ser Val Tyr
1          5          10          15

Pro Leu His Pro Pro Asp Ser Arg Val Leu Val Arg Val Pro Ser Asp
          20          25          30

Ile Ser Phe Leu Asp Arg Leu Ile Val Ala Gly Ser Ser Ile Phe Ile
          35          40          45

Val Gly Ser Leu Val Trp Val Pro Leu Thr Ala Arg Trp Val Tyr Arg
          50          55          60

Arg Trp Lys Gln Ala Lys Asp Lys Arg Lys Arg Ala Leu Tyr Ala Ser
65          70          75          80

Leu Leu Val Ile Leu Ala Val Leu Val Ile Gly Gly Pro His Arg Ser
          85          90          95

Pro Arg Val Gly Lys Trp Leu Gln Val Arg Lys Trp Ser Leu Phe Gln
          100          105          110

Ala Trp Val Lys Phe Ile Ala Met Glu Val Ile Leu Asp Gln Pro Lys
          115          120          125

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

Pro His Gly Ile Phe Pro Phe Ala Phe Ala Phe Gly Val Leu Pro Asp
145          150          155          160

Ile Ala Thr Gln Ser Phe Gly Tyr Val Arg Pro Val Val Ala Thr Ala
          165          170          175

Thr Arg Leu Phe Pro Val Val Arg Asp Phe Ile Ser Trp Ala Asn Pro
          180          185          190

Val Asp Ala Ser Lys Asp Ser Val Glu Arg Ala Leu Ala Leu Gly Asp
          195          200          205

Arg Ile Ala Val Ile Pro Gly Gly Ile Ala Glu Ile Phe Glu Gly Tyr
210          215          220

Pro Lys Pro Asn Thr His Pro Asp Glu Glu Tyr Ala Ile Val Arg Ser
225          230          235          240

Gly Phe Leu Arg Leu Ala Ile Lys His Gly Ile Pro Val Ile Pro Val
          245          250          255

Tyr Cys Phe Gly Ala Thr Lys Met Leu Lys Arg Leu Glu Leu Pro Gly
          260          265          270

```

ES 2 610 482 T3

Leu Glu Gln Leu Ser Leu Phe Leu Arg Val Ser Ile Cys Leu Phe Phe
 275 280 285
 Gly Val Gly Gly Leu Pro Ile Pro Phe Arg Gln Arg Leu Ser Tyr Val
 290 300
 Met Gly Gln Pro Ile Leu Pro Pro Val Arg Thr Thr Gly Ser Asp Ile
 305 310 315 320
 Ser Asp Ala His Val Lys Glu Met Gln Asp Arg Phe Cys Ala Glu Val
 325 330 335
 Gln Arg Leu Phe Asp Arg His Lys Glu Ala Tyr Gly Trp Ser His Lys
 340 345 350
 Thr Leu Lys Leu Leu Glu Gln
 355

<210> 58

<211> 1080

5 <212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 58

atgaaagaaa	gaagatctgg	cctaaatccg	tcaggatcct	ccgtgtatcc	attgcaccct	60
cctgacagtc	gcgttctcgt	tcgagtcgcc	tccgatattt	cctttcttga	tcgtctcatc	120
gtcgtctggca	gcagtatcct	tattgtcggg	tcgctagtat	gggttccatt	gaccgcaaga	180
tgggtctaca	ggcggtgga	gcaagctaaa	gataaacgaa	agcgggcttt	gtatgcctct	240
ctactcgtga	ttctggcagt	tctcgttatt	ggcggaccct	accgatctcc	tcgtgtcggc	300
aaatggctcc	aagtacgaaa	gtggtccttc	ttccaagcgt	gggtaaagtt	tattgctatg	360
gaagtgattt	tggatcaacc	gaaaggcatt	actatggacg	tccaacaaga	caaggcgatt	420
tttgattcgc	cgccacatgg	aatctttccg	tttgcgttcg	cctttggagt	gcttcccgat	480
attgccacac	aatcgtttgg	ctacgttcgt	ccggtcgtgg	caaccgccac	aaggttgttt	540
cctgtagtcc	gggatttcat	ctcttggcgg	aatccggtag	acgcttccaa	agattccggt	600
gaacgtgctt	tagcattggg	cgatcgcatt	gctgtaatac	ctggaggaaat	tgcagaaatt	660
ttcgaaggat	atccgaaacc	gaacacgcat	ccggatgaag	agtacgctat	cgtacggagt	720
ggatttttgc	gtttggcaat	aaaacacggt	atcccagtga	ttcccgtata	ctgtttcggc	780
gctaccaaaa	tgttgaagcg	tctggagctt	cctggcctgg	agcaactgtc	cctgtttcta	840
cgcgtagaca	ttgcctctt	ttttggagtc	ggcgggttgc	ccatcccttt	ccgacaacga	900
ttgtcgtacg	taatgggaca	accaattttg	ccaccgtaa	ggacaacggg	cagcgatatt	960
tcggacgcac	acgtcaaaga	aatgcaagat	cgcttttgtg	ctgaggtcca	gcggtctttt	1020
gatcgacata	aggaagctta	tggttggctc	cacaaaacgc	tgaaactatt	ggaacagtga	1080

<210> 59

10 <211> 392

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 59

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

15

ES 2 610 482 T3

Val Gln Pro Met Ser Phe Val Glu His Thr Ala Cys Cys Leu Phe Leu
 65 70 75 80
 Ala Phe Gly Val Pro Asn Gly Ala Leu Thr Ile Pro Ile Ala Thr Trp
 85 90 95
 Leu Ile Gly Lys Phe Val Val Arg Asn Val Phe Leu Ala Phe Leu Leu
 100 105 110
 Ala Gly Cys Ile Leu Leu Pro Leu Ala Ile Leu Pro Gln Glu Tyr Val
 115 120 125
 Pro Ala Arg Leu Gln Ser Trp Leu Ala Leu Gln Ile Leu Lys Tyr Phe
 130 135 140
 Ser Phe Ser Leu Val Met Glu Glu Arg Pro Pro Thr Met Cys Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Gln Leu Ile Glu Gln Pro Ala Arg Pro Arg Ile Val Thr Ala Tyr
 165 170 175
 Pro His Gly Val Phe Pro Tyr Gly Asn Ala Leu Thr Val Val Thr Trp
 180 185 190
 Pro Leu Leu Thr Gly His His Ile Val Gly Leu Ala Ala Asn Ala Ala
 195 200 205
 Leu Arg Thr Pro Ile Phe Lys Gln Ile Leu Arg Ser Ile Gly Val Lys
 210 215 220
 Asp Ala Ser Arg Ala Ser Val Arg Asn Ala Leu Glu Thr Trp Pro Phe
 225 230 235 240
 Thr Val Gly Ile Ser Pro Gly Gly Val Ala Glu Val Phe Glu Thr Asn
 245 250 255
 His Phe Asn Glu His Ile Leu Leu Lys Glu Arg Ile Gly Val Ile Lys
 260 265 270
 Met Ala Ile Arg Thr Gly Ala Asp Leu Val Pro Gly Tyr Met Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Thr Asn Leu Tyr Trp Cys Trp Thr Gly Glu Gly Ile Pro Gly Ala
 290 295 300
 Arg Trp Leu Leu Glu Tyr Val Ser Arg Lys Ile Leu Gly Phe Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Pro Ile Ala Gly Arg Trp Gly Leu Pro Ile Pro Tyr Arg Thr Pro
 325 330 335
 Ile Leu Cys Val Val Gly Lys Pro Ile Pro Thr Ile His Leu Gln Thr
 340 345 350
 Glu Glu Pro Ser Met Glu Gln Ile Val Asp Ile Gln Glu Gln Leu Ser
 355 360 365
 Thr Glu Leu Lys Ser Met Phe Asp Arg Tyr Lys His Leu Tyr Gly Trp
 370 375 380
 Glu Asp Arg Met Leu Val Ile Thr
 385 390

<210> 60

5 <211> 1179

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

ES 2 610 482 T3

<400> 60

```

atgctgagc gaagctgcgc caacgcttct gacgatgaca gcattcacia gcagtcgcca      60
gaattggagg ctgagtttct tcataccagc aagttgacct tagccgacat gcgacgattg     120
gcgcacgatc cgaaggatcg gaggttggca acaaaacctg cggcgcaagc tacgaaagaa     180
gacgtcttga cgttacaacc catgagtttc gtagaacaca ctgcttgctg tctgtttctc     240
gcgtttggag tgcccaatgg cgctctgacg attcccatag caacgtggct gatcggaaaa     300
ttcgtggtag gcaacgtttt cttggcgttt ctgttagcag gctgtatact tctaccgctt     360
gcgatactgc cgcaagaata tgtgcccgcc cgattgcaat cgtggcttgc tttgcagata     420
ctgaaatatt tttcttttct tttggtcatg gaggaacgcc ctccgacaat gtgtactggc     480
aagcagctga tgcagcagcc cgctcggcca cgaatcgtea cagcctatcc gcacggagtt     540
ttcccatacg gaaacgcgct gactgtagtc acatggccgt tgttgacggg acaccatatt     600
gtgggtttgg cagcaaatgc cgctttgctg acaccgatct ttaaacaat cttgcggagc     660
attggcgtca aggacgcctc tgcagcgtcg gtacggaatg cgctggaaac atggcctttc     720
accgtcggga tttcgccagc tggcgtggcg gaagtttttg aaacaaacca cttcaatgag     780
cacattctgt tgaagaagc tattggtgtc atcaagatgg ccattcgcac cgggtcggat     840
cttgtaccag gctatatgta tggtaatact aatctgtact ggtgctggac aggggaaggt     900
attcctggag ctcggtggct attggagtat gtttcgctga aaatcctagg ttttgcctc     960
gtgcctatag cgggtagatg gggactacca ataccgtaca ggactccgat attgtgtgtc    1020
gtgggcaagc caataccaac cattcatttg caaacggaag aaccatcaat ggagcaaatc    1080
gtggacattc aggaacaatt gtcaacagaa ttgaaatcaa tgttcgaccg ctataagcac    1140
ctgtacggat ggaagatcg aatgctagtg atcacataa                               1179
  
```

<210> 61

<211> 329

5 <212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 61

```

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

ES 2 610 482 T3

130 135 140
 Pro Thr Ala Val Ala Asp Ala Leu Leu Tyr Thr Pro Ile Leu Lys His
 145 150 155 160
 Val Leu Gly Ile Phe Gly Leu Ile Ser Ala Ser Lys Ser Ser Met Ile
 165 170 175
 Arg Thr Leu Lys Lys Lys Gly Val Glu Gly Thr Ile Val Leu Tyr Val
 180 185 190
 Gly Gly Ile Ala Glu Leu Phe Leu Thr Asp Glu Thr Asp Glu Arg Leu
 195 200 205
 Tyr Leu Arg Lys Arg Lys Gly Phe Ile Lys Leu Ala Leu Gln Gln Gly
 210 215 220
 Val Asp Val Val Pro Val Tyr Leu Phe Gly Asn Thr Asn Ala Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Lys Thr Gly Phe Leu Ala Ala Ile Ser Arg Lys Leu Gln Ile
 245 250 255
 Ser Leu Thr Tyr Ile Trp Gly Lys Trp Tyr Leu Pro Ile Pro Arg Asp
 260 265 270
 Cys Lys Leu Leu Tyr Ala Ser Gly Gln Pro Leu Gly Met Pro His Ile
 275 280 285
 Leu Asp Pro Ser Gln Ala Asp Ile Asp Lys Trp His Glu Lys Tyr Cys
 290 295 300
 Ser Glu Val Met Arg Ile Phe Glu Lys Tyr Lys Glu Lys Val Pro Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys His Lys Lys Leu Glu Ile Ile
 325

<210> 62

<211> 990

5 <212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 62

atggagagaa caaagataca agacgagcac aaaagtcccc ctaatccgtc gacatttcga 60
 tggttcctcg gccttctagt ggcgtcgaag ttttccatgg tctattttgt ggctcccttt 120
 tacatgctta cagtcgtggt tgcactagtt ttcaaatatc cttcggtaga aattgcatgg 180
 atgtacgcta ttccgatgat tgtctcggcc attttgccac caatggcttc tccacttgcc 240
 ttgcgactca tctccccgct cattgactac ttcgattacg aagagatcca cgaaacctca 300
 ccggtggacg tccagaagga aataactaagc aacaacaaaa actatttgct agtctttcaa 360
 ccgcatggag cactgtcgtt tacaggaatc acttcaatgg tgacagctcc acaagcaatg 420
 aaagcfaat tgccaacagc tgtggctgac gcactcttgt acacacctat actgaaacat 480
 gtcttaggaa ttttcgggct gattagtgcc tccaaaagca gcatgatccg aactttaaaa 540
 aagaagggtg tgaaggaac cattgttttg tacgttgggt ggattgccga gctctttttg 600
 accgacgaga cggacgagcg cctctatctg cgaaagcgaa aagggtttat caaatagct 660
 ctacaacagg gtgtcgatgt tgtacctgtg tatctatttg ggaacacaaa cgcgctgtcg 720
 gtactaaaga cgggatttct cgcggcaatt tcgcgaaaa tacagatata tctgacgtac 780
 atttggggaa agtggtatct tccgattccc cgtgattgca aattgctgta tgcttccggt 840
 cagccattag gaatgcctca tatttttagac ccaagccaag ccgacattga taaatggcac 900
 gaaaagtact gctccgaggt catgcggatc ttcgaaaaat acaaggaaaa ggttccggaa 960
 tacaagcaca agaaattaga aattatttga 990

<210> 63

<211> 320

<212> PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

10

ES 2 610 482 T3

<400> 63

```

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

Cys Leu Met Ile Ile Pro Asn Val Gly Ile Leu Ile Ala Thr Phe Leu
20          25          30

Tyr Pro Lys Val Leu Gly Phe Tyr Phe Leu Ile Pro Tyr Tyr Ala Tyr
35          40          45

Asn Leu Ser Ile Gly Lys His Glu Ala Arg Asp Gly Asn Gly Trp Asn
50          55          60

Trp Phe Ser Glu Asn Phe Phe Val Phe Asn Ile Val Arg Gly Tyr Leu
65          70          75          80

Asn Leu Lys Ile Glu Ala Asp Ser Glu Leu Lys Glu Ala Glu Ala Lys
85          90          95

Glu Gly Ala Gln Phe Val Phe Ala Val Ser Pro His Gly Thr Asn Ala
100         105         110

Asp Tyr Arg Val Phe Ile Asp Gly Met Leu His Glu Ala Leu Pro Gln
115        120        125

Thr Ala Ser Lys Ile Arg Thr Leu Ala Ala Thr Val Leu Phe His Ile
130        135        140

Pro Leu Val Arg Glu Ile Ala Leu Trp Thr Gly Cys Val Asp Ala Ser
145        150        155        160

Arg Ala Val Ala Val Glu Arg Leu Lys Glu Glu Gly Gly Ser Leu Leu
165        170        175

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

Glu Arg Val Tyr Leu Lys Arg Arg Lys Gly Phe Leu Lys Leu Cys Leu
195        200        205

Lys Tyr Glu Ile Pro Val Val Pro Ala Tyr Val Phe Gly Val Ser Asp
210        215        220

Tyr Tyr Phe Thr Ser Ala Lys Leu Phe Gly Leu Arg Met Trp Leu Val
225        230        235        240

Gln Asn Leu Gly Ile Ala Leu Pro Leu Cys Trp Gly Arg Tyr Gly Leu
245        250        255

Pro Ile Cys Pro Arg Pro Val Asp Thr Thr Leu Val Phe Asp Lys Pro
260        265        270

Leu Tyr Leu Ser Cys Gln Asn Pro Ser Asn Pro Ser Glu Asp Glu Val
275        280        285

Asp Lys Ala His Leu Gln Phe Cys Gln Ala Leu Glu Lys Leu Phe Asp
290        295        300

Thr His Lys Glu Arg Leu Gly Tyr Gly Asp Arg Lys Leu Glu Ile Ile
305        310        315        320

```

- 5 <210> 64
- <211> 963
- <212> DNA
- <213> *Phaeodactylum tricornutum*

ES 2 610 482 T3

<400> 64

atgaccagat	cgaagtttat	aggaagtgct	ggagctattg	gcttatTTTTg	ttt gatgatc	60
ataccgaatg	tgggaattct	gatcgcaaca	tttctttatc	ccaaagtact	tgggttctac	120
tttctgattc	cgtactacgc	atacaacttg	tccattggca	aacacgaagc	tcgagacggc	180
aacggctgga	attggttcag	cgagaatttc	tttgtcttta	acattgtgag	gggatatcta	240
aatcttaaga	ttgaagctga	ctccgagctc	aaggaagccg	aagcgaaaaga	aggcgcccaa	300
tttgtgttcg	ccgttagccc	tcacggaacg	aacgcagact	atcgagtttt	tattgacggg	360
atgctacatg	aggcactccc	acagactgca	agcaagatca	gaacactagc	ggcgacagta	420
ctgttccaca	ttcccttggt	tcgtgaaatc	gcactttgga	caggatgtgt	cgatgcccagc	480
cgcgcagttg	ctgtcgagag	attaaaagaa	gaaggtgggt	cactgcttgt	gattcccggg	540
ggccaagcag	aacaaatgta	cacccaatat	ggacgtgaaa	gagtatatct	gaaacggcgc	600
aaaggatttt	tgaagctttg	cttgaagtac	gagattccgg	tcgtcccagc	ttatgttttt	660
ggcgtatctg	actattactt	cacgtccgca	aagctctttg	gtctgcgaat	gtggctcggt	720
cagaatcttg	gcattgctct	tccactgtgc	tggggaagat	atgggtctacc	aatctgtcct	780
agaccagtcg	ataccaccct	tgtctttgac	aaacctttat	acctatcctg	ccagaatccg	840
tcgaatccct	cggaagacga	ggttgacaag	gctcatctgc	aattttgcca	agccctcgag	900
aagctgtttg	atacacacaa	agagaggctt	gggtacggcg	atcgaaagct	ggaaataatt	960
tag						963

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado o purificado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15, en donde el polipéptido tiene actividad diacilglicerol aciltransferasa.
- 5 2. El polipéptido aislado o purificado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada o purificada que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica el polipéptido aislado o purificado de la reivindicación 1.
- 10 4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde la molécula de ácido nucleico está presente en un vector.
5. Una planta transgénica que incluye la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
6. Una célula de levadura transformada con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
7. Un método para incrementar los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga en una planta, comprendiendo el método:
 - 15 introducir en la planta una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 y 15, estando incrementados los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga en comparación con los niveles en una planta que carece de la construcción de ácido nucleico.
 - 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la construcción de ácido nucleico se introduce en la planta mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.
 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, comprendiendo el método además: introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad piruvato deshidrogenasa quinasa de Brassica, un polipéptido con actividad diacilglicerol acetiltransferasa, y/o un polipéptido con actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la planta.
 - 25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en *Arabidopsis thaliana*, *Borago* spp., Canola, *Ricinus* spp., *Theobroma* spp., *Zea* spp., *Gossypium* spp., *Crambe* spp., *Cuphea* spp., *Linum* spp., *Lesquerella* spp., *Lamnanthes* spp., Linola, *Tropaeolum* spp., *Oenothera* spp., *Elaeis* spp., *Archis* spp., colza, *Carthamus* spp., *Glycine* spp., Soja spp., *Helianthus* spp., *Nicotiana* spp., *Vernonia* spp., *Triticum* spp., *Hordeum* spp., *Oryza* spp., *Avena* spp., *Sorghum* spp., *Secale* spp., Brassicaceae, y otros miembros de la familia de plantas *Gramineae*.
 - 30 11. Una planta producida por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 – 10.
 12. Una semilla que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3 recolectada a partir de la planta producida mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 – 10.
 13. El método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además: recolectar una semilla de la planta.