

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 521**

21 Número de solicitud: 201631493

51 Int. Cl.:

C12N 15/63

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.06.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070762

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (100.0%)
Avenida de Medina Azahara, 5
14071 Córdoba ES**

72 Inventor/es:

**RAMOS RUIZ, José y
GELIS, Samuel Alexis David**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo**

57 Resumen:

Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo.

La presente invención se refiere a una construcción genética que codifica un nuevo gen y/o su familia que confiere resistencia a estreses abióticos. En particular, la presente invención se refiere a una construcción genética que comprende la secuencia SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia SEQ ID NO.: 1. La presente invención también se refiere a un método para desarrollar cepas de microorganismos resistentes a estreses abióticos mediante la construcción genética de la presente invención.

ES 2 673 521 A1

DESCRIPCIÓN**Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo****Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una construcción genética que codifica un nuevo gen que confiere resistencia a estreses abióticos. La presente invención también se refiere a un método para desarrollar organismos resistentes a estreses abióticos mediante el uso de la construcción genética de la presente invención.

Estado de la técnica anterior

Las levaduras son microorganismos eucariotas, algunas de las cuales son usadas en procesos industriales como en la elaboración de vino, cerveza, en la industria panadera, así como en la producción de una extensa variedad de compuestos bioquímicos.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) ha sido clásicamente una levadura que despierta gran interés y sobre la que se han concentrado una gran parte de los esfuerzos y recursos de investigación. Sin embargo, existe un creciente número de alternativas a dicha levadura que hoy día se encuentran en estudio por sus diversas propiedades. Algunas de ellas ofrecen características que les confieren una ventaja significativa frente a *S. cerevisiae* para su uso en procesos industriales; de hecho, la utilización de las llamadas levaduras “no convencionales”, viene siendo una constante para procesos como la producción a gran escala de polisacáridos, aditivos alimentarios, combustibles, sustancias químicas y proteínas de interés farmacéutico y terapéutico (Wolf 1996; Domínguez *et al.*, 1998).

Debaryomyces hansenii (*D. hansenii*) es una levadura osmo-, halo- y xerotolerante (Breuer y Harms, 2006) presente en multitud de ambientes salinos y/o con baja actividad hídrica, como el agua de mar, salinas y diversos alimentos curados, bien como especie alterante (Fleet, 1992; Casas *et al.*, 2004) o bien debido a su capacidad para metabolizar los ácidos láctico y cítrico (Fleet, 1990; Seiler y Busse, 1990; Guerzoni *et al.*, 1993). Existen pocos estudios relacionados con la resistencia de *D. hansenii* ante un estrés oxidativo. Una oxidasa alternativa resistente a cianuro fue inducida en presencia de peróxido de hidrógeno y menadiona (Veiga, 2002).

Desde un punto de vista industrial, *D. hansenii* se emplea en la elaboración de quesos y salchichón, donde es beneficiosa por su actividad proteolítica y lipolítica, por su capacidad de metabolizar ácido láctico y de inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes, además de por su tolerancia a cambios en las condiciones de salinidad (Kurita y Yamazaki, 2002).

S. cerevisiae y otras especies de levadura como *Pichia pastoris* y *Schizosaccharomyces pombe* son muy importantes para la producción de química fina, productos alimentarios, bioquímicos, terapéuticos, etc. Esto también es pertinente para especies de bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *S. pombe*, *E. coli* y *B. subtilis* son especies de microorganismos que han sido extensamente estudiados y nuestro conocimiento sobre estas especies también las hacen las más manipulables y flexibles. Por eso es importante mejorar el rango operativo de estas y las demás especies de microorganismos que se usan para procesos comerciales.

En general, la concentración intracelular de potasio es más alta que la concentración extracelular y la concentración intracelular de sodio es más baja que la concentración extracelular. La célula mantiene esta homeostasis gracias a transportadores en la membrana. Por ejemplo, la expulsión de sodio en *S. cerevisiae* depende en gran medida del gen *ENA1*. La delección de este gen produce una levadura con una sensibilidad al sodio (García de Blas, 1993). En *D. hansenii* se han identificado homólogos de los transportadores involucrados en la expulsión de sodio en *S. cerevisiae* (Almagro 2001, Gunde-Cimerman 2009, Ariño 2010).

Otro método para mejorar la resistencia al sodio de *S. cerevisiae* ha sido la expresión heteróloga de *DhHOG1*, un gen homólogo a *HOG1*, en una cepa de *S. cerevisiae* que carecía del gen *HOG1*. La expresión de *DhHOG1* complementó la capacidad de acumulación de glicerol que regula el efecto osmótico. Aunque la resistencia al sodio fue mejorada, no fue mejorada al nivel de *D. hansenii* y esto indica que la halotolerancia de *D. hansenii* está relacionada con otros efectos además de la osmorregulación (Bansal y Mondal, 2000).

Existe por lo tanto una necesidad de nuevos métodos para mejorar la resistencia en microorganismos a estreses abióticos, con el fin de poder emplearlos por ejemplo en una mayor cantidad de procesos industriales.

El objeto de la presente invención es el uso de una construcción genética para mejorar la resistencia de organismos a estreses abióticos. Aquí se incluye el caso, por ejemplo, de las plantas de interés agrícola, como por ejemplo la judía (*Phaseolus vulgaris*) o el girasol (*Helianthus annuus*), muy sensibles al exceso de sales, en su gran mayoría.

También forma parte del objeto de la invención método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo.

Referencias

- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J. (2001). "Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*." *J Bacteriol.* 183:3251-5.
- Ariño, J., Ramos, J., Sychrová, H. (2010). "Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts". *Microbiol Mol Biol Rev.* 74: 95-120.
- Bansal, PK., Mondal, AK. (2000). "Yeast sequencing report. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* 16: 81–88.
- Breuer, U., Harms, H. (2006). "Debaryomyces hansenii--an extremophilic yeast with biotechnological potential". *Yeast.* 23: 415-37.
- Casas, E., De Ancos, B., Valderrama, M.J., Cano, P., Peinado, J.M. (2004). "Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts". *Int. J. Food Microbiol.* 1: 93-6.
- Dominguez, JM. (1998). "Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*". *Biotechnol Lett.* 20: 53–56.
- Fleet, G.H. (1990). "Yeast in dairy products". *J.Appl.Bacteriol.* 68:199-211.
- Fleet, GH. (1992). "Spoilage yeasts". *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 1-44.
- García de Blas B., Rubio F.J., Bañuelos M.A., Haro R., Rodríguez-Navarro A. (1993). "Diferencial expresion of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* 236: 363-368.
- Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Marchetti, R. (1993). "Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods". *Int J Food Microbiol.* 17: 329–341.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., Plemenitas, A. (2009). "Halotolerant and halophilic fungi". *Mycol Res.* 113: 1231-41.
- Kurita, O., Yamazaki, E. (2002). "Growth under alkaline conditions of the salttolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO10939". *Curr Microbiol.* 45: 277-80.
- Seiler, H., Busse, M. (1990). "The yeasts of cheese brines". *Int J Food Microbiol.* 11: 289–304.
- Veiga, A., Arrabac, J.D., Loureiro-Días, M.C. (2002). "Stress situations induce cyanide resistant respiration in spoilage yeast". *Journal of Applied Microbiology.* 95: 364-371.
- Wolf, K. (1996). "Non-conventional yeasts in biotechnology". A handbook. Springer-Verlag, Germany.

Breve descripción de la invención

La presente invención se dirige a una construcción genética para mejorar la resistencia a estreses
abióticos en un organismo, tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras y/o bacterias) y
plantas.

Específicamente, la presente invención se dirige a una construcción genética que comprende la
secuencia SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia
SEQ ID NO.: 1. Además, es objeto de la presente invención un vector que comprende la construcción
genética de la presente invención, así como un organismo que comprende la construcción genética y/o
el vector de la presente invención.

Es también objeto de la presente invención el uso de la construcción genética o el vector de la presente
invención para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo.

La presente invención proporciona además un método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos
en un organismo que comprende la etapas de expresar el producto de la secuencia SEQ ID NO.: 1 o
una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO.: 1 en un microorganismo por
encima de niveles de expresión endógena de dicho producto.

Descripción de las figuras

Figura 1: Primera etapa en la selección de clones con mayor tolerancia a NaCl.

Figura 2: Los transformantes de *S. cerevisiae* con genes de *D. hansenii* más toelrantes.

Figura 3: Alineamiento parcial de las proteínas codificadas por los genes *DEHA2F27434g*,
DEHA2D19448g, *DEHA2B00132g*, *DEHA2E00198g* y *DEHA2D00682g*. El alineamiento se realizó
mediante el programa CLC free Workbench. El grado de conservación en cada posición se indica
mediante la longitud de las barras de color rosa (de 0-100%).

Figura 4: Los clones portadores del gen SEQ ID NO.: 1 (pSUP1) presentan mayor tolerancia a sodio
que el control (pWS93 2).

Figura 5: Curvas de crecimiento de cepas CC02 (control) y CG05 (pSUP) en distintas
concentraciones de NaCl. A partir de una suspensión de células se inocularon medios líquidos, con
concentraciones de NaCl que se muestran en la Figura, a una D.O. inicial de 0.04. Se Siguió el
crecimiento durante diferentes intervalos de tiempo hasta un máximo de 52 horas.

Figura 6: El clon pSUP1, que contiene del gen SEQ ID NO.: 1 de *D. hansenii*, es más tolerante al
H₂O₂ que el control (pWS93 2).

Figura 7: Verificación de la implicación del gen SEQ ID NO.: 1 en la tolerancia al estrés salino mediante el estudio de los efectos de la curación del plásmido. Los dos primeros clones (de izquierda a derecha) han perdido el plásmido y se comparan con dos que no lo han hecho.

Figura 8: Número de veces con respecto a la actina en la que se ha amplificado el ARN suplementado o no 0.5 M NaCl durante 30 minutos. Se extrajo el ARN de *D. hansenii* crecida en presencia o no de NaCl, se retrotranscribió y se amplificó el ADNc con los cebadores correspondientes a los genes de estudio por RT-qPCR. La gráfica muestra por una parte, el número de veces con respecto a la actina que se han amplificado los genes de estudio, representándose en color más claro las células de *D. hansenii*, crecidas sin tratamiento y en colores más oscuros aquellas que sí lo recibieron. Por otro lado, se expone cuanta expresión posee las células tratadas con respecto las no tratadas para cada gen, indicado entre paréntesis. Estos datos se comprobaron con la realización del test t-student para una cola y se indica con * si son resultados significativos ($p \leq 0.01$) o ** si son muy significativos ($p \leq 0.0095$).

Figura 9: Número de veces con respecto a la actina en la que se ha amplificado el ARN procedente de células tratadas o no con 50 μ M de H_2O_2 durante 30 minutos. Se extrajo el ARN de *D. hansenii* tratada o no con H_2O_2 . Tras comprobar que el ARN no estaba contaminado con ADN genómico, se retrotranscribió y se amplificó el ADNc con los cebadores correspondientes a los genes de estudio por RT-qPCR. Se representó de la misma forma que en la Figura 8.

Descripción detallada de la invención

Construcción genética de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una construcción genética que comprende la SEQ ID NO.:1, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 1, tal y como un 75%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 1.

SEQ ID NO.: 1 se corresponde con la secuencia de ADN de DEHA2B00132:

```

ATGAGTTGTGTTTTCTGTCAATATTTAACCCTGCATTTTTGCAACAAAATGGAAGCACACGGCATAC
GTATTGTTGAGATTGATGGAGTTTCTATTTTAACACACGACGGAAATATTCTTAATCCGTTTTCCGA
GAGATTTACGCAGAGATATTTAGCGAATGTTGTAGGTTGTTCCAGCGTCCGTGAAGATATTCTATC
AACAATTAATAACCACTTTGATAACCACTCAAAAAGCCATTATGTGCGCAAAAAGTGTTGTATCTAC
CGATCACGCATCGGAAATAGCAGGAGTCAAAGAATCTAAGCTAAATGTTTGCAAGCTTTGCTTCAA
TCATGCCTCGAAGACTCACCTTAATCTTCATCTTAGAACAGAACACAGGGTCAATAGTAATTTCCA
ACAGCACGTCTTCAGAACAAACCGGGTATGCAATTCCCAACCAAAAAGTGCGGCTTTTCCTATTTATA
CCGCGAAAAAGAAGACACCAAGCCACCCACTTCAATGACAACCATGGAAGGCCCGCATACACATC
TCCGGCACGAGGACAAGTTCCTCCGCACAATCAACGCCAACCTATATTATGGAAAGGGATACCCGC
AGTACTTACACAGCGAAAACAAGGAAGAAAGTATACCGGTGTTTGAGGCCGTCAAGAAGTATATT

```

CTCCAGGACAGGCCACATTTGAAGGGCACGCATCCCATTACAAATCGGATGTTGCGAGAGGGCATA
TTGAAGGTTCCCGTTCTCTTTACGACCCAGGTGATCTATGCAAACCTATGCCAGCCGTTTTTCTACA
CGTTTGCCAAGGTATGCGGTAACCGAATCATCGAGGAAGTGGTGACCAATCCCACCGACGAAGTG
GTGAAGCGGGCGGTGATGGAGACGATCGAGAAGTATATTGTGGTGGAAGAAGACACGACTGGAAT
5 GTTTATGAGAGCCGTGATTATCTCGTTGATGCTTCCCGATGACAGGTTTGCGCAGTCGAAGGTGCG
AGCCAGAATCCTCGATGGCATCAACTATTTCTTGAAGTTGGCTATAGCAGACTATATGTTGATGAG
AAACAACGCCAATGGGATTCTTTGA

El grado de identidad existente entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales,
10 por ejemplo, por medio de algoritmos estándar de alineamiento de secuencias que son conocidos en el
estado de la técnica, como por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool.
J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10).

Por ejemplo, los genes denominados DEHA2F27434g (SEQ ID NO.: 2), DEHA2D19448g (SEQ ID
15 NO.: 3), DEHA2D00682g (SEQ ID NO.: 4) y DEHA2E00198g (SEQ ID NO.: 5), poseen un
porcentaje de identidad del 92%, 91%, 91% y 89% respectivamente, con respecto al gen denominado
DEHA2B00132g (SEQ ID NO.: 1).

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la construcción genética de la presente
20 invención comprende una secuencia que tiene al menos un 92% de identidad con la SEQ ID NO:1;
preferiblemente, esta secuencia es SEQ ID NO.: 2.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la construcción genética de la presente
invención comprende una secuencia que tiene al menos un 91% de identidad con la SEQ ID NO:1;
25 preferiblemente, esta secuencia es SEQ ID NO.: 3.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la construcción genética de la presente
invención comprende una secuencia que tiene al menos un 91% de identidad con la SEQ ID NO:1;
preferiblemente, esta secuencia es SEQ ID NO.: 4.

30 Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la construcción genética de la presente
invención comprende una secuencia que tiene al menos un 89% de identidad con la SEQ ID NO:1;
preferiblemente, esta secuencia es SEQ ID NO.: 5.

En una realización preferida, la construcción genética de la presente invención comprende la SEQ ID NO.: 2, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 2, tal y como un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 2.

5 SEQ ID NO.: 2 se corresponde con la secuencia de ADN de DEHA2F27434g:

ATGCATTTAACGCGTGACGAATGGAATCTCGACGACAGATGAGCTGTCCTTTTTTGAAAATATTG
AACCCTGCATCTTTTGCAACAAAAATGGAAGCAATACGCATTGTTGAGATTGATGGGGTTTCTGTTT
TAACACATGACAGAAACATTCTTAACCCTTTTTCCGAGAGATTTAACAAGAGATATTTAGTGAATG
CCATGGATTGTTCCATTGTCCGTGATGACATTCTATCAACAATTCATAACCACTTCGATAACCACTC
10 AAAAGACCATTATGTGCGAAAAAGGGTTGTTCCCATCAATTACTACTCTGAAATAGCGGGAGTCAA
GGAATCTAAACTCAATGTTTGCAAGATTTGTTTTAACCAATTGCGCGCTGAACTACATTAATCAACAT
CTCAAGAAAGAGCATGGCGTTAAGAGAAAATTCCAACGGCACGTCTTCAGAACAACCGGGTATGC
AATTCCCAACCAAAAGTGCGGCTTTTCCTATTTATACGGCGAAAAAGAAGACACCAAAACCGCCAC
TTCAATGACAACCATCGAAGGCCCGCTTACCCATCTCCGGTACGAGGACAAGTTCCTCCGCACAAT
15 CAACGCCAACCTATATTACGGAAAGGGATACCCGCAGTACTTACACAGCGAAAAACAAGGAAGAAA
GTATACCGGTGTTTGAGGCCGTCAAGAAGTATATTCTCCAGGACAGGCCACATTTGAAGGGCACGC
ATCCCATTTACAATCGGATGTTGCGAGAAGGCATATTGAAGGTTCCCGTTCTCTTTACGACCCAGGT
TATCTATGCAAACTATGCCAGCCGCTTTTTCTACACGTTTGCCAAGTTATGCGATAACCGAATCATC
GAGGAAGTGGTGACCAATCCCACCGACGAAGTGGTGAAGCGGGCGGTGATGGAGACGATCGAAA
20 GGTATATTGTGGTGGAAGAAGACACGACTGAAACGTTTATCAAAGCCGTGATTATCTCGTTGATGC
TTCCTGATGACCGGTTTGCGCAGTCAAAGGTGCGAGCCAAAATCTTTGACGGGATCAACTATTTCTT
GAAGTTGGCCATAGCAGACTATATGTTGATGAGAAACAACGCCAAGGAGATTATCAAAAACCTGGG
AACATCTAGCATACCAGGCATTTGAGTCCACACGGTCATACAACCATAAATTCAATAGGACGTTGC
CGGCTTTCCAGACGATAGTCGACCAGCAGGATAACCGAAAGGTGATGATCGGGTCGGTCAGATTC
25 AGTACGCCGGACCTCGGCAAGTTGGTTAGATGCTTGGTCCGGGAGTACCATAACCGGTTTCGAAAC
TTGCTACCGGACGGGATGTTGATGGTGGACGAGCTATACGAGGAGTTTCGAAAGCACGCCAAAGA
TATGTTACAGCTGCACGGATTTAGGATATAGTGTTTTCTACGGAACAGACGAACTCAACAAGCTTTCT
TATCAGCAGCGACGCACGTACGAGGAAGCCGTCCGGCGATAAATGGAAGAATCAAAAGTATATGAG
AAGCATGTTTGACCAGTTTACCAGGCTCAACTTGAATATCTTTGTATGCATCTTGATCACCTGTGGC
30 AGTCCATTTCCGGTGACGGAGTTGCTCACGTTGACGTTTGCCAACCCGACAGATTTGGTGCGCACG
ATGTATTATTCCAACGAGCATATTAGATTAACTTCTCTATAATAAGAATACGCATAGCAGCATG
CGATATTTCGAACCATAACCAAGATGTTGCCATTGAGGTTTCCAAAATAGTCATCCATTACGTGTCA
ATTATCAAATATTTGGAGGTTGCAATCGTGGAAGAGCACGGGTGGGCCAAGTCCAAAAGCGATAT
GAGCGTGGCAGACGATTGGGAAGACGACGAAGAGTTTGACGAGCTGGACGGAAATGATCTGGAAG
35 ATGGGGCTAGCTTGTTAGCGTCCAAGGCGCTTTCCAAGAGAGATGAAATAAAGACGCTCTTGTTCA
TGTATAAGCTCGGCCCGAGAAATGGGGGCCAGGTGTTCAAGTATTTGGAGCTGGTGAGTGAAAAG
TATATCAGGGAGAAGTATACGCCCAGGATTTTACGGCAGGCATTAGTCTATTTTACGCGGACGCTC
TTGGAAGAAGCAAAGTATCAAGGAGTGGGGATTCTCAATCGAATTGATTCCATTGCAGGTCATAGG

TCAGAGACCGCCGATTTGCAGTACGGAGTTACGCATAGCAATATGTATGCAAACCTATATGATGGA
TAA

En otra realización preferida, la construcción genética de la presente invención comprende la SEQ ID
NO.: 3, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 3, tal y como un
75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 3.

SEQ ID NO.: 3 se corresponde con la secuencia de ADN de DEHA2D19448g:

ATGGAAGCAATACGCATTGTTGAGATTGATGGGGTTTCTGTTTTAACACATGACAGAAACACTCTT
AACCCTTTTTCCGAGAGATTTAACAAGAGATATTTAGTGAATGCCATGGATTGTTCCATTATCCGTC
ATGACATTCTATCAACAATTCATAACCACTTCGATAACCACTCAAAGACCATTATGTGCGAAAAA
GGGTTGTTCCCATCAATTACTACTCTGAAATAGCGGGAGTCAAGGAATCTAACTCAATGTTTGCA
AGATTTGTTTTAACCATTGCGCGCTGAACTACATTAATCAACATCTCAAGAAAGAGCATAGCGTTA
AGAGAAATTTCCAACGGCACGTCTTCAGAACAAACGGGTATGCAATTCCCAACCAAAAGTGCGGCT
TTTCCTATTTATACCGCGAAAAAGAAGACACCAAACCGCCCACTTCAATGACAACCATCGAAGGCC
CGCTTACCCATCTCCGGCACGAGGACAAGTTCCTCCGCACAATCAACGCCAACCTATATTACGGAA
AGGGATACCCGCAGTACCTACACAGCGAAAACAAGGAAGAAAGCATACCGATGTTTGAGGCCGTC
AAGAAGTATATTCTCCAGGACATACCACATTTGAAGGGCACGCATCCCATTTACAATCGGATGTTG
CGAGAGGGCATATTGAAGGTTCCCGTTCTCTTTACGACCCAGGTGATCTATGCAAACCTATGCCAGC
CGTTTTTTCTACACGTTTGCCAAGTTATGCGATAACCGAATCATCGAGGAAGTGGTGACCAGTCCC
ACCGACGAAGTGTTGAAGCGAGCGGTGATGGAGACGATCGAGAAGTATATTGTGGCGGAAGAAG
ACACGACTGAAATGTTTATGAAAGTCGTGATTATCTCGTTGATGCTTCCCGATGACCGGTTTGCGCA
GTCGAAGGTGCGAGCCAAAATCTTTGACGGCATCAACTATTTCTTGAAGTTGGCTATAGCAGACTA
TATGTTGATGAGAAACAACGCCAAGGAGATTATCAAAAACTGGGAGAATCTAGCATACCAGGCA
TTTGA

En otra realización preferida, la construcción genética de la presente invención comprende la SEQ ID
NO.: 4, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 4, tal y como un
75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 4.

SEQ ID NO.: 4 se corresponde con la secuencia de ADN de DEHA2D00682g:

ATGGTAAGCTGCGAGATAAGTGTGCGCATGGCAAACCTATTTGCGGCAAATTGCCAATGCGAGTCAAA
GAATCTAAGCTAAATGTTTGCAAGCTTTGCTTCAATCATGCCTCAAAGTCACACATTAATCATCATC
TTAGAACAGAACACAGGGTCAATTGTAACTTCCAACGGCACGTCTTCAGAACAAACGGATATGCAA
TTCCCAACCAAAAGTGCGGCTTTTCCTATTTATACCGCGAAAAAGAATACACCAAACCGCCCACTT
CAATGACAACCATCGAAGGCCCGCATACCCATCTTCGACACGAGAACGAGTTCCTCCGCACAATCA
ACACCAACCTATATTACGGAAAGAGATACCCGCAGTACCTACACAGCGAAAACAAGGAAGAAAGC
ATACCAGTGTTTGAGGCCGTCAGAAGTATATTCTCCAGGACAGACCACATTTGAAGGGCACGCAT

CCCATTTACAACCGGATGTTGCGAGAGGGAATATTGAAGGTGCCGGCTCTCTTTACGACCCAGGTG
ATATATGCAAACCTACGCCGGCCGCTTTTTCTGTACGTTTGCCAAGTTATGCAATAACCGAATCATCG
AGGAAGTGGTGACCAATCCACCGACGAAGTGGTGAAGCGAGCGGTGATGGAGACGATCGAGAA
GTATATTGTGGTGAAGAAGACACGACTGAAATGTTTATGAAAGCCGTGATTATCTCGTTGATGCT
5 TCCCGATGACCGGTTTTCGCGAGTCGAAGGTGCGAGCCAAAATCTTTGACGGCATCAACTATTTCTT
GAAGTTGGCTATAGCAGACTATATGTTGATGAGAAACAACGCCAAGGAGATTATCAAAAACTGG
GAGAATCTAGCATACCATGCATTTGA

En otra realización preferida, la construcción genética de la presente invención comprende la SEQ ID
10 NO.: 5, o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 5, tal y como un
75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 5.

SEQ ID NO.: 5 se corresponde con la secuencia de ADN de DEHA2E00198g:

ATGGAGTCGCACGAATTACGTATTAGAGAAGTCGGGGGAGTGTCTATTTTAGTGACAAGGACAA
15 AATAGTAAATCCTTTGGCTGAGAAATTTGCAAATAAATATCTACCACGTCTTATCGAAAGTAGTGA
AATCCGCAGTACTATATTGTCGGAATTTAAAAGTTACTACCAGGAACATTCCAAACAGCATTATTT
ATTGAAGCAGATAATTGCTGTTACAGATGACTCCGAGGTACCAGGAGTCAAAGAATCTAAGCTAA
ATGTTTGCAAGCTTTGCTTCAATCATGCCTCAAAGTCACACATTAATCATCATCTTAGAACAGAACA
CAGAGTCAATTGCAACTTCCAACGGCAGTCTTCAGAACAACCGGGTATGCAATTCCCAACCAAAA
20 GTGCGGCTTTTCTTATATATACCGCGAAAAAGAAGACACCAAACCGCCCACTTCAATGACAACCAT
CGAAGGCCCGCATACCCATCTCCGGCAGCAGGACAAGTTCTCCGCACAATCAACGCCAACCTATA
TTACGGAAAGGGATACCCGAGTATCTACACAGCGAAAACAAGGAAGAGAGCATACCGGTGTTTG
AGGCCGTCAAGAAGTATATTCTCCAGGACAGGCCACATTTGAAAGGCACGCATCCCATTTACAACC
GGATGTTGCGAGAGGGAATATTGAAGGTGCCGGTCTCTTTACGACGCAGGTGATATATGCAAATT
25 ACGCCGGCCGCTTTTTCTACACGTTTGCCAAGTTATGCGATAACCGAATCATCGAGGAGGTGGTGA
CCAATCCACCGACGAAGTGGTGAAGCGAGCGGTGATGGAGACGATCGAGAAGTATATTGTGGTG
GAAGAAGACACGACTGAAACGTTTATGAAAGCCGTGATTATCTCGTTGATGCTTCCCGATGACCGG
TTTTCGCGAGTCGAAGGTGCGAGCCAAAATCTTTGACGGCATCAACTATTTCTTGAAGTTGGCCATA
GCAGACTAA

30 Las secuencias de ácido nucleico como por ejemplo las secuencias representadas en SEQ ID NO.: 1-5,
sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al
menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%,
o un 99%, de identidad con dichas secuencias, pueden estar operativamente unidas a una secuencia de
35 nucleótidos que codifica un promotor, tal y como una persona experta en la materia puede comprender.
El término “operativamente unida”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que la
proteína o proteínas es (son) expresada(s) en el marco de lectura correcto bajo el control del promotor
y las secuencias de control o reguladoras de expresión.

Opcionalmente, además de una secuencia que funciona como un promotor, la construcción genética de la presente invención puede incorporar otras secuencias de control o secuencias reguladoras de la expresión. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de la proteína de interés. Además de promotores, incluyen secuencias que codifican reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. Dichas secuencias de control de expresión pueden ser funcionales en células y organismos procariotas y/o en células y organismos eucariotas.

Ventajosamente, dicha construcción genética puede además comprender un marcador o gen que codifica para un motivo o fenotipo que permite la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción genética. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que podrían estar presentes en la construcción genética de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a compuestos tóxicos y, en general, todos aquellos que permitan seleccionar las células transformadas genéticamente.

Vector de la presente invención

La construcción genética de la presente invención puede estar comprendida en un vector apropiado. Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende la construcción genética de la presente invención. El vector puede ser cualquier tipo de vector, como un vector de clonación, un vector de expresión o un plásmido.

El término “*vector de clonación*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier vector adecuado para clonar, lo que generalmente supone la presencia de sitios de restricción, un origen de replicación para su propagación en bacterias y un marcador de selección.

El término “*vector de expresión*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier vector adecuado para expresar la(s) proteína(s) codificada(s) por la(s) SEQ ID NO.: 1-5, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias.

La presente invención también se refiere al uso de los vectores de la presente invención para transformar, transfectar o transducir microorganismos, preferiblemente levaduras y/o bacterias, más preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, *D. hansenii*, *Schwanniomyces occidentalis* *Pichia*, *Kluyveromyces* y bacterias como *E. coli*.

La presente invención también se refiere al uso de los vectores de la presente invención para transformar, transfectar o transducir células de organismos superiores, preferiblemente células de plantas, más preferiblemente de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* o de cualquier planta de interés agrícola como la judía (*Phaseolus vulgaris*) y/o el girasol (*Helianthus annuus*).

El término “*transformación*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la introducción de material genético externo en células procariotas o eucariotas mediante plásmidos, vectores virales (en ocasiones también referido como transducción) u otras herramientas para la transferencia.

El término “*transducción*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere al proceso por el cual se introduce material genético exógeno en una célula procariota o eucariota utilizando un virus como vector.

El término “*transfección*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la introducción de material genético externo en células eucariotas u organismos mediante plásmidos, vectores virales u otras herramientas para la transferencia.

Organismos de la presente invención

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un organismo que comprende la construcción genética o el vector de la presente invención. El organismo de la presente invención puede ser un microorganismo, tal y como una bacteria o una levadura, o un organismo superior, tal y como una planta.

El término “*microorganismo*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un ser vivo o un sistema biológico que solo puede visualizarse con el microscopio. El término “*microorganismo*” también se refiere a un organismo unicelular o pluricelular que puede ser eucariota o procariota y que solo puede visualizarse con el microscopio.

En una realización preferida, el microorganismo es una levadura. El término “*levadura*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a un organismo eucariota, clasificado como hongo ya sean ascomicetos o basidiomicetos microscópicos, con forma unicelular predominante en su ciclo de vida, generalmente caracterizado por dividirse asexualmente por gemación o fisión binaria y tiene estados sexuales que no están adjuntos a un esporocarpio.

Preferiblemente, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *D. hansenii* y/o *Schwanniomyces occidentalis*.

En otra realización preferida, el microorganismo es una bacteria, preferiblemente *E. coli*.

5

En otra realización preferida, el organismo es una planta. Preferiblemente, la planta es *Arabidopsis thaliana* y/o plantas de interés agrícola como la judía (*Phaseolus vulgaris*) o el girasol (*Helianthus annuus*).

10 Usos de la presente invención

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona el uso de la construcción genética de la presente invención y/o del vector de la presente invención para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo.

15 El término “*estrés abiótico*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere al impacto negativo causado por factores inertes a un organismo. Por ejemplo, pero sin limitarse, la temperatura, la salinidad, agente oxidante, agente tóxico, efectos mecánicos, el pH, la osmolaridad y la radiación son factores inertes que pueden causar un impacto negativo a un organismo, como por ejemplo un microorganismo tal y como levaduras o bacterias, o una planta.

20

En una realización preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejora la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta, al estrés inducido por una temperatura elevada, una temperatura baja y/o una temperatura variable. El término “*temperatura elevada*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una temperatura que está por encima de la temperatura óptima de un organismo. El término “*temperatura baja*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una temperatura que está por debajo de la temperatura óptima de un organismo. El término “*temperatura variable*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una temperatura que fluctúa por encima y/o por debajo de la temperatura óptima de dicho organismo. El término “*temperatura óptima*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la temperatura donde se maximiza el crecimiento y la replicación de un organismo.

30

El término “*salinidad*”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la concentración de sal en el ambiente en donde se encuentra el organismo, tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta. En una realización preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejora la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo,

35

levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por una alta concentración de sal, una concentración baja de sal y/o una concentración de sal que fluctúa por encima y/o por debajo de la concentración óptima de sal. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de sodio (como, por ejemplo, cloruro de sodio, NaCl, o fosfatos de sodio) de al menos entre 0.2 M a 2.4 M, tal y como 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de litio (como por ejemplo, cloruro de litio, LiCl, o fosfatos de litio) de al menos entre 0.05 y 0.8 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M o 0.8 M. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de potasio (como, por ejemplo, cloruro de potasio, KCl, o fosfatos de potasio) de al menos entre 0.2 M a 2.4 M, tal y como 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de cesio (como, por ejemplo, cloruro de cesio, CsCl, o fosfatos de cesio) de al menos entre 0.05 M a 2.0 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M o 2.0 M.

El término “*alta salinidad*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una concentración de sal que está por encima de la concentración óptima de sal de un organismo. El término “*baja salinidad*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una concentración de sal que está por debajo de la concentración óptima de sal de un organismo. El término “*concentración óptima de sal*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una concentración donde se maximiza el crecimiento y la replicación de un organismo.

El término “*estrés oxidativo*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al impacto negativo causado por un agente oxidante a un organismo, tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta. El término “*agente oxidante*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a compuestos o moléculas que oxidan otras sustancias en reacciones electroquímicas o de reducción-oxidación, por ejemplo, pero sin limitarse, hipoclorito y otros hipohalitos, yodo y otros halógenos, clorito/clorato/perclorato y otros compuestos halógenos análogos, sales de permanganato, compuestos relacionados con el cerio, compuestos cromados hexavalentes, peróxidos (peróxido de hidrógeno), reactivo de Tollens, sulfóxidos, ácido persulfúrico, ozono, tetróxido de osmio, dióxido de plomo, oxígeno, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido peroxidosulfúrico, perborato de sodio, óxido de nitrógeno y nitrato de potasio son agentes oxidantes. En una realización preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés

inducido por un agente oxidante. En otra realización preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por el peróxido de hidrógeno.

- 5 El término “*agente tóxico*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a compuestos o moléculas que tienen una capacidad de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. En una realización preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por un agente tóxico. En otra realización
- 10 preferida, la construcción genética y/o el vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por el sodio. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un microorganismo a una concentración de sodio de al menos 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M. En otra realización preferida, la
- 15 construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de litio de al menos entre 0.05 y 0.8 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M o 0.8 M. En otra realización preferida, la construcción genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de potasio de al menos entre 0.2 M a 2.4 M, tal y como 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M. En otra realización preferida, la construcción
- 20 genética mejora la tolerancia en un organismo a una concentración de cesio de al menos entre 0.05 M a 2.0 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M o 2.0 M.

- El término “*efecto mecánico*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al daño
- 25 causado a organismos tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta por factores físicos como vibraciones, colisiones y la extensión, contracción y/o ruptura de la pared celular y/o la membrana celular. En una realización preferida, la construcción genética y/o vector de la presente invención mejoran la tolerancia de un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por un efecto mecánico.

- 30 En otra realización preferida, la construcción genética y/o vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por un pH elevado, un pH bajo y/o un pH variable. El término “*pH elevado*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un pH que está por encima del pH óptimo
- 35 de un organismo. El término “*pH bajo*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un pH que está por debajo del pH óptimo de un organismo. El término “*pH variable*”, tal y como se

utiliza en la presente descripción, se refiere a un pH que fluctúa por encima y/o por debajo del pH óptimo. El término “*pH óptimo*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al pH donde se maximiza el crecimiento y la replicación de un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta.

5

En otra realización preferida, la construcción genética y/o vector de la presente invención mejoran la tolerancia en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por una osmolaridad elevada, una osmolaridad baja y/o una osmolaridad variable. El término “*osmolaridad elevada*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una osmolaridad que está por encima de la osmolaridad óptima de un organismo. El término “*osmolaridad baja*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una osmolaridad que está por debajo de la osmolaridad óptima de un organismo. El término “*osmolaridad variable*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una osmolaridad que fluctúa por encima y/o por debajo de la osmolaridad óptima. El término “*osmolaridad óptima*”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la osmolaridad donde se maximiza el crecimiento y la replicación de un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta.

10

15

20

En otra realización preferida, la construcción genética y/o vector de la presente invención mejoran la tolerancia de un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta al estrés inducido por la radiación.

25

En una realización preferida, la construcción genética y/o vector de la presente invención confieren un incremento en la tolerancia a la sal, preferiblemente al sodio, al litio, al cesio y/o al potasio, en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta. En una realización preferida alternativa, la construcción genética y/o el vector de la presente invención confieren un incremento en la resistencia al estrés oxidativo en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta.

Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos

30

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta, que comprende expresar el (los) producto(s) de la SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID NO.: 1, tal y como un 75%, 80%, 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 95%, 97%, o 99% de identidad con la SEQ ID NO.: 1 en un microorganismo por encima de los niveles de expresión endógenos de dicho(s) producto(s).

35

En otra realización preferida, pero sin limitarse, el método comprende expresar el(los) producto(s) de la(s) secuencia(s) representadas en SEQ ID NO.: 1-5, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta, por encima de los niveles de expresión endógenos de dicho(s) producto(s).

En una realización preferida, el método se caracteriza por que la sobreexpresión del(los) producto(s) de la(s) secuencia(s) representadas en SEQ ID NO.: 1-5, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta, por encima de niveles de expresión endógena de dicho producto.

El término “*por encima de niveles de expresión endógena*”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a la expresión del(los) producto(s) de la(s) secuencia(s) representadas en SEQ ID NO.: 1-5, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias a un(os) nivel(es) más alto(s) que los niveles que se encuentra(n) normalmente en el organismo hospedador.

En una realización preferida, el método también comprende, pero sin limitarse, una etapa donde se selecciona una cepa de organismo resistente al estrés abiótico tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta, mediante la exposición de múltiples células a un estrés abiótico y posteriormente escogiendo las células que crecen y se replican mejor. La etapa de selección debe cumplirse después de la etapa (a) donde se sobreexpresa el(los) producto(s) de la(s) secuencia(s) representadas en SEQ ID NO.: 1-5, sus secuencias complementarias o una variante de cualquiera de las secuencias anteriores que posee al menos un 75%, o un 80%, o un 85%, o un 89%, o un 90%, o un 91%, o un 92%, o un 95%, o un 97%, o un 99%, de identidad con dichas secuencias en un organismo tal y como un microorganismo (por ejemplo, levaduras o bacterias), o una planta por encima de niveles de expresión endógena de dicho(s) producto(s).

En una realización preferida, la temperatura usada para la selección es una temperatura entre 4 a 90 °C, preferiblemente entre 10 a 60 °C y aún más preferible entre 15 a 40 °C. En una realización preferida, el pH usado para la selección es entre 4 a 10, preferiblemente entre 5 a 9 y aún más preferible entre 6 a 8. En una realización preferida, se usa un agente oxidante para la selección. En otra realización

preferida, se usa peróxido de hidrógeno a una concentración de al menos entre 5 μ M a 50 mM, tal y como al menos 5 μ M, 50 μ M, 0.1 mM, 0.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM o 50 mM o más para la selección. En una realización preferida, se usa una concentración de sodio de entre 0.2 M a 2.4 M, tal y como al menos 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M para la selección. En otra realización preferida, se usa una concentración de litio de al menos entre 0.05 M y 0.8 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M o 0.8 M. En otra realización preferida, se usa una concentración de potasio de al menos entre 0.2 M a 2.4 M, tal y como 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.6 M, 1.8 M, 2.0 M, 2.2 M o 2.4 M. En otra realización preferida, se usa una concentración de cesio de al menos entre 0.05 M a 2.0 M, tal y como 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.8 M o 2.0 M.

Si no se menciona específicamente a lo contrario, el término “*comprende*” se utiliza, en el contexto de esta solicitud, para indicar que la lista de componentes puede incluir aspectos opcionales mencionados o no mencionados. El término “*comprende*” también puede incluir el concepto “*consiste en*”.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación del gen DEHA2B00132g (SEQ ID NO.: 1)

Los ensayos de este trabajo se han realizado mayoritariamente con la cepa silvestre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. Para los ensayos de transformación se utilizó la bacteria *Escherichia coli* DH5 α . En algunos ensayos se utilizó la cepa silvestre de *Debaryomyces hansenii* con número de depósito CBS 767, de acceso público en la colección del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Holanda.

En los primeros experimentos se hizo uso de una genoteca de *Debaryomyces hansenii* PYCC2968 contenida en el plásmido YEp352 en *E. coli* DH5 α y se transformó la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Después se ensayó la tolerancia a la salinidad en las diferentes cepas tal y como se describe en Ejemplo 3.

Tras transformar *Saccharomyces cerevisiae* con la genoteca de *Debaryomyces hansenii* se obtuvieron clones que se sometieron a un primer estudio de tolerancia a NaCl (Figura 1). En la Figura 2 se muestra el crecimiento de algunos clones ya seleccionados. Las secuencias de los dos transformantes que presentaban mayor resistencia correspondían a SEQ ID NO.: 1.

Ejemplo 2: Análisis informático

Método usado para el análisis informático.

El alineamiento parcial de las proteínas codificadas por los genes DEHA2F27434g, DEHA2D19448g, DEHA2B00132g, DEHA2E00198g y DEHA2D00682g se realizó mediante el programa CLC free Workbench.

- 5 El resultado del análisis informático concluyó sorprendentemente en que no se presentaban homologías en otros organismos, sino que esta se encontraba en cuatro genes pertenecientes al propio genoma de *D. hansenii* denominados DEHA2F27434g (cromosoma 2F, SEQ ID NO.: 2), DEHA2D19448g (cromosoma 2D, SEQ ID NO.: 3), DEHA2D00682g (cromosoma 2D, SEQ ID NO.: 4) y DEHA2E00198g (cromosoma 2E, SEQ ID NO.: 5), con un porcentaje de identidad del 92%, 91%, 91% y 89% respectivamente, con respecto al gen DEHA2B00132g (cromosoma 2B, SEQ ID NO.: 1) (Figura 3). Todas las cepas silvestres, aisladas de alimentos, de *D. hansenii* que se han estudiado, poseen estos genes.

Ejemplo 3: Clonación del gen SEQ ID NO.: 1

- 15 Para clonar el gen, se amplificó un fragmento de ADN genómico de *D. hansenii* (1196 pb), que contenía la secuencia codificante completa del gen SEQ ID NO.: 1 mediante PCR usando los cebadores Dh2B00132fw (SEQ ID NO.: 6, GAATTCACGACAGATGAGTTGTGTTTTCTG) y Dh2B00132rv (SEQ ID NO.: 7, ACCAGACCGAACCTATCATACC) y la enzima de alta afinidad BIO-X-ACTTM Short.

- 20 Tras la amplificación del gen, se realizó una ligación del producto obtenido en el plásmido de clonación comercial pSPARK® (Cavax), que posee un origen de replicación para bacterias tipo pUC, el gen de resistencia a la ampicilina (β -lactamasa) y el gen de la β -galactosidasa (LacZ). Este plásmido presenta un sitio múltiple de clonación, abierto, dentro del gen LacZ, flanqueado por la
- 25 secuencia de los cebadores comerciales T7 y SP6 para secuenciar el inserto. Con el plásmido resultante de la ligación se transformó *E. coli*.

- Las bacterias transformadas se sembraron en superficie en placas de LB con ampicilina y X-gal. Se obtuvieron colonias azules y blancas. Las bacterias portadoras del plásmido sin el inserto, presentaban
- 30 actividad β -galactosidasa dando lugar a colonias de color azul, esto se debe a que la expresión el gen LacZ, da lugar a la hidrólisis del X-gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, este último tras un proceso de oxidación da lugar a un compuesto azul. Sin embargo las bacterias que si portaron el plásmido con el inserto formaron colonias de color blanco.

- 35 Se seleccionaron 5 colonias blancas y se realizó una extracción de los plásmidos correspondientes, que se llevaron a secuenciar, usando los cebadores comerciales T7 y SP6, al servicio de secuenciación del

Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Una vez obtenidas las secuencias, se seleccionaron aquellos plásmidos que no presentaban mutaciones en la fase abierta de lectura del gen *DEHA2B00132g* (SEQ ID NO.: 1). De los 5 plásmidos analizados, 3 presentaban la secuencia correcta.

5

A continuación se realizaron digestiones con las enzimas de restricción EcoRI y SalI tanto a los plásmidos pSPARK® que tenían la secuencia correcta, para liberar el inserto, como al plásmido de expresión pWS93 para linealizarlo. Ambas digestiones se purificaron en gel de agarosa y se llevó a cabo una nueva ligación entre ambas, el inserto y el plásmido pWS93 abierto. El plásmido resultante de la ligación se denominó pSUP.

10

Con la mezcla de ligación, se transformó *E. coli*. El producto de la transformación se plaqueó en medio solido LB con ampicilina y se seleccionaron 8 transformantes con los que se realizó una PCR de colonias para seleccionar las que contenían al pSUP. Los resultados obtenidos con la PCR mostraron que 6 transformantes seleccionados portaban el plásmido con el gen clonado. A partir de uno de ellos se extrajo el plásmido pSUP.

15

Finalmente se transformó la cepa de laboratorio BY4741 de *S. cerevisiae*, por una parte con el plásmido pSUP, portador del gen de estudio, y por otra, con el plásmido pWS93 a modo de control. Esta cepa de *S. cerevisiae* se caracteriza por ser *ura3⁻* y dado que el plásmido de expresión utilizado es *URA3*, nos sirvió para poder discriminar los transformantes portadores de los plásmidos tanto con el inserto como sin él.

20

Ejemplo 4: Sensibilidad a sal y peróxido de hidrógeno

El efecto de la salinidad se realizó de la siguiente manera:

25

Las cepas se preinocularon en 20 ml de YNB (ura-) y se dejaron crecer durante 24 h a 28 °C y 200 rpm. Posteriormente se ajustó la concentración de células a una D.O.600nm = 1, a partir de esta se realizaron diluciones seriales en agua estéril (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000). La inoculación en las placas se hizo mediante gotas, realizadas tomando 4µl de las distintas suspensiones celulares siguiendo un orden de mayor a menor concentración.

30

La sensibilidad a sal se estudió suplementando las placas (o medio líquido) con NaCl a las concentraciones adecuadas.

En la Figura 4 se observa que la cepa que expresa SEQ ID NO.: 1 (clon pSUP) muestra mayor tolerancia a NaCl comparada con la cepa control (clon pWS93) y resultados similares se obtuvieron en medio líquido (Figura 5).

- 5 El efecto del estrés oxidativo se realizó de la siguiente manera:
Se realizó un inóculo en 25 ml de YPD líquido para las cepas pWS93 (control) y pSUP1 (clon portador del gen DEHA2B00132, (SEQ ID NO.: 1). Este inóculo fue incubado a 28°C hasta obtenerse una absorbancia a 600 nm de 0.5 (D.O.600 nm = 0.5). Alcanzada la concentración celular requerida, se trasvasó 1 mL de cultivo a un eppendorff, el cual se centrifugó durante 2 minutos a 5000 rpm. El
10 sobrenadante fue desechado y el pellet celular resultante resuspendido en 1 mL de tampón PBS. Por último, se añadió a cada uno de los eppendorff el volumen de H₂O₂ requerido para alcanzar las concentraciones de estudio (5 mM; 10 mM; 15 mM). Un preparado de cada cepa quedó libre de peróxido para ser utilizado a modo de control.
- 15 El efecto del sometimiento de las levaduras a este tipo de estrés oxidativo se analizó mediante la realización de un test de goteo. Para ello se inocularon 5µL de preparado en placas de YPD a diferentes tiempos (minuto 0, minuto 5, minuto 10, minuto 20, minuto 30 y minuto 40), a contar desde la adición del H₂O₂. Estas placas fueron incubadas en la estufa a 28 °C durante 24-72 horas.
- 20 En la Figura 6 se observa que la cepa que expresa el gen DEHA2B00132 (SEQ ID NO.: 1) (clon pSUP) muestra mayor tolerancia a un tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) comparada con la cepa control (clon pWS93).

Ejemplo 5: Verificación de la implicación del gen DEHA00132g (SEQ ID NO.:1) en la tolerancia al estrés salino

- 25 Al crecer el clon con el gen de interés en medio sin presión selectiva (con Ura) durante varias generaciones pierden el plásmido y, por tanto deberían perder el carácter adquirido. Aquellas colonias que presentaban crecimiento en YPD pero no en el medio sin Ura y que, por tanto, habían expulsado el plásmido, fueron seleccionadas para la verificación de la implicación del mismo en la tolerancia a sal.
30 La verificación de la implicación del gen DEHA00132g (SEQ ID NO.: 1) en la tolerancia a estrés salino se llevó a cabo mediante un test de goteo a diversas concentraciones de NaCl en placas de YPD, donde se comparó el crecimiento de las colonias obtenidas con el de las cepas transformadas.
- 35 La pérdida del plásmido (con el gen de interés) llevó implícita la pérdida del carácter de tolerancia a sal (Figura 7).

Ejemplo 6: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR)

Las células se trataron durante 30 minutos con NaCl (0.5 M) o con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (50 µM). Se extrajo ARN celular, que se trató con ADNasa, se cuantificó, se retrotranscribió y las PCR se realizaron usando el termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad. Los cebadores utilizados se pueden encontrar en la Tabla 1

Tabla 1

<i>Oligos</i>	<i>Secuencias</i>
132	F: TTGCGAGAGGGCATATTGAAGGTTCCCGTT R: CATCACCGCCCGCTTCACCACTTCGTC
198	F: ACAAGTTCCTCCGCACAATCAACGCCAACC R: TGCGTGCCTTTCAAATGTGGCCTGTCCTGG
19448	F: ATGACAACCATCGAAGGCCCGCTTACCCA R: ATGCGTGCCCTTCAAATGTGGTATGTCCTGG
27434	F: GGTGAAGCGGGCGGTGATGGAGACGA R: GACTGCGCAAACCGGTCATCAGGAAGCAT
682	F: CCAGGACAGACCACATTTGAAGGGCACGCAT R: AGCGGCCGGCGTAGTTTGCATATATCACCT

- 10 Los resultados del primer experimento se pueden ver en la Figura 8, donde se observa que sólo dos de los genes se ven afectados cuantitativamente cuando se someten al tratamiento con NaCl (0.5 M), observándose una represión muy significativa en el caso del gen 132 (2.5 veces) y una inducción significativa en el caso del gen 19448 (1.9 veces) al sufrir el tratamiento. El tratamiento usando KCl en lugar de NaCl no produjo respuestas significativas en la expresión de los genes, lo que indica que
- 15 no tratamos de un tema exclusivamente osmótico sino de respuestas a toxicidad por sal (resultados no mostrados). La Figura 9 muestra que existe una diferencia muy significativa para el gen 27434, y una diferencia significativa para el gen 19448 tras un tratamiento inductor de estrés oxidativo.

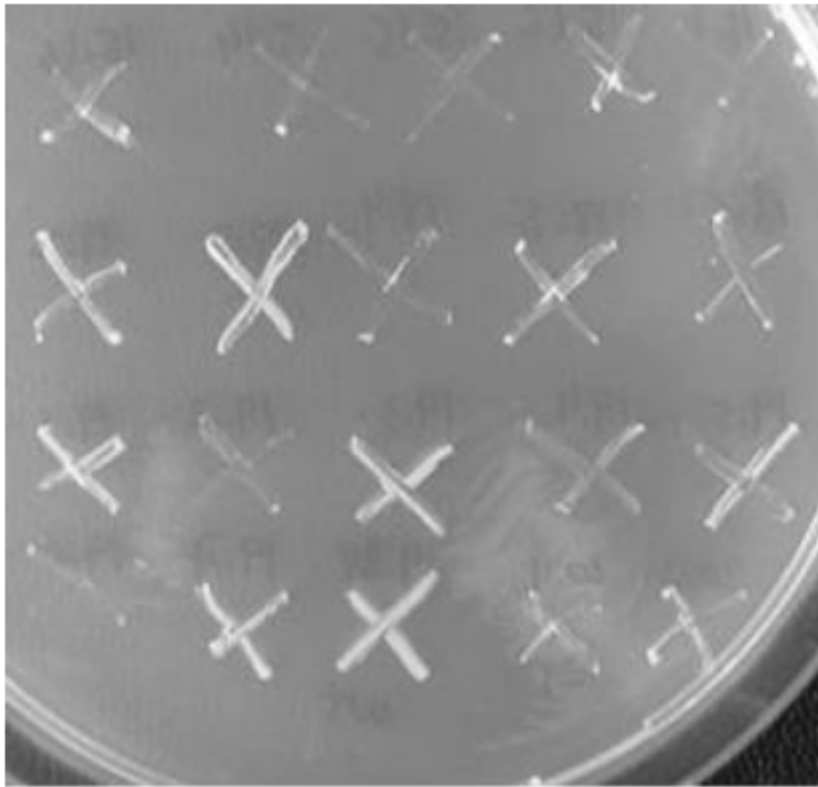
5

Reivindicaciones

1. Construcción genética que comprende la secuencia SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia SEQ ID NO.: 1.
- 10 2. La construcción genética de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada por que comprende la secuencia SEQ ID NO.: 2.
3. La construcción genética de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada por que comprende la secuencia SEQ ID NO.: 3.
- 15 4. La construcción genética de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada por que comprende la secuencia SEQ ID NO.: 4.
5. La construcción genética de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizada por que
20 comprende la secuencia SEQ ID NO.: 5.
6. Vector que comprende la construcción genética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 7. El vector de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el vector es un vector de expresión.
8. Organismo que comprende la construcción genética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el vector de acuerdo con cualquiera de las
30 reivindicaciones 6 a 7, caracterizado por que el organismo se selecciona del grupo que consiste en una levadura, una bacteria y una planta.
9. El organismo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el organismo es *S. cerevisiae*.
- 35 10. El organismo de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el organismo es *E. coli*.

- 5 11. Uso de la construcción genética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o del vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo.
- 10 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que el organismo es el organismo tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que el estrés abiótico es estrés oxidativo.
- 15 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que el estrés abiótico es la toxicidad producida por sodio, litio, potasio y/o cesio, preferiblemente en forma de cloruros o en forma de fosfatos.
- 20 15. Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo que comprende la etapa de:
- a. Expresar el producto de la secuencia SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO.: 1 en un organismo por encima de niveles de expresión endógena de dicho producto.
- 25 16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que la expresión del producto de la secuencia SEQ ID NO.: 1 o una secuencia que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO.: 1 en un organismo por encima de niveles de expresión endógena de dicho producto se consigue mediante la incorporación de una construcción genética tal y como se define en cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 1 a 5, o de un vector tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.
- 35 17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, caracterizado por que el organismo es el organismo tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

Figura 1



1.8M NaCl

Figura 2

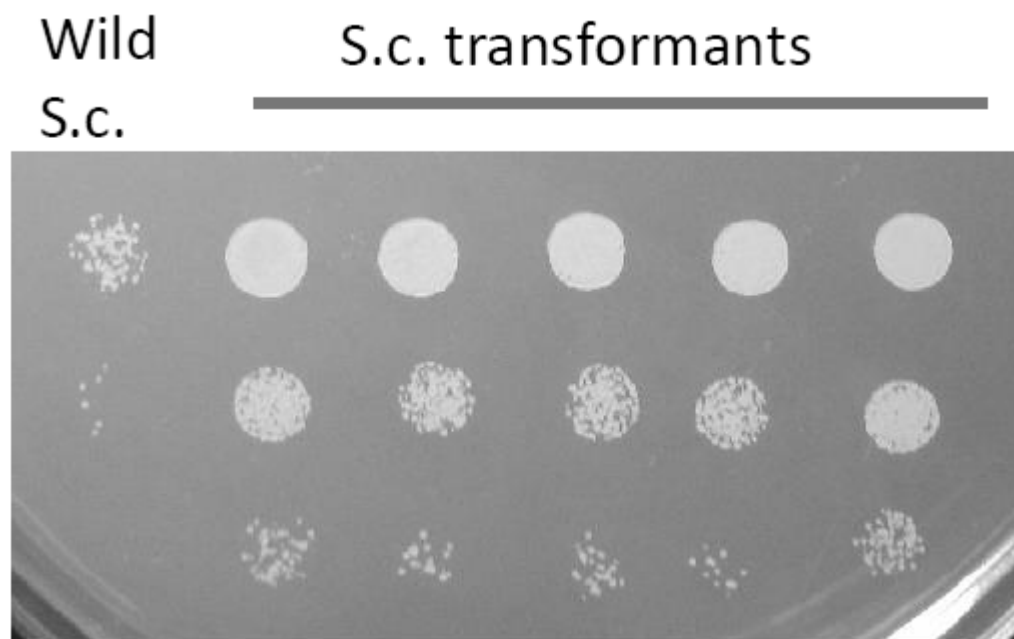


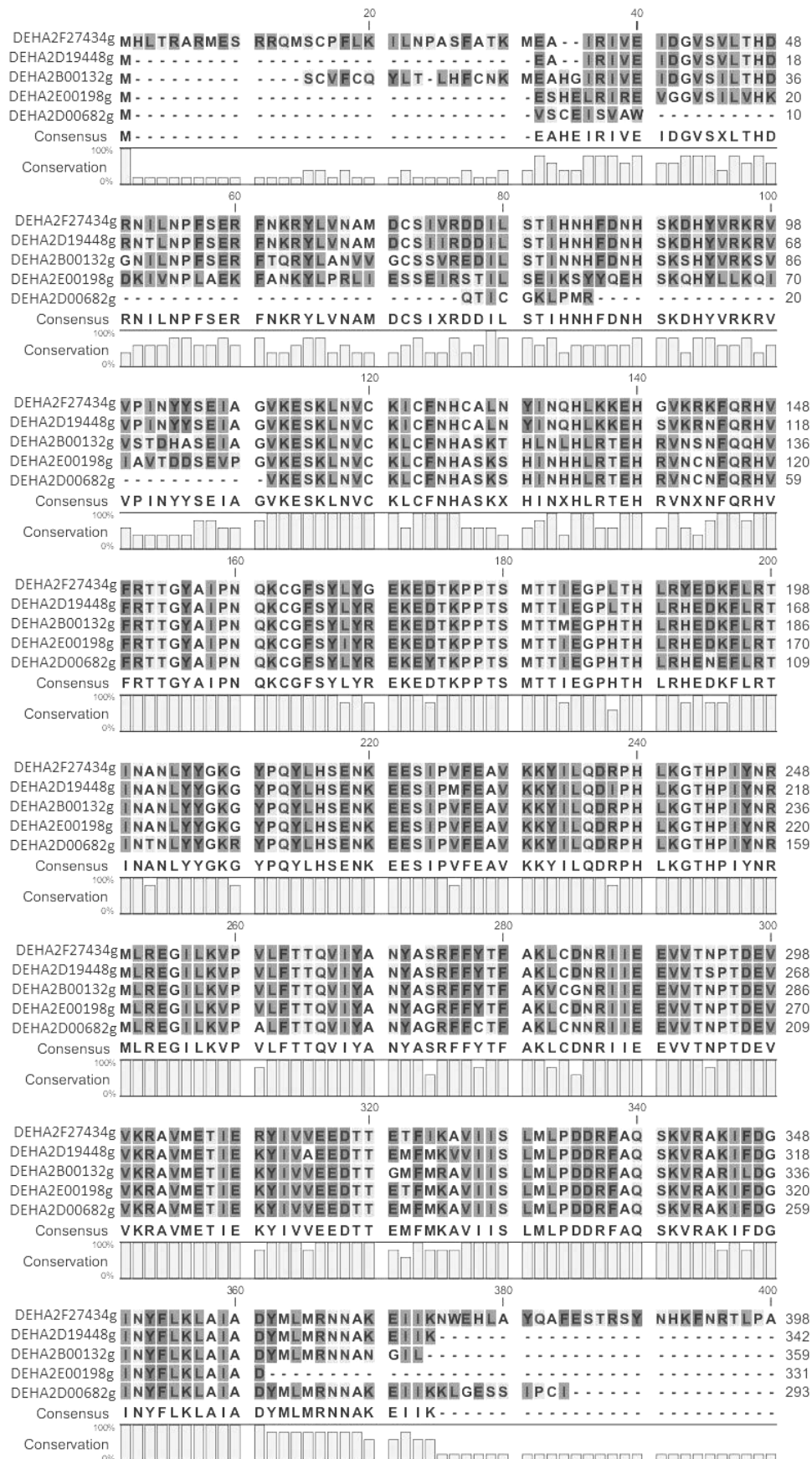
Figura 3

Figura 4

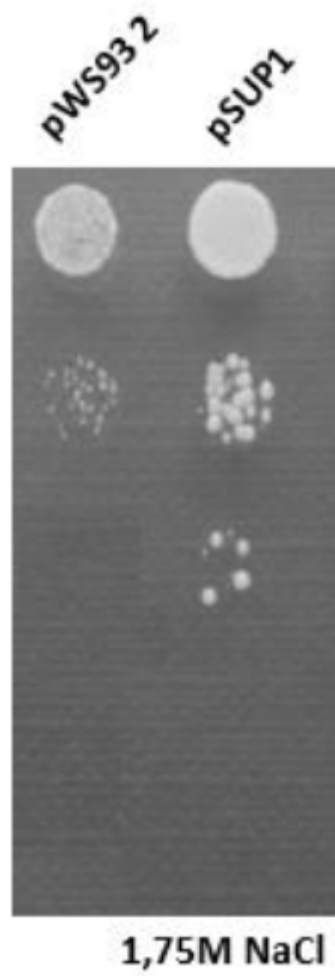


Figura 5

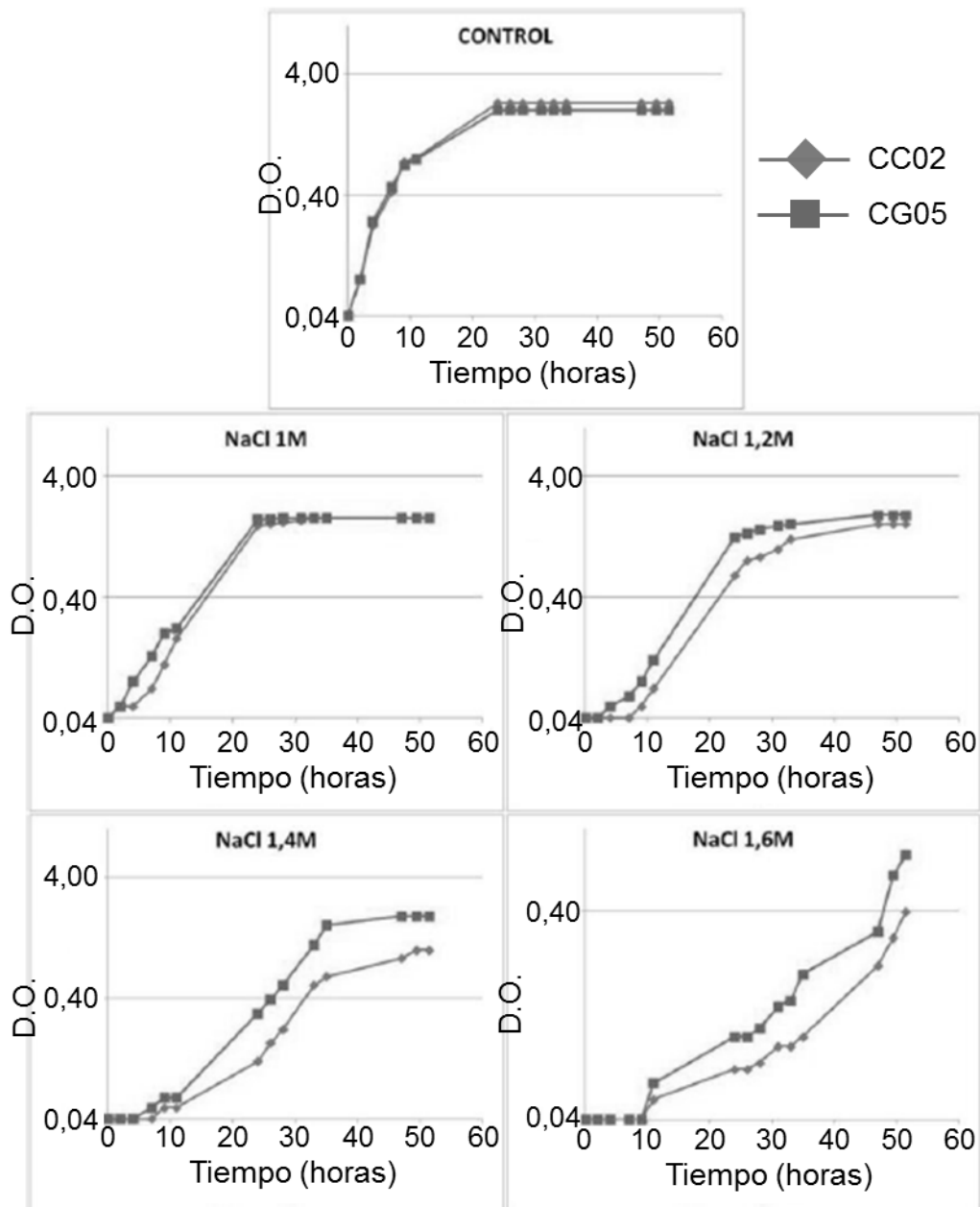


Figura 6

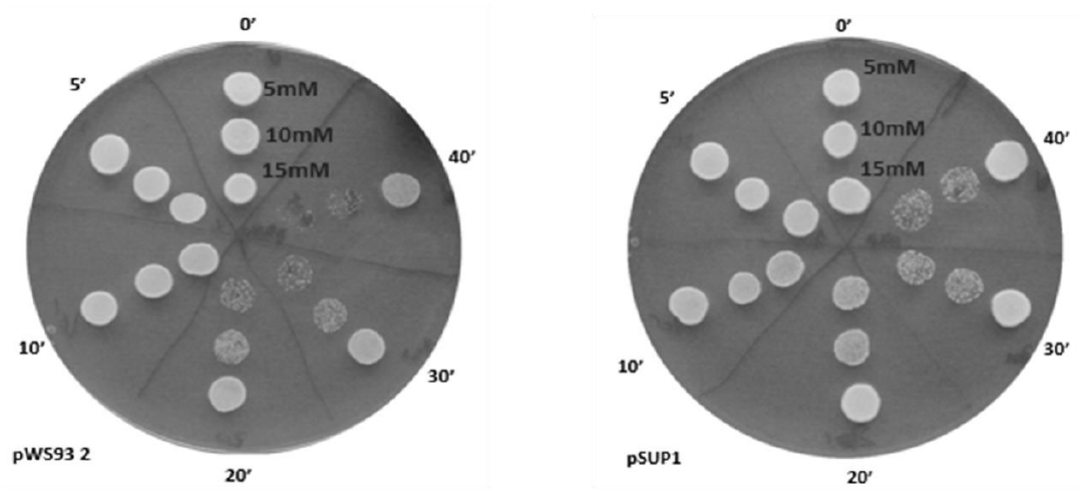
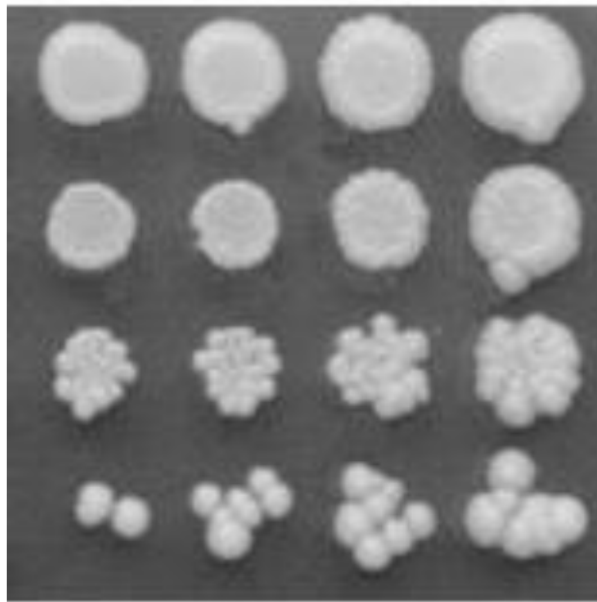
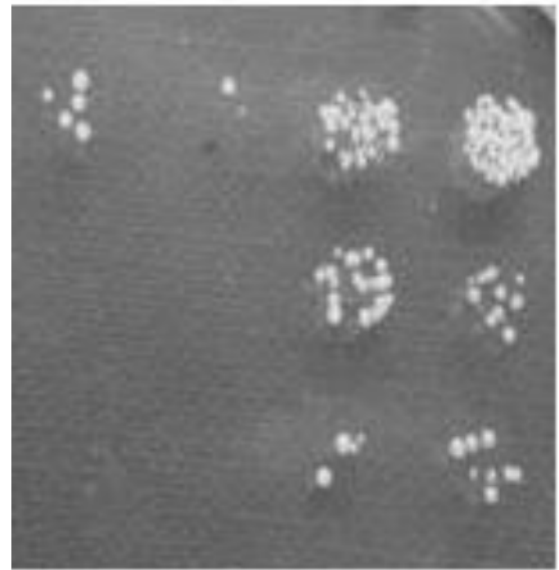


Figura 7



Control sin NaCl



1,75M NaCl

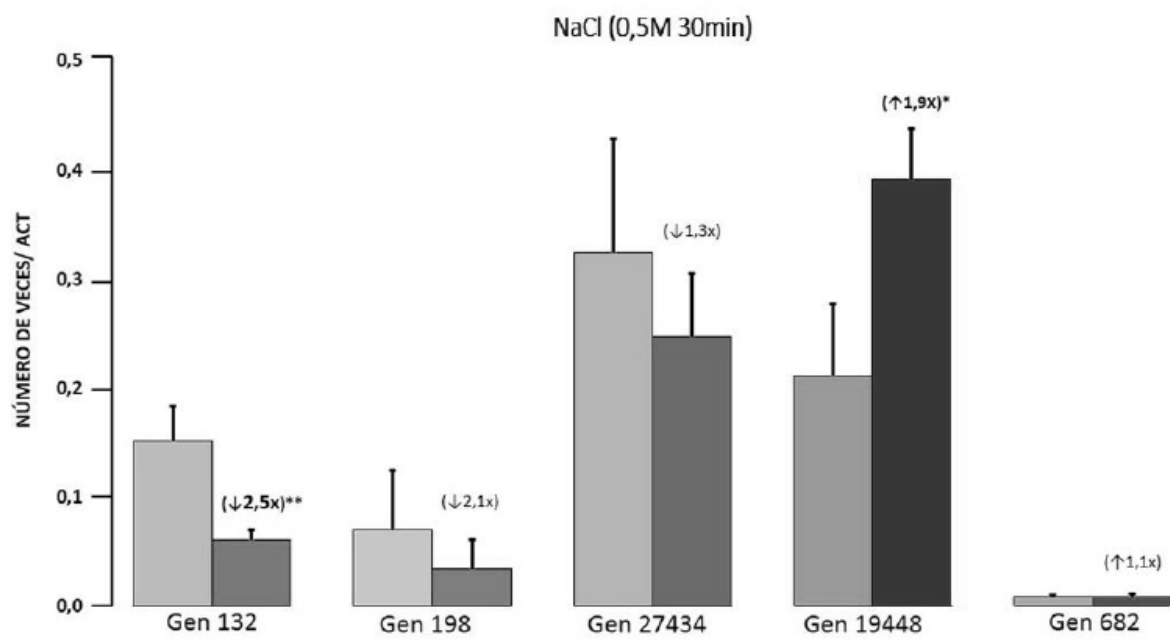
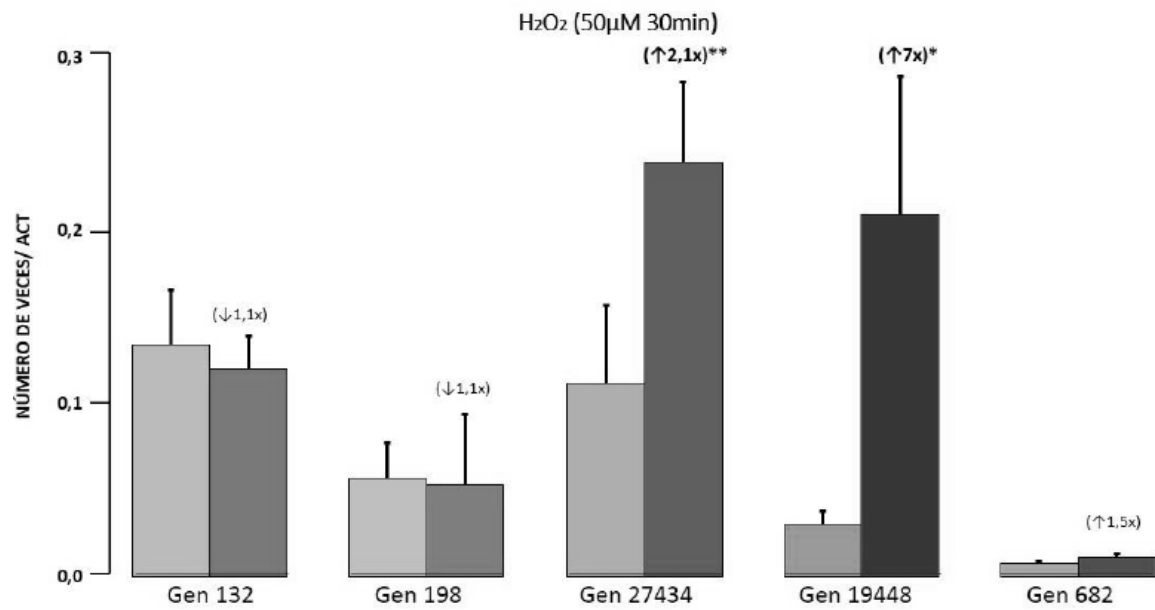
Figura 8

Figura 9



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Córdoba

<120> Método para mejorar la tolerancia a estreses abióticos en un organismo

<130> 901 550

<160> 22

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DEHA2B00132g

<400> 1

atgagttgtg ttttctgtca atatttaacc ctgcattttt gcaacaaaat ggaagcacac	60
ggcatacgta ttgttgagat tgatggagtt tctatttttaa cacacgacgg aaatattctt	120
aatccgtttt ccgagagatt tacgcagaga tatttagcga atgttgtagg ttgttccagc	180
gtccgtgaag atattctatc aacaattaat aaccactttg ataaccactc aaaaagccat	240
tatgtgcgca aaagtgttgt atctaccgat cacgcatcgg aaatagcagg agtcaaagaa	300
tctaagctaa atgtttgcaa gctttgcttc aatcatgcct cgaagactca ccttaatctt	360
catcttagaa cagaacacag ggtcaatagt aatttccaac agcacgtctt cagaacaacc	420
gggtatgcaa ttcccaacca aaagtgcggc ttttcctatt tataccgcga aaaagaagac	480
accaagccac ccacttcaat gacaaccatg gaaggccgcg atacacatct ccggcagcag	540
gacaagttcc tccgcacaat caacgccaac ctatattatg gaaagggata cccgcagtac	600
ttacacagcg aaaacaagga agaaagtata ccggtgtttg aggccgtcaa gaagtatatt	660
ctccaggaca ggccacattt gaagggcacg catcccattht acaatcggat gttgagagag	720
ggcatattga aggttcccggt tctcttttacg acccaggtga tctatgcaaa ctatgccagc	780
cgtttttttct acacgtttgc caaggtatgc ggtaaccgaa tcatcgagga agtggtgacc	840
aatcccaccg acgaagtgggt gaagcgggag gtgatggaga cgatcgagaa gtatattgtg	900
gtggaagaag acacgactgg aatgtttatg agagccgtga ttatctcggt gatgcttccc	960
gatgacaggt ttgagcagtc gaaggtgcga gccagaatcc tcgatggcat caactatttc	1020
ttgaagttgg ctatagcaga ctatatgttg atgagaaaca acgccaatgg gattctttga	1080

<210> 2

<211> 2244

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DEHA2F27434g

ES 2 673 521 A1

<400> 2
atgcatttaa cgcgtgcacg aatggaatct cgacgacaga tgagctgtcc ttttttgaaa 60
atattgaacc ctgcatcttt tgcaacaaaa atggaagcaa tacgcattgt tgagattgat 120
ggggtttctg ttttaacaca tgacagaaac attcttaacc ctttttccga gagatttaac 180
aagagatatt tagtgaatgc catggattgt tccattgtcc gtgatgacat tctatcaaca 240
attcataacc acttcgataa ccaactcaaaa gaccattatg tgcgaaaaag ggttgttccc 300
atcaattact actctgaaat agcgggagtc aaggaatcta aactcaatgt ttgcaagatt 360
tgttttaacc attgcgcgct gaactacatt aatcaacatc tcaagaaaga gcatggcggt 420
aagagaaaaat tccaacggca cgtcttcaga acaaccgggt atgcaattcc caacccaaaag 480
tgcggctttt cctatttata cggcgaaaaa gaagacacca aaccgcccac ttcaatgaca 540
accatcgaag gcccgcttac ccatctccgg tacgaggaca agttcctccg cacaatcaac 600
gccaacctat attacgaaa gggatacccg cagtacttac acagcgaaaa caaggaagaa 660
agtataccgg tgtttgaggc cgtcaagaag tatattctcc aggacaggcc acatttgaag 720
ggcacgcatc ccatttaca tcggatgttg cgagaaggca tattgaaggt tcccgttctc 780
tttacgaccc aggttatcta tgcaactat gccagccgct ttttctacac gtttgccaag 840
ttatgcgata accgaatcat cgaggaagtg gtgaccaatc ccaccgacga agtggtgaag 900
cgggcggtga tggagacgat cgaaaggtat attgtggtgg aagaagacac gactgaaacg 960
tttatcaaag ccgtgattat ctcgttgatg cttcctgatg accggtttgc gcagtcaaag 1020
gtgcgagcca aaatctttga cgggatcaac tatttcttga agttggccat agcagactat 1080
atgttgatga gaaacaacgc caaggagatt atcaaaaact gggaaacatct agcataccag 1140
gcatttgagt ccacacggtc atacaaccat aaattcaata ggacgttgcc ggctttccag 1200
acgatagtcg accagcagga taaccgaaag gtgatgatcg ggtcggtcag attcagtacg 1260
ccggacctcg gcaagtgggt tagatgcttg gtccgggagt accataccac ggttcgaaac 1320
ttgctaccgg acgggatgtt gatggtggac gagctatacg aggagtttcg aaagcacgcc 1380
aaagatatgt tcagctgcac ggatttagga tatagtgttt tctacggaac agacgaactc 1440
aacaagcttt cttatcagca gcgacgcacg tacgaggaag ccgtcggcga taaatggaag 1500
aatcaaaagt atatgagaag catgtttgac cagtttacca ggctcaactt gaatatcttt 1560
gtatgcatct tgatcacctg tggcagtcca tttcgggtga cggagttgct cacgttgacg 1620
tttgccaacc cgacagattt ggtgcgcacg atgtattatt ccaacgagca tattcagatt 1680
aaccttctct ataataagaa tacgcatagc agcatgcat attcgaacca taccaagatg 1740
ttgcccattg aggtttccaa aatagtcatc cattacgtgt caattatcaa atatttgag 1800
gttgcaatcg tggaagagca cgggtgggccc aagtccaaaa gcgatatgag cgtggcagac 1860
gattgggaag acgacgaaga gtttgacgag ctggacggaa atgatctgga agatggggct 1920
agcttgtag cgtccaaggc gctttccaag agagatgaaa taaagacgct cttgttcag 1980
tataagctcg gcccgagaaa tgggggcccag gtgttcaagt atttggagct ggtgagtga 2040

ES 2 673 521 A1

aagtatatca gggagaagta tacgcccagg attttacggc aggcattagt ctattttacg	2100
cggacgctct tggaagaagc aaagtatcaa ggagtgggga ttctcaatcg aattgattcc	2160
attgcaggtc ataggtcaga gaccgccgat ttgcagtacg gagttacgca tagcaatatg	2220
tatgcaaacc tatatgatgg ataa	2244

<210> 3
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2D19448g

<400> 3 atggaagcaa tacgcattgt tgagattgat ggggtttctg ttttaacaca tgacagaaac	60
actcttaacc ctttttccga gagatttaac aagagatatt tagtgaatgc catggattgt	120
tccattatcc gtgatgacat tctatcaaca attcataacc acttcgataa ccaactcaaaa	180
gaccattatg tgcgaaaaag ggttgttccc atcaattact actctgaaat agcgggagtc	240
aaggaatcta aactcaatgt ttgcaagatt tgttttaacc attgcgcgct gaactacatt	300
aatcaacatc tcaagaaaga gcatagcgtt aagagaaatt tccaacggca cgtcttcaga	360
acaaccgggt atgcaattcc caaccaaag tgcggctttt cctattttata ccgcgaaaaa	420
gaagacacca aaccgccac ttcaatgaca accatcgaag gcccgcttac ccatctccgg	480
cacgaggaca agttcctccg cacaatcaac gccaacctat attacggaaa gggatacccg	540
cagtacctac acagcgaaaa caaggaagaa agcataccga tgtttgaggc cgtcaagaag	600
tatattctcc aggacatacc acatttgaag ggcacgcac ccattttaca tcggatgttg	660
cgagagggca tattgaaggt tcccgttctc ttacgaccc aggtgatcta tgcaaactat	720
gccagccgtt ttttctacac gtttgccaag ttatgcgata accgaatcat cgaggaagtg	780
gtgaccagtc ccaccgacga agtggtgaag cgagcgggta tggagacgat cgagaagtat	840
attgtggcgg aagaagacac gactgaaatg tttatgaaag tcgtgattat ctcgttgatg	900
cttcccgatg accggtttgc gcagtcgaag gtgcgagcca aaatctttga cggcatcaac	960
tatttcttga agttggctat agcagactat atgttgatga gaaacaacgc caaggagatt	1020
atcaaaaaac tgggagaatc tagcatacca ggcatttga	1059

<210> 4
 <211> 882
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2D00682g

<400> 4 atggtaagct gcgagataag tgtcgcattg caaactatgt gcggcaaatt gccaatgcga	60
--	----

ES 2 673 521 A1

gtcaaagaat ctaagctaaa tgtttgcaag ctttgcttca atcatgcctc aaagtcacac	120
attaatcatc atcttagaac agaacacagg gtcaattgta acttccaacg gcacgtcttc	180
agaacaaccg gatatgcaat tcccaaccaa aagtgcggct tttcctatctt ataccgcgaa	240
aaagaatata ccaaaccgcc cacttcaatg acaaccatcg aaggcccgca taccatctt	300
cgacacgaga acgagttcct ccgcacaatc aacaccaacc tatattacgg aaagagatac	360
ccgcagtacc tacacagcga aaacaaggaa gaaagcatac cagtgtttga ggccgtcaag	420
aagtatatct tccaggacag accacatttg aagggcacgc atcccattta caaccggatg	480
ttgcgagagg gaatattgaa ggtgccggct ctctttacga ccaggtgat atatgcaaac	540
tacgccggcc gctttttctg tacgtttgcc aagttatgca ataaccgaat catcgaggaa	600
gtggtgacca atcccaccga cgaagtgtg aagcgagcgg tgatggagac gatcgagaag	660
tatattgtgg tggaagaaga cagactgaa atgtttatga aagccgtgat tatctcgttg	720
atgcttcccg atgaccggtt tgcgagtcg aaggtgcgag ccaaactctt tgacggcatc	780
aactatttct tgaagttggc tatagcagac tatatgttga tgagaaacaa cgccaaggag	840
attatcaaaa aactgggaga atctagcata ccatgcattt ga	882

<210> 5
 <211> 996
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2E00198g

<400> 5	
atggagtcgc acgaattacg tattagagaa gtcgggggag tgtctatctt agtgcacaag	60
gacaaaatag taaatccttt ggctgagaaa tttgcaaata aatatctacc acgtcttatt	120
gaaagtagtg aaatccgcag tactatattg tcggaatta aaagttacta ccaggaacat	180
tccaaacagc attatttatt gaagcagata attgctgtta cagatgactc cgaggtagca	240
ggagtcaaag aatctaagct aaatgtttgc aagctttgct tcaatcatgc ctcaaagtca	300
cacattaatc atcatcttag aacagaacac agagtcaatt gcaacttcca acggcacgtc	360
ttcagaacaa ccgggtatgc aattcccaac caaaagtgcg gcttttccta tatataccgc	420
gaaaaagaag acaccaaacc gccacttca atgacaacca tcgaaggccc gcatacccat	480
ctccggcacg aggacaagtt cctccgcaca atcaacgcca acctatatta cggaaagggg	540
taccgcagtg atctacacag cgaaaacaag gaagagagca taccggtgtt tgaggccgtc	600
aagaagtata ttctccagga caggccacat ttgaaaggca cgcattccat ttacaaccgg	660
atgttgcgag agggaaatatt gaaggtgccg gttctcttta cgacgcaggt gatatatgca	720
aattacgccg gccgcttttt ctacacgttt gccaaagttat gcgataaccg aatcatcgag	780
gaggtggtga ccaatccac cgacgaagtg gtgaagcgag cgggtgatgga gacgatcgag	840

ES 2 673 521 A1

aagtatatattg tgggtggaaga agacacgact gaaacgttta tgaaagccgt gattatctcg 900
 ttgatgcttc ccgatgaccg gtttgcgcag tcgaagggtgc gagccaaaat ctttgacggc 960
 atcaactatt tcttgaagtt ggccatagca gactaa 996

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador Dh2B00132fw

<400> 6
 gaattcacga cagatgagtt gtgttttctg 30

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador Dh2B00132rv

<400> 7
 accagaccga acctatcata cc 22

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador 132F

<400> 8
 ttgcgagagg gcatattgaa gggtcccgtt 30

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador 132R

<400> 9
 catcaccgcc cgcttcacca cttcgtc 27

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador 198F

<400> 10 acaagttcct ccgcacaatc aacgccaacc	30
<210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador 198R	
<400> 11 tgcgtagcctt tcaaattgtgg cctgtcctgg	30
<210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador 19448F	
<400> 12 atgacaacca tcgaaggccc gcttaccca	29
<210> 13 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador 19448R	
<400> 13 atgctgtgccc ttcaaattgtg gtatgtcctg g	31
<210> 14 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador 27434F	
<400> 14 ggtgaagcgg gcggtgatgg agacga	26
<210> 15 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Cebador 27434R	
<400> 15 gactgcgcaa accggtcatc aggaagcat	29

<210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador 682F

<400> 16
 ccaggacaga ccacatttga agggcacgca t

31

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador 682R

<400> 17
 agcggccggc gtagtttgca tatatcacct

30

<210> 18
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2B00132

<400> 18
 Met Ser Cys Val Phe Cys Gln Tyr Leu Thr Leu His Phe Cys Asn Lys
 1 5 10 15
 Met Glu Ala His Gly Ile Arg Ile Val Glu Ile Asp Gly Val Ser Ile
 20 25 30
 Leu Thr His Asp Gly Asn Ile Leu Asn Pro Phe Ser Glu Arg Phe Thr
 35 40 45
 Gln Arg Tyr Leu Ala Asn Val Val Gly Cys Ser Ser Val Arg Glu Asp
 50 55 60
 Ile Leu Ser Thr Ile Asn Asn His Phe Asp Asn His Ser Lys Ser His
 65 70 75 80
 Tyr Val Arg Lys Ser Val Val Ser Thr Asp His Ala Ser Glu Ile Ala
 85 90 95
 Gly Val Lys Glu Ser Lys Leu Asn Val Cys Lys Leu Cys Phe Asn His
 100 105 110
 Ala Ser Lys Thr His Leu Asn Leu His Leu Arg Thr Glu His Arg Val
 115 120 125
 Asn Ser Asn Phe Gln Gln His Val Phe Arg Thr Thr Gly Tyr Ala Ile
 130 135 140
 Pro Asn Gln Lys Cys Gly Phe Ser Tyr Leu Tyr Arg Glu Lys Glu Asp
 145 150 155 160
 Thr Lys Pro Pro Thr Ser Met Thr Thr Met Glu Gly Pro His Thr His
 165 170 175
 Leu Arg His Glu Asp Lys Phe Leu Arg Thr Ile Asn Ala Asn Leu Tyr
 180 185 190
 Tyr Gly Lys Gly Tyr Pro Gln Tyr Leu His Ser Glu Asn Lys Glu Glu
 195 200 205
 Ser Ile Pro Val Phe Glu Ala Val Lys Lys Tyr Ile Leu Gln Asp Arg
 210 215 220
 Pro His Leu Lys Gly Thr His Pro Ile Tyr Asn Arg Met Leu Arg Glu
 225 230 235 240
 Gly Ile Leu Lys Val Pro Val Leu Phe Thr Thr Gln Val Ile Tyr Ala

ES 2 673 521 A1

Asn	Tyr	Ala	Ser	245	Arg	Phe	Phe	Tyr	Thr	250	Phe	Ala	Lys	Val	Cys	255	Gly	Asn
Arg	Ile	Ile	Glu	260	Glu	Val	Val	Thr	265	Asn	Pro	Thr	Asp	Glu	270	Val	Val	Lys
Arg	Ala	Val	Met	275	Glu	Thr	Ile	280	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	285	Val	Glu	Glu	Asp
Thr	Thr	Gly	Met	290	Phe	Met	Arg	295	Ala	Val	Ile	Ile	Ser	300	Leu	Met	Leu	Pro
305	Asp	Asp	Arg	Phe	310	Ala	Gln	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	320
Ile	Asn	Tyr	Phe	325	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	330	Ala	Asp	Tyr	Met	Leu	335	Met	Arg
Asn	Asn	Ala	Asn	340	Gly	Ile	Leu		345						350			
				355														

<210> 19

<211> 747

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DEHA2F27434

<400> 19

Met	His	Leu	Thr	Arg	Ala	Arg	Met	Glu	Ser	Arg	Arg	Gln	Met	Ser	Cys
1	Pro	Phe	Leu	Lys	5	Ile	Leu	Asn	Pro	Ala	Ser	Phe	Ala	Thr	15
				20					25					Lys	30
Ala	Ile	Arg	Ile	Val	Glu	Ile	Asp	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	His	Asp
		35					40					45			
Arg	Asn	Ile	Leu	Asn	Pro	Phe	Ser	Glu	Arg	Phe	Asn	Lys	Arg	Tyr	Leu
	50					55					60				
Val	Asn	Ala	Met	Asp	Cys	Ser	Ile	Val	Arg	Asp	Asp	Ile	Leu	Ser	Thr
65					70					75					80
Ile	His	Asn	His	Phe	Asp	Asn	His	Ser	Lys	Asp	His	Tyr	Val	Arg	Lys
				85					90					95	
Arg	Val	Val	Pro	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Gly	Val	Lys	Glu
			100					105					110		
Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Cys	Lys	Ile	Cys	Phe	Asn	His	Cys	Ala	Leu	Asn
		115					120					125			
Tyr	Ile	Asn	Gln	His	Leu	Lys	Lys	Glu	His	Gly	Val	Lys	Arg	Lys	Phe
	130					135					140				
Gln	Arg	His	Val	Phe	Arg	Thr	Thr	Gly	Tyr	Ala	Ile	Pro	Asn	Gln	Lys
145					150					155					160
Cys	Gly	Phe	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Glu	Lys	Glu	Asp	Thr	Lys	Pro	Pro
				165					170					175	
Thr	Ser	Met	Thr	Ile	Glu	Gly	Pro	Leu	Thr	His	Leu	Arg	Tyr	Glu	
			180				185					190			
Asp	Lys	Phe	Leu	Arg	Thr	Ile	Asn	Ala	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly
		195					200					205			
Tyr	Pro	Gln	Tyr	Leu	His	Ser	Glu	Asn	Lys	Glu	Glu	Ser	Ile	Pro	Val
	210					215					220				
Phe	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Gln	Asp	Arg	Pro	His	Leu	Lys
225					230					235					240
Gly	Thr	His	Pro	Ile	Tyr	Asn	Arg	Met	Leu	Arg	Glu	Gly	Ile	Leu	Lys
				245					250					255	
Val	Pro	Val	Leu	Phe	Thr	Thr	Gln	Val	Ile	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ser
			260					265					270		
Arg	Phe	Phe	Tyr	Thr	Phe	Ala	Lys	Leu	Cys	Asp	Asn	Arg	Ile	Ile	Glu
		275					280					285			
Glu	Val	Val	Thr	Asn	Pro	Thr	Asp	Glu	Val	Val	Lys	Arg	Ala	Val	Met
	290					295					300				
Glu	Thr	Ile	Glu	Arg	Tyr	Ile	Val	Val	Glu	Glu	Asp	Thr	Thr	Glu	Thr
305					310					315					320
Phe	Ile	Lys	Ala	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Met	Leu	Pro	Asp	Asp	Arg	Phe
				325					330					335	

ES 2 673 521 A1

Ala Gln Ser Lys Val Arg Ala Lys Ile Phe Asp Gly Ile Asn Tyr Phe
 340 345 350
 Leu Lys Leu Ala Ile Ala Asp Tyr Met Leu Met Arg Asn Asn Ala Lys
 355 360 365
 Glu Ile Ile Lys Asn Trp Glu His Leu Ala Tyr Gln Ala Phe Glu Ser
 370 375 380
 Thr Arg Ser Tyr Asn His Lys Phe Asn Arg Thr Leu Pro Ala Phe Gln
 385 390 395 400
 Thr Ile Val Asp Gln Gln Asp Asn Arg Lys Val Met Ile Gly Ser Val
 405 410 415
 Arg Phe Ser Thr Pro Asp Leu Gly Lys Leu Val Arg Cys Leu Val Arg
 420 425 430
 Glu Tyr His Thr Thr Val Arg Asn Leu Leu Pro Asp Gly Met Leu Met
 435 440 445
 Val Asp Glu Leu Tyr Glu Glu Phe Arg Lys His Ala Lys Asp Met Phe
 450 455 460
 Ser Cys Thr Asp Leu Gly Tyr Ser Val Phe Tyr Gly Thr Asp Glu Leu
 465 470 475 480
 Asn Lys Leu Ser Tyr Gln Gln Arg Arg Thr Tyr Glu Glu Ala Val Gly
 485 490 495
 Asp Lys Trp Lys Asn Gln Lys Tyr Met Arg Ser Met Phe Asp Gln Phe
 500 505 510
 Thr Arg Leu Asn Leu Asn Ile Phe Val Cys Ile Leu Ile Thr Cys Gly
 515 520 525
 Ser Pro Phe Arg Val Thr Glu Leu Leu Thr Leu Thr Phe Ala Asn Pro
 530 535 540
 Thr Asp Leu Val Arg Thr Met Tyr Tyr Ser Asn Glu His Ile Gln Ile
 545 550 555 560
 Asn Leu Leu Tyr Asn Lys Asn Thr His Ser Ser Met Arg Tyr Ser Asn
 565 570 575
 His Thr Lys Met Leu Pro Ile Glu Val Ser Lys Ile Val Ile His Tyr
 580 585 590
 Val Ser Ile Ile Lys Tyr Leu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu His Gly
 595 600 605
 Trp Ala Lys Ser Lys Ser Asp Met Ser Val Ala Asp Asp Trp Glu Asp
 610 615 620
 Asp Glu Glu Phe Asp Glu Leu Asp Gly Asn Asp Leu Glu Asp Gly Ala
 625 630 635 640
 Ser Leu Leu Ala Ser Lys Ala Leu Ser Lys Arg Asp Glu Ile Lys Thr
 645 650 655
 Leu Leu Phe Met Tyr Lys Leu Gly Pro Arg Asn Gly Gly Gln Val Phe
 660 665 670
 Lys Tyr Leu Glu Leu Val Ser Glu Lys Tyr Ile Arg Glu Lys Tyr Thr
 675 680 685
 Pro Arg Ile Leu Arg Gln Ala Leu Val Tyr Phe Thr Arg Thr Leu Leu
 690 695 700
 Glu Glu Ala Lys Tyr Gln Gly Val Gly Ile Leu Asn Arg Ile Asp Ser
 705 710 715 720
 Ile Ala Gly His Arg Ser Glu Thr Ala Asp Leu Gln Tyr Gly Val Thr
 725 730 735
 His Ser Asn Met Tyr Ala Asn Leu Tyr Asp Gly
 740 745

<210> 20
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2D19448

<400> 20
 Met Glu Ala Ile Arg Ile Val Glu Ile Asp Gly Val Ser Val Leu Thr
 1 5 10 15
 His Asp Arg Asn Thr Leu Asn Pro Phe Ser Glu Arg Phe Asn Lys Arg
 20 25 30
 Tyr Leu Val Asn Ala Met Asp Cys Ser Ile Ile Arg Asp Asp Ile Leu

ES 2 673 521 A1

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

<210> 21
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2D00682

<400> 21

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

ES 2 673 521 A1

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

<210> 22
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DEHA2E00198

<400> 22
 Met Glu Ser His Glu Leu Arg Ile Arg Glu Val Gly Gly Val Ser Ile
 1 5 10 15
 Leu Val His Lys Asp Lys Ile Val Asn Pro Leu Ala Glu Lys Phe Ala
 20 25 30
 Asn Lys Tyr Leu Pro Arg Leu Ile Glu Ser Ser Glu Ile Arg Ser Thr
 35 40 45
 Ile Leu Ser Glu Ile Lys Ser Tyr Tyr Gln Glu His Ser Lys Gln His
 50 55 60
 Tyr Leu Leu Lys Gln Ile Ala Val Thr Asp Asp Ser Glu Val Pro
 65 70 75 80
 Gly Val Lys Glu Ser Lys Leu Asn Val Cys Lys Leu Cys Phe Asn His
 85 90 95
 Ala Ser Lys Ser His Ile Asn His His Leu Arg Thr Glu His Arg Val
 100 105 110
 Asn Cys Asn Phe Gln Arg His Val Phe Arg Thr Thr Gly Tyr Ala Ile
 115 120 125
 Pro Asn Gln Lys Cys Gly Phe Ser Tyr Ile Tyr Arg Glu Lys Glu Asp
 130 135 140
 Thr Lys Pro Pro Thr Ser Met Thr Thr Ile Glu Gly Pro His Thr His
 145 150 155 160
 Leu Arg His Glu Asp Lys Phe Leu Arg Thr Ile Asn Ala Asn Leu Tyr
 165 170 175
 Tyr Gly Lys Gly Tyr Pro Gln Tyr Leu His Ser Glu Asn Lys Glu Glu
 180 185 190
 Ser Ile Pro Val Phe Glu Ala Val Lys Lys Tyr Ile Leu Gln Asp Arg
 195 200 205
 Pro His Leu Lys Gly Thr His Pro Ile Tyr Asn Arg Met Leu Arg Glu
 210 215 220
 Gly Ile Leu Lys Val Pro Val Leu Phe Thr Thr Gln Val Ile Tyr Ala
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gly Arg Phe Phe Tyr Thr Phe Ala Lys Leu Cys Asp Asn
 245 250 255
 Arg Ile Ile Glu Glu Val Val Thr Asn Pro Thr Asp Glu Val Val Lys
 260 265 270
 Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Glu Lys Tyr Ile Val Val Glu Glu Asp

ES 2 673 521 A1

		275					280				285				
Thr	Thr	Glu	Thr	Phe	Met	Lys	Ala	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Met	Leu	Pro
	290					295					300				
Asp	Asp	Arg	Phe	Ala	Gln	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Lys	Ile	Phe	Asp	Gly
305					310					315					320
Ile	Asn	Tyr	Phe	Leu	Lys	Leu	Ala	Ile	Ala	Asp					
				325					330						