

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 061**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2015** **PCT/EP2015/076449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016** **WO16075243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2015** **E 15797912 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3218509**

54 Título: **Microorganismos mutantes resistentes a la destrucción por lactosa**

30 Prioridad:

14.11.2014 EP 14193151

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

04.11.2024

73 Titular/es:

**INBIOSE N.V. (100.0%)
Technologiepark 82, bus 41
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**BEAUPREZ, JOERI;
DE MAESENEIRE, SOFIE y
TIMMERMANS, ERIC**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 985 061 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

Microorganismos mutantes resistentes a la destrucción por lactosa

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir microorganismos mutados que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa y a los microorganismos que pueden obtenerse por medio de dicho procedimiento. Dichos microorganismos modificados genéticamente pueden aplicarse para la producción de productos de especialidad, tales como, pero sin limitación, carbohidratos, glicolípidos y compuestos galactosilados de especialidad.

Antecedentes de la técnica

La destrucción por lactosa es un principio bien conocido y bien estudiado que dificulta el crecimiento de muchos organismos en presencia de lactosa con otra fuente de carbono. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto que subyace detrás de este fenómeno, aunque las características necesarias para inducir el fenómeno son bastante claras. La destrucción por lactosa se produce cuando se añade lactosa a un cultivo microbiano que crece en otra fuente de carbono, tal como, pero sin limitación, glicerol o sacarosa. Además, se produce cuando el gen de transporte de lactosa o bien es inducible o bien se expresa constitutivamente (33, 39, 75). La destrucción por lactosa se observó por primera vez en *E. coli* en la que la expresión de lactosa permeasa se moduló con IPTG y lactosa en condiciones quimiostáticas (28). Posteriormente, también se observó destrucción por lactosa en *Rhizobium meliloti*, *Kluyveromyces lactis* y *Zymomonas mobilis* (55, 70, 77). Una de las posibles razones para este fenómeno se atribuyó al denominado "coste" de la actividad transportadora de lactosa para la célula; este "coste" da como resultado una reducción o inhibición del crecimiento y también está relacionado con la concentración de lactosa extracelular (34), que se mantiene en general elevada en procesos industriales para adquirir títulos y rendimientos de producto suficientemente altos. Sin embargo, la técnica establece que siempre que haya transporte de lactosa en estas condiciones, deberá producirse destrucción por lactosa. Para resolver el problema de la destrucción por lactosa, se ha propuesto la supresión de lactosa permeasa o el deterioro grave de la absorción de lactosa (34). Por ejemplo, Lodi *et al* (55) suprimieron (inactivaron) lactosa permeasa en *K. lactis* y descubrieron que ya no se produjo destrucción por lactosa. Las mutaciones espontáneas durante sus experimentos mostraron además que las cepas negativas a la destrucción por lactosa seleccionadas están gravemente deterioradas en su absorción de lactosa. Sin embargo, la absorción de lactosa es esencial para sintetizar productos o bioproductos de especialidad de forma eficaz. Por lo tanto, una supresión de lactosa permeasa o un deterioro grave en la actividad de lactosa permeasa claramente no es una solución, ya que la producción de dichos bioproductos requiere 1) una absorción de lactosa eficaz y 2) un casete de expresión que no dé lugar al "fenotipo de destrucción por lactosa". La lactosa permeasa para la producción de bioproductos basados en lactosa se ha usado anteriormente, pero sin resolver el "fenotipo de destrucción por lactosa". En el pasado, este problema se resolvió reduciendo significativamente la absorción de lactosa (y por tanto se produce poco o ningún producto de especialidad basado en lactosa) o desacoplando la fase de crecimiento y la fase de producción a fin de obtener en primer lugar suficiente biomasa. Después de esta fase de crecimiento, la lactosa se añade en una segunda fase para producir un producto de especialidad. En esta segunda fase no se produce crecimiento o se produce un crecimiento significativamente reducido (59).

Por lo tanto, el consenso actual es que, para evitar la destrucción por lactosa, la absorción de lactosa debe eliminarse o deteriorarse gravemente, ya que la absorción normal de lactosa siempre dará lugar a la destrucción por lactosa. Por el contrario, la presente invención divulga una metodología de cribado para encontrar casetes de expresión de lactosa permeasa que permitan la absorción eficaz de lactosa sin experimentar destrucción por lactosa. La lactosa es un bloque de construcción para muchos bioproductos, más particularmente carbohidratos (14), glicolípidos y compuestos galactosilados de especialidad tales como galactosil-lípidos, galactosilceramidas y aglicones galactosilados. En muchos casos, el resto galactosa se usa para el direccionamiento a órganos de productos farmacéuticos (28). Sin embargo, el uso de lactosa como sustrato en combinación con otros sustratos no es tan evidente como podría parecer debido al fenómeno descrito anteriormente de "destrucción por lactosa". En general, son necesarios sistemas de producción multifásicos, sistemas de células acopladas de no crecimiento, para evitar la destrucción por lactosa (32, 48).

La cadena principal estructural básica de muchos carbohidratos especiales consiste en unidades de lactosa o galactosa. Más específicamente, los oligosacáridos de la leche humana y por extensión los oligosacáridos de la leche materna, un amplio grupo de sacáridos y oligosacáridos, se forman a partir de unidades de galactosa y lactosa (15). Estos carbohidratos se modifican adicionalmente con restos de azúcar tales como, por ejemplo, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácidos siálicos (tales como N-acetilneuraminato, N-glicoilneuraminato, ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-galacto-nonulosónico,...) (21), L-fucosa,... La síntesis de estos compuestos requiere entonces carbohidratos activados tales como UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, CMP-ácido siálico, GDP-fucosa,..., que son moléculas muy caras y difíciles de sintetizar y se producen óptimamente por células vivas en crecimiento debido a la energía que requiere su biosíntesis. Los componentes de oligosacáridos de la leche humana/materna tienen efectos antiinflamatorios y prebióticos y/o tienen aplicaciones en productos terapéuticos como nutracéuticos, agentes antiinflamatorios, prebióticos o productos farmacéuticos (15, 24, 68). Sin embargo, aún es necesario un procedimiento eficaz para producir estos últimos compuestos de alto valor.

La presente invención describe sistemas de expresión sintéticos para transportadores de lactosa que no dan como resultado la destrucción por lactosa, incluso a altas concentraciones de lactosa. Los organismos mutados que se pueden obtener por medio de dichos sistemas de expresión son, por lo tanto, útiles para producir los bioproductos descritos anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de la lactosa sobre una cepa de *E. coli* de tipo silvestre. En la flecha se añadió lactosa a uno de los cultivos y el crecimiento de este cultivo se detuvo inmediatamente, mientras que la otra cepa continuó creciendo en el otro cultivo.

Figura 2: Efecto de la lactosa sobre una cepa mutante de transportador de lactosa de *E. coli* en la que la expresión del transportador de lactosa se altera por medio de un promotor constitutivo sintético. La flecha indica el momento en el que se añadió lactosa al medio en uno de los cultivos. En este caso no se observó ningún efecto sobre el crecimiento. Por lo tanto, estas cepas mutantes pueden seleccionarse de esta forma.

Figura 3: Ejemplo de una combinación de promotor, RBS y secuencia de transportador de lactosa (SEQ ID N° 1) que no da como resultado la destrucción por lactosa cuando se introduce en una cepa mutante de *E. coli*.

Figura 4: Ejemplo de una secuencia del gen de lactosa permeasa acoplado traduccionalmente al gen *lacZ* (SEQ ID N° 2).

Figura 5: Ejemplo de una secuencia del gen de lactosa permeasa *lacY* acoplado traduccionalmente al gen *cat* (SEQ ID N° 3).

Figura 6: Ejemplo de una secuencia del gen de lactosa permeasa de *K. maxianus* acoplado traduccionalmente al gen *aph 1* (SEQ ID N° 4).

Figura 7: Ejemplo de una secuencia del gen de lactosa permeasa *lacy* acoplado con un aptámero que se une a (Z)-4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona (SEQ ID N° 5) y permite la detección de la expresión de lactosa permeasa.

Figura 8: Resistencia a cloranfenicol de una cepa de referencia que contiene un plásmido de referencia pSC101 sin una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente a un gen de resistencia a cloranfenicol y una cepa mutante con una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente a un gen de resistencia a cloranfenicol. El eje X muestra las diferentes concentraciones de cloranfenicol sometidas a ensayo, el eje Y muestra la densidad óptica del cultivo después de 48 horas de incubación. La cepa de referencia muestra un retraso en el crecimiento en un cribado de cloranfenicol más bajo que la cepa mutante, lo que prueba que la expresión de lactosa permeasa puede cribarse mediante acoplamiento traduccional con un gen de resistencia a antibióticos. Los organismos que expresan lactosa permeasa, por lo tanto, pueden seleccionarse de una mezcla de organismos no expresantes y expresantes de esta forma.

Figura 9: Resistencia a cloranfenicol de una cepa de referencia que contiene un plásmido de referencia pSC101 sin una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente a un gen de resistencia a cloranfenicol y una cepa mutante con una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente a un gen de resistencia a cloranfenicol. El eje X muestra las diferentes concentraciones de cloranfenicol sometidas a ensayo, el eje Y muestra la densidad óptica del cultivo después de 92 horas de incubación. La cepa de referencia muestra un retraso en el crecimiento en un cribado de cloranfenicol más bajo que la cepa mutante, lo que prueba que la expresión de lactosa permeasa puede cribarse mediante acoplamiento traduccional con un gen de resistencia a antibióticos. Los organismos que expresan lactosa permeasa, por lo tanto, pueden seleccionarse de una mezcla de organismos no expresantes y expresantes de esta forma.

Figura 10: pCXP14-FT_H. pylori (SEQ ID N° 6).

Figura 11: Efecto de la lactosa sobre una cepa de levadura de tipo silvestre (*Kluyveromyces marxianus lactis*). En la flecha se añadió lactosa a uno de los cultivos y el crecimiento de este cultivo se detuvo inmediatamente, mientras que la otra cepa continuó creciendo en el otro cultivo.

Figura 12: Efecto de la lactosa sobre cepas mutantes en transportador de lactosa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en las que la expresión del transportador de lactosa está alterada por medio de un promotor constitutivo sintético. La flecha indica el momento en el que se añadió lactosa al medio en uno de los cultivos. En este caso no se observó ningún efecto sobre el crecimiento. Por lo tanto, estas cepas mutantes pueden seleccionarse de esta forma.

Figura 13: Ejemplo de una combinación de promotor (p1), Kozak, secuencia codificante de lactosa permeasa de *K. marxianus* y terminador (SEQ ID N° 7) que no da como resultado la destrucción por lactosa cuando se introduce en una cepa mutante de levadura.

Figura 14: Ejemplo de una combinación de promotor (p2), Kozak, secuencia codificante de lactosa permeasa de *K. marxianus* y terminador (SEQ ID N° 8) que no da como resultado la destrucción por lactosa cuando se introduce en una cepa mutante de levadura.

Figura 15: Ejemplo de combinación de promotor, Kozak, secuencia codificante de β -galactosidasa de *K. marxianus* y terminador (SEQ ID N° 9).

Figura 16: ADNr de HR1 (SEQ ID N° 10).

Figura 17: ADNr de HR2 (SEQ ID N° 11).

Figura 18: Ejemplos de secuencias seleccionadas que se originan a partir de la metodología de cribado de destrucción por lactosa tal como se describe en los ejemplos (SEQ ID N° 12 a 57).

Figura 19: Tasa de crecimiento relativa de los casetes de expresión de lactosa permeasa, con respecto al tipo silvestre. Las barras de error son desviaciones estándar de al menos 3 mediciones repetidas. Las secuencias que se correlacionan con los números de secuencia en el eje X se muestran en la figura 18.

Figura 20: La secuencia del casete de expresión lacIQ_lacY que se sometió a ensayo en la destrucción por lactosa en el ejemplo 16 (SEQ ID N° 58).

Figura 21: Efecto de la lactosa sobre una cepa de *E. coli* de tipo silvestre y una cepa mutante lacIQ_lacY. Ambas cepas se cultivaron con y sin la adición de la fase exponencial media de lactosa. La flecha indica el momento de la adición de lactosa. El crecimiento de ambas cepas se vio gravemente perjudicado por la adición de lactosa.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa cuando se cultivan en un entorno en el que la lactosa se combina con otra fuente de carbono, comprendiendo dicho procedimiento:

a. mutar la expresión de un transportador de lactosa dentro de microorganismos introduciendo un promotor heterólogo delante de un gen de transportador de lactosa endógeno o exógeno a) suprimiendo los transportadores de lactosa endógenos del genoma y reintroduciéndolos en otra ubicación dentro del genoma de dicho microorganismo, b) introduciendo un promotor heterólogo delante de los transportadores de lactosa endógenos, o c) inactivando el promotor de lactosa endógeno e introduciendo un promotor heterólogo en la misma ubicación en el genoma de dicho microorganismo, y/o, mutando la región no traducida delante de la secuencia codificante que contiene las secuencias de unión a ribosoma o de Kozak y/o modificando el uso de codones del gen de transportador de lactosa endógeno, en el que dicha mutación da como resultado la expresión de dicho transportador de lactosa, b. cultivar dichos microorganismos mutados en un medio que comprende una fuente de carbono que no es lactosa, c. añadir lactosa a dicho medio durante el crecimiento de dichos microorganismos mutados, y d. seleccionar los microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa al crecer en dicho medio que comprende lactosa y que retienen al menos el 50% del influjo de lactosa obtenido con el casete de expresión de tipo silvestre de dicho transportador de lactosa.

La presente invención se refiere también al procedimiento descrito anteriormente en el que la expresión de lactosa permeasa en la etapa b) se detecta por medio de acoplamiento traduccional con un gen indicador y/o mediante acoplamiento de aptámero.

La presente invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente en el que el transportador de lactosa expresado se detecta mediante constructos genéticos tal como se proporcionan por las SEQ ID N° 2, 3, 4 y/o 5.

La presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente en el que dicho transportador de lactosa es una lactosa permeasa.

La presente invención se refiere también a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente en el que dicho microorganismo es una bacteria, una levadura o un hongo.

La presente invención también se refiere a secuencias promotoras, regiones no traducidas delante de la secuencia codificante que contienen secuencias de unión a ribosomas o secuencias de Kozak y/o secuencias de lactosa permeasa que dar lugar a la expresión de un transportador de lactosa, que no da como resultado un fenotipo de

destrucción de lactosa cuando se cultiva un microorganismo que contiene dicha secuencia en un entorno en el que se combina lactosa con una o varias otras fuentes de carbono, y que puede obtenerse mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente

La presente invención se refiere también a un microorganismo que resiste el fenómeno de destrucción por lactosa cuando se cultivan en un entorno en el que la lactosa se combina con otra fuente de carbono, y que puede obtenerse mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, y que tiene una secuencia heteróloga delante de un gen transportador de lactosa tal como se proporciona por las SEQ ID N° 1, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57.

La presente invención se refiere también a un microorganismo que resiste el fenómeno de destrucción por lactosa en el que los genes que codifican las enzimas de las rutas de degradación de lactosa y/o galactosa se vuelven menos funcionales o no funcionales.

La presente invención se refiere también al uso de un microorganismo tal como se ha descrito anteriormente para la producción de productos de especialidad basados en lactosa tales como carbohidratos, glicolípidos y compuestos galactosilados de especialidad.

La presente invención se refiere también al uso de un microorganismo tal como se ha descrito anteriormente en el que dichos carbohidratos de especialidad son 2-fucosil-lactosa o 2'-fucosil-lactosa o 3-fucosil-lactosa o 2',3-difucosil-lactosa o lacto-N-triosa o lacto-N-tetraosa, o lacto-nN-tetraosa o 3'sialil-lactosa o 6'sialil-lactosa.

Descripción de la invención

La presente invención describe una forma novedosa de evitar la destrucción por lactosa cambiando la expresión de un transportador de lactosa mediante ingeniería genética en un organismo, dando como resultado un organismo que expresa un transportador de lactosa mutante. Para este fin, se expresa un gen de transportador de lactosa exógeno y/o endógeno por un promotor heterólogo que no da lugar a un fenotipo de destrucción por lactosa y/o se modifica el uso de codones del transportador de lactosa para crear una expresión alterada del transportador de lactosa que no da lugar a un fenotipo de destrucción de lactosa. Para este fin, el control de expresión natural de los transportadores de lactosa debe eliminarse y/o reemplazarse de tal manera que no se produzca la destrucción por lactosa. Por ejemplo, el casete de expresión del transportador de lactosa de origen natural se suprime del genoma y se reintroduce en otra ubicación, y/o, se introduce un promotor heterólogo delante del transportador de lactosa en su ubicación original, y/o, se inactiva en primer lugar el transportador de lactosa y se reintroduce con un promotor heterólogo en la misma y/u otra ubicación en el genoma, y/o, el transportador de lactosa se introduce en un operón que se expresa a través de un promotor heterólogo.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento para producir microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa cuando se cultivan en un entorno en el que la lactosa se combina con otra fuente de carbono, en el que dicho procedimiento comprende: 1) mutar la expresión de transportadores de lactosa dentro de microorganismos, en el que dicha mutación da como resultado la expresión de dicho transportador de lactosa, 2) cultivar dichos microorganismos mutados en un medio que comprende una fuente de carbono que no es lactosa, 3) añadir lactosa a dicho medio durante el crecimiento de dichos microorganismos mutados, y 4) seleccionar los microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa al crecer en dicho medio que comprende lactosa y que retienen al menos el 50% del influjo de lactosa obtenido con el casete de expresión de tipo silvestre de dicho transportador de lactosa.

El término "destrucción por lactosa" se refiere al fenómeno de retraso del crecimiento o detención del crecimiento de un organismo que crece en un entorno en el que se combina lactosa o galactósido con una o varias otras fuentes de carbono. Estas fuentes de carbono son, sin limitación, glicerol, maltosa, glucosa, fructosa, sacarosa, fucosa, manosa, ácido siálico, almidón, celulosa, polioles (tales como manitol, xilitol, sorbitol), ácidos orgánicos (lactato, succinato, acetato,...) y/o pentosas (xilosa, arabinosa,...).

La presente invención describe un procedimiento para identificar sistemas de expresión de lactosa permeasa que no dan como resultado destrucción por lactosa. Este procedimiento abarca un análisis de crecimiento de la cepa mutante a la que se añade lactosa en la fase exponencial media. Este procedimiento puede realizarse en una forma de alto rendimiento en placas de microtitulación o con clasificadores celulares, permitiendo el cribado de múltiples promotores, sitios de unión a ribosomas, uso de codones y otros factores que pueden influir en la expresión de lactosa permeasa en el microorganismo mutante. La presente invención describe un procedimiento para detectar la expresión de lactosa permeasa por medio de acoplamiento traduccional y/o acoplamiento de aptámeros y la selección de secuencias que dan lugar a la expresión por medio de un gen indicador, tal como, pero sin limitación, un gen de resistencia a antibióticos (por ejemplo, pero sin limitación, cloranfenicol, geneticina G418), una proteína fluorescente, una hidrolasa (por ejemplo, pero sin limitación, galactosidasa, xilanasas) y, o una secuencia de aptámero. Las secuencias que dan lugar a la expresión de lactosa permeasa se seleccionan también basándose en el gen indicador, mediante cultivo en un medio con un antibiótico, un ensayo colorimétrico (tal como X-gal) y/o por medio de un clasificador de células

activado por fluorescencia que clasifica células fluorescentes y/o un ensayo de aptámero, por ejemplo, pero sin limitación, basado en (Z)-4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona (37, 64). La presente invención describe también un procedimiento para cribar organismos mutantes que expresan el transportador de lactosa que no experimentan destrucción por lactosa. Además, la presente invención describe cómo se pueden crear bibliotecas de casetes de expresión de lactosa permeasa por medio de bibliotecas de promotores, bibliotecas de secuencias de RBS o de Kozak, bibliotecas de terminadores de la transcripción y/o variantes de usos de codones del gen de lactosa permeasa. Estas bibliotecas se crean también mediante procedimientos tales como, pero sin limitación, ensamblaje de Gibson, ensamblaje de Golden Gate, ensamblaje de Cliva, LCR o ligamiento por restricción (25, 36, 50, 79).

El término "que retiene al menos el 50% del influjo de lactosa obtenido con el casete de expresión de tipo silvestre de dicho transportador de lactosa" se refiere al hecho de que los microorganismos mutados de la presente invención, aunque resisten la destrucción por lactosa, aún deberán ser capaces de retener al menos el 50% (es decir, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99%) del influjo de lactosa que se obtiene cuando se usa el casete de expresión de tipo silvestre de dicho transportador de lactosa.

El término "casete de expresión" se refiere a cualquier secuencia en la que está presente una secuencia promotora, una secuencia de región no traducida (que contiene o bien una secuencia de unión a ribozima o bien una secuencia de Kozak), una secuencia codificante (por ejemplo una secuencia del gen de lactosa permeasa) y opcionalmente un terminador de transcripción (18).

El término "transportador de lactosa" se refiere a cualquier proteína expresada en un microorganismo que es capaz de translocar (transportar) lactosa a través de la membrana citoplasmática. Tales proteínas son, por ejemplo, lactosa permeasas (transportadores de la superfamilia MFS o la superfamilia de facilitadores principales).

El término "promotor heterólogo" se refiere a cualquier promotor que no se produzca de forma natural delante de una secuencia codificante. Un "promotor" es la totalidad de la secuencia de unión a ARN polimerasa que está ubicada antes del sitio de inicio de la transcripción y la región no traducida delante de la secuencia codificante. Una secuencia "promotora heteróloga" es, por lo tanto: 1) una variante de la secuencia promotora que no se produce de forma natural que contiene al menos 1 (es decir, 1, 2, 3, 4,...) mutación, y/o 2) un promotor nativo del microorganismo que expresa el transportador de lactosa mutante que no se produce de forma natural delante de la secuencia codificante de dicho transportador, y/o 3) una secuencia que no se produce de forma natural en el microorganismo que expresa el transportador de lactosa, y/o 4) un promotor artificial que es un promotor diseñado *in silico*. Estos promotores pueden derivarse de bibliotecas tales como, pero sin limitación, las descritas por Alper *et al.* (2005), y/o HXT7p, Hammer *et al.* (2006), De Mey *et al.* (2007), Coussement *et al.* (2014) o, Mutalik *et al.* (2013) (3, 25, 29, 41, 60) (66), o Blount *et al.* (2012), promotores tales como, pero sin limitación, ADH1p, TEF1p, TEF2p, GPDp, PDC1p, FBA1p, PGK1p, PGI1p, TDH2p, PYK1p, ENO2p, GPM1p, TPI1p (13), o diseñados tal como se describe, por ejemplo, por Rhodius *et al.* (2012). El término "promotor artificial" también se refiere a promotores con secuencias de ADN que son combinaciones de la secuencia promotora nativa (autóloga) con partes de diferentes secuencias promotoras (autólogas o heterólogas). Las secuencias de dichos "promotores artificiales" se pueden encontrar en bases de datos tales como, por ejemplo, partsregistry.org (19). Los promotores heterólogos dan lugar a la expresión constitutiva o a la expresión regulada por medio de un factor de transcripción.

El término "expresión constitutiva" se define como la expresión que no está regulada por factores de transcripción distintos de las subunidades de la ARN polimerasa (por ejemplo, los factores sigma bacterianos) en determinadas condiciones de crecimiento. Ejemplos no limitantes de tales factores de transcripción son CRP, LacI, ArcA, Cra, IclR, ... en *E. coli*, o, Aft2p, Crz1p, Skn7, ... en *Saccharomyces cerevisiae*, o, DeoR, GntR, Fur, ... en *B. subtilis*. Estos factores de transcripción se unen a una secuencia específica y pueden bloquear o potenciar la expresión en determinadas condiciones de crecimiento. La ARN polimerasa se une a una secuencia específica para iniciar la transcripción, por ejemplo a través de un factor sigma en huéspedes procarióticos.

El término "expresión regulada" se define como la expresión que está regulada por factores de transcripción distintos de las subunidades de la ARN polimerasa (por ejemplo, factores sigma bacterianos) en determinadas condiciones de crecimiento. Ejemplos de tales factores de transcripción se han descrito anteriormente.

El término "región no traducida" delante de la secuencia codificante que contiene los sitios de unión al ribosoma o secuencias de Kozak se refiere a la secuencia entre la secuencia de unión a la ARN polimerasa y la secuencia codificante. Esta región no traducida es también la secuencia que se produce de forma natural delante de la secuencia codificante, y/o una secuencia que se produce de forma natural en el microorganismo que expresa el transportador de lactosa, y/o una secuencia que se deriva de otros organismos (procariotas o eucariotas), y/o una secuencia que se diseña artificialmente, que se refiere a sitios de unión a ribosoma diseñados de forma no natural o *in silico* con tasas de traducción conocidas o medibles; estas secuencias pueden derivarse de bibliotecas tal como se describen por Mutalik *et al.* (2013) (60) o diseñarse mediante algoritmos, por ejemplo, tal como se describen por Salis *et al.* (2009) (67) o se puede encontrar en bases de datos tales como partsregistry.org (19).

La expresión "uso de codones modificados" se refiere a la alteración de los codones usados dentro de una secuencia codificante de ADN, ya sea a codones usados más frecuentemente por el organismo o usados rara vez por el organismo. El uso de codones se define en bases de datos tales como la base de datos de uso de codones (61) y el uso de codones se optimiza mediante algoritmos de diseño de uso de codones (73).

El término "acoplamiento traduccional" se refiere a la expresión acoplada de un gen de interés y un gen indicador tal como proteínas fluorescentes verdes, genes de resistencia a antibióticos, genes tóxicos, (49, 53, 58, 63). El término "sensor de traducción" se refiere a cualquier mecanismo que sea un indicador para la expresión y traducción de un gen, por ejemplo, etiquetas fluorescentes y etiquetas de división tal como se describen en las siguientes referencias (17, 72).

El término "acoplamiento de aptámero" se refiere a la introducción de una secuencia de aptámero en el ARN mensajero del transportador de lactosa que puede detectarse por un fluoróforo tal como, pero sin limitación, (Z)-4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona (37, 64).

El término "análisis de crecimiento" se refiere al análisis de la curva de crecimiento de un organismo. Este organismo se cultiva en un medio de crecimiento en un entorno de crecimiento. El término entorno de crecimiento se refiere a todos los parámetros ambientales tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto. El pH se ajusta por medio de un tampón de pH o por control de pH y es por ejemplo, pero sin limitación, un pH de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. La temperatura se establece, por ejemplo, pero sin limitación, a 25, 28, 30, 32, 34, 37, 40, 42, 45 °C. El oxígeno disuelto es anaeróbico, micro-aeróbico (con oxígeno disuelto por debajo de 1,5 mg/l) o condiciones aeróbicas.

El término "medio" o "medio de crecimiento" se refiere a cualquier solución que contiene los sustratos necesarios para que crezca un organismo. Estos sustratos son, pero sin limitación, fuentes de nitrógeno tales como sales de amonio, sales de nitrato, extracto de levadura, peptona, casamino y/o aminoácidos, fuentes de fósforo tales como, pero sin limitación, sales de fosfato, fuentes de azufre tales como, pero sin limitación, sales de sulfato, elementos tales como, pero sin limitación, cobre, cobalto, hierro, selenio, yodo, molibdato, magnesio, calcio, potasio, sodio, zinc, níquel, manganeso y/o ácido bórico y/o vitaminas tales como, pero sin limitación, tiamina, ácido pantoténico y/o niacina y/o una fuente de carbono tal como, pero sin limitación, glicerol, maltosa, glucosa, fructosa, sacarosa, fucosa, manosa, ácido siálico, almidón, celulosa, polioles (tales como manitol, xilitol, sorbitol), ácidos orgánicos (lactato, succinato, acetato,...), y/o pentosas (xilosa, arabinosa,...).

El término "organismo" o "célula" tal como se ha indicado anteriormente se refiere a un microorganismo elegido de la lista que consiste en una bacteria, una levadura o un hongo, o, se refiere a una célula vegetal o animal. Esta última bacteria pertenece preferentemente al filo Proteobacteria o al filo Firmicutes o al filo Cyanobacteria o al filo Deinococcus-Thermus. Esta última bacteria que pertenece al filo Proteobacteria pertenece preferentemente a la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente a la especie *Escherichia coli*. Esta última bacteria se refiere preferentemente a cualquier cepa perteneciente a la especie *Escherichia coli* tal como, pero sin limitación, *Escherichia coli* B, *Escherichia coli* C, *Escherichia coli* W, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* Nissle. Más específicamente, este último término se refiere a cepas de *Escherichia coli* cultivadas, designadas como cepas de *E. coli* K12, que están bien adaptadas al entorno del laboratorio y, a diferencia de las cepas de tipo silvestre, han perdido su capacidad de crecer en el intestino. Ejemplos bien conocidos de las cepas de *E. coli* K12 son K12 de tipo silvestre, W3110, MG1655, M182, MC1000, MC1060, MC1061, MC4100, JM101, NZN111 y AA200. Por lo tanto, la presente invención se refiere específicamente a una cepa de *Escherichia coli* mutada y/o transformada tal como se ha indicado anteriormente en la que la cepa de *E. coli* es una cepa K12. Más específicamente, la presente invención se refiere a una cepa de *Escherichia coli* mutada y/o transformada tal como se ha indicado anteriormente, en la que dicha cepa K12 es *E. coli* MG1655. Esta última bacteria que pertenece al filo Firmicutes pertenece preferentemente a los Bacilli, preferentemente de la especie *Bacillus*. Esta última levadura pertenece preferentemente al filo Ascomycota o al filo Basidiomycota o al filo Deuteromycota o al filo Zygomycetes. Esta última levadura pertenece preferentemente al género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansunella*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* o *Starmerella*. Este último hongo pertenece preferentemente al género *Rhizopus*, *Dictyostelium* o *Aspergillus*.

La presente invención describe organismos que son capaces de absorber lactosa sin sufrir destrucción por lactosa y son capaces de convertir la lactosa o su resto galactosa en un producto de especialidad.

Más particularmente, dichos productos o bioproductos de especialidad son carbohidratos, glicolípidos de especialidad, tales como, pero sin limitación, galactolípidos y/o lactolípidos, y/o compuestos galactosilados tales como galactosil-lípidos, galactosilceramidas y/o aglicones galactosilados. La presente invención describe organismos que son capaces de absorber lactosa sin sufrir destrucción de lactosa y convertir dicha lactosa en un oligosacárido de leche humana, tal como, pero sin limitación 3-fucosil-lactosa, 2'-fucosil-lactosa, 6-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, 2',2-difucosil-lactosa, 3,4-difucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa, 3-sialil-lactosa, 3,6-disialil-lactosa, 6,6'-disialil-lactosa, 3,6-disialil-lacto-N-tetraosa, lactodifucotetraosa, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-fucopentaosa III, sialil-lacto-N-tetraosa c, sialil-lacto-N-tetraosa b, sialil-lacto-N-tetraosa a, lacto-N-difucohexaosa I, lacto-N-difucohexaosa II, lacto-N-hexaosa, lacto-N-neohexaosa, para-lacto-N-hexaosa, monofucosilmonosialil-lacto-N-tetraosa c, monofucosil para-lacto-N-hexaosa, monofucosil-lacto-N-hexaosa III, lacto-N-hexaosa III fucosilada isomérica, lacto-N-hexaosa I fucosilada isomérica, sialil-lacto-N-hexaosa, sialil-lacto-N-

neohexaosa II, difucosil-para-lacto-N-hexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa, difucosil-lacto-N-hexaosa a, difucosil-lacto-N-hexaosa c, quitosano galactosilado, oligosacaridos fucosilados y/o oligosacáridos sialilados...

La presente invención describe también, pero no como parte de la invención, organismos que no experimentan destrucción por lactosa y que sintetizan nucleótido-azúcares tales como, pero sin limitación, GDP-L-fucosa, GDP-manosa, GDP-glucosa, CMP-ácido siálico, UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-N-acetilglucosamina, UDP-N-acetilmanosamina, UDP-N-acetilgalactosamina, UDP-ácido glucurónico, UDP-ácido galacturónico, UDP-xilosa, UDP-arabinosa y/o, dTDP-ramnosa. El término "ácido siálico" es el nombre de grupo para compuestos tales como, pero sin limitación, ácido neurámico, ácido N-acetilneurámico, o ácido N-glicoilneurámico tal como se definen por Varki (1992) (71). La concentración o combinación intracelular de GDP-fucosa se potencia por regulación al alza mediante la ruta de novo y/o la ruta de rescate. La ruta de novo consiste en una GDP-4-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa o GDP-fucosa sintasa, una GDP-manosa 4,6-deshidratasa, una GDP-D-manosa pirofosforilasa, una fosfomanosa isomerasa y/o una fosfomanomutasa, cuya expresión se potencia individualmente por medio de elementos genéticos tales como, pero sin limitación, promotores y/o sitios de unión a ribosomas y/o uso de codones alterado en un monocistrón o policistrón (estructura del operón); y/o por medio de los reguladores *arcA* *iclR* en *Enterobacteriaceae* y/o por medio del regulador transcripcional *RcsA* en *Enterobacteriaceae* o genes homólogos en bacterias, o, *Xbp1*, *Spt20*, *Sfp1*, *Rpd3*, *Rap1*, *Gcr1*, *Gcn5*, *Cst6*, *Abf1*, *Hsf1*, *Reb1*, *Cad1*, *Sin4*, *Ash1*, *Ixr1*, *Met32*, *Pho2*, *Rgr1*, *Spt7*, *Swi4* en *Saccharomyces cerevisiae* o genes homólogos en levaduras u hongos. La ruta de rescate consiste en una L-fucosa quinasa y/o una GDP-L-fucosa pirofosforilasa. La combinación de GDP-manosa se potencia regulando al alza los genes que codifican una GDP-D-manosa pirofosforilasa, una fosfomanosa isomerasa y/o una fosfomanomutasa; y/o, los genes que codifican una manoquinasa y una GDP-D-manosa pirofosforilasa. La combinación UDP-galactosa se potencia regulando al alza los genes que codifican una galactoquinasa y/o galactosa 1-fosfato uridil transferasa, y/o, una UDP-galactosa-4-epimerasa, y/o, una UDP-galactosa/glucosa pirofosforilasa, y/o una lactosa sintasa, y/o una lactosa fosforilasa y/o una sacarosa fosforilasa. La combinación UDP-glucosa se potencia regulando al alza los genes que codifican una glucoquinasa, y/o una UDP-glucosa pirofosforilasa, y/o una sacarosa fosforilasa y/o una fosfoglucomutasa, y/o una sacarosa sintasa. La combinación CMP-ácido siálico se potencia regulando al alza los genes que codifican L-glutamina:D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa y/o fosfoglucomutasa y/o glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa y/o N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa y/o UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa y/o N-acetilneuraminato sintasa y/o citidina 5'-monofosfato N-acetilneuraminato sintetasa. La combinación UDP-N-acetilglucosamina se potencia regulando al alza los genes que codifican L-glutamina:D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, y/o fosfoglucomutasa, y/o glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa y/o N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa y/o glucosamina-6-fosfato N-acetiltransferasa y/o fosfoacetilglucosamina mutasa y/o UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa. La combinación UDP-N-acetilmanosamina se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-N-acetilglucosamina y/o una UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa. La combinación UDP-N-acetilgalactosamina se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-N-acetilglucosamina y/o una UDP-N-acetilglucosamina C4-epimerasa. La combinación UDP-ácido glucurónico se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-glucosa y/o UDP-glucosa deshidrogenasa. La combinación UDP-xilosa se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-glucurónico y/o UDP-D-xilosa sintasa. La combinación UDP-ácido galacturónico se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-ácido glucurónico y/o UDP-D-ácido glucurónico 4-epimerasa. La combinación UDP-arabinosa se potencia regulando al alza los genes que codifican la potenciación de la combinación UDP-glucurónico y/o UDP-D-xilosa 4-epimerasa y/o arabinosa quinasa y/o UDP-L-arabinosa pirofosforilasa. La combinación dTDP-ramnosa se potencia regulando al alza los genes que codifican una dTDP-glucosa pirofosforilasa y/o dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa y/o dTDP-4-deshidroramnosa 3,5-epimerasa y/o dTDP-4-deshidroramnosa reductasa y o una glucosa-1-fosfato timidililtransferasa y/o una nucleótido ramnosa sintasa.

El término "combinación" se refiere también a concentraciones de metabolitos que se producen de forma natural en el organismo de tipo silvestre, por ejemplo, la concentración de una combinación nucleótido-azúcar. El término "combinación mejorada" se refiere a una concentración significativamente aumentada de dicha combinación de metabolitos, superior a la de la combinación de metabolitos en el organismo de tipo silvestre.

El término "regular al alza un gen" se refiere a cada modificación genética que da lugar a la mejora en la expresión del gen y/o la actividad del producto de dicho gen. Dicha modificación genética es una modificación en el promotor, región no traducida, sitio de unión a ribosomas, la secuencia codificante, la ubicación génica, la estructura intrón/exón y/o el terminador transcripcional, que da lugar a dicho aumento en la expresión y/o la actividad.

Además, la presente invención describe, pero no como parte de la invención, organismos modificados genéticamente que pueden transferir estos nucleótido-azúcares a un mono-, di- u oligosacárido, tales como, pero sin limitación, galactosa, lactosa, lactoNbiosa, lactoNtriosa, lactoNtetraosa, lacto-N-neotetraosa, globotriosa, 2'fucosil-lactosa, 3-fucosilactosa, 3-sialil-lactosa, 6-sialil-lactosa, oligosacáridos de leche humana, heparosanos, quitosanos, factores de nod, glicolípidos y/o aglicones,... por medio de una enzima glicosiltransferasa.

La presente invención describe también, pero no como parte de la invención, organismos que no experimentan destrucción por lactosa y que pueden modificar adicionalmente dicha lactosa con enzimas tales como, pero sin

limitación, carbohidrato hidrolasas, carbohidrato transferasas, carbohidrato sintasas, acetilasas, aciltransferasas, carbohidrato fosfatasas, polisacárido liasas, quinasas, piruvilasas y/o sulfotransferasa.

La presente invención describe también, pero no como parte de la invención, organismos que no experimentan destrucción por lactosa y ya no degradan la lactosa haciendo que el gen de la lactosa hidrolasa sea menos funcional o no funcional.

Los términos "genes que se vuelven menos funcionales o no funcionales" se refieren a las tecnologías bien conocidas para un experto, tales como el uso de ARNpi, ARNi, miARN, ARNas, mutación de genes, inactivación de genes, mutagénesis por transposón, CrispR/CAS, etc., que se utilizan para cambiar los genes de tal forma que sean menos capaces (es decir, estadísticamente significativamente "menos capaces" en comparación con un gen de tipo silvestre funcional) o completamente incapaces (tales como genes inactivados) de producir productos finales funcionales. El término "inactivación (génica)" se refiere, por lo tanto, a un gen que se vuelve no funcional. El término "gen suprimido" o "supresión génica" también se refiere a un gen que se convierte en no funcional (2, 4-9, 22, 27, 30, 43, 45, 46, 51, 65, 74).

La presente invención, pero no como parte de la invención, describe organismos en los que se introducen/activan/regulan al alza genes para producir bioproductos tal como se ha descrito anteriormente. Estos genes se encuentran en bases de datos de genes tales como, pero sin limitación, bases de datos de genes o proteínas tales como, pero sin limitación, uniprot, o bases de datos de enzimas tales como, pero sin limitación, base de datos de enzimas Brenda (16, 23, 38) y se encuentran rutas hacia productos biológicos en bases de datos tales como, pero sin limitación, KEGG, Biocyc, Metacyc (20, 44, 47). La ruta hacia un determinado bioproducto descrito anteriormente puede determinarse mediante varias herramientas matemáticas descritas en la técnica (35, 54, 57, 76).

Ejemplos

1. Material y procedimientos *Escherichia coli*

Cepas y plásmidos

Las *Escherichia coli* MG1655 [λ , F, *rph*-1] y JM109 se obtuvieron de la Netherlands Culture Collection of Bacteria (NCCB). Todas las cepas mutantes se crearon usando el procedimiento de Datsenko y Wanner (27).

Medios

El medio de caldo Luria (LB) consistía en triptona peptona al 1% (Difco, Erembodegem, Bélgica), extracto de levadura al 0,5% (Difco) y cloruro de sodio al 0,5% (VWR, Lovaina, Bélgica). El medio del matraz en agitación contenía 2 g/l de NH_4Cl , 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,993 g/l de KH_2PO_4 , 7,315 g/l de K_2HPO_4 , 8,372 g/l de MOPS, 0,5 g/l de NaCl , 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l de glicerol (a menos que se indique lo contrario), 1 ml/l de solución de vitamina, 100 $\mu\text{l/l}$ de solución de molibdato y 1 ml/l de solución de selenio. El medio se ajustó a un pH de 7 con KOH 1 M.

La solución vitamínica consistía en 3,6 g/l de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,38 g/l de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,94 g/l de ZnCl_2 , 0,0311 g/l de H_3BO_4 , 0,4 g/l de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1,01 g/l de tiamina. HCl . La solución de molibdato contenía 0,967 g/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La solución de selenio contenía 42 g/l de SeO_2 .

El medio mínimo para las fermentaciones contenía 6,75 g/l de NH_4Cl , 1,25 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/l de KH_2PO_4 , 0,5 g/l de NaCl , 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 g/l de lactosa y 20 g/l de sacarosa (o diferentes concentraciones si se indica lo contrario), 1 ml/l de solución de vitamina, 100 $\mu\text{l/l}$ de solución de molibdato, y 1 ml/l de solución de selenio con la misma composición que se ha descrito anteriormente.

Condiciones de cultivo

Se incubó un precultivo de una única colonia en una placa LB en 5 ml de medio LB durante 8 horas a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. A partir de este cultivo se transfirieron 2 ml a 100 ml de cultivo mínimo en un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 16 horas a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Se usó el 4% de inóculo en un recipiente de cultivo Biostat B Plus de 2 o 5 l con un volumen de trabajo de 1,5 l o 4 l (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania). Las condiciones de cultivo eran: 37 °C, agitación a 800 rpm y caudal de gas de 1,5 l/min. Se mantuvieron condiciones aeróbicas mediante inyección de aire. El pH se mantuvo a 7 con H_2SO_4 0,5 M y solución de amoníaco al 35% M. El gas de escape se enfrió a 4 °C mediante un refrigerador de escape (Frigomix 1000, Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania). Se añadió una disolución al 10% de agente antiespumante de silicona (BDH 331512K, VWR Int Ltd., Poole, Inglaterra) al subir la espuma durante la fermentación (aproximadamente 10 μl). El gas de descarga se midió con un analizador de gas de descarga EL3020 (ABB Automation GmbH, 60488 Frankfurt am Main, Alemania).

Todos los datos se registraron con el sistema Sartorius MFCS/win v3.0 (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania).

Metodología de muestreo

El biorreactor contiene en su interior un tubo de recolección (aguja espinal BD, 1,2x152 mm (BDMedical Systems, Franklin Lakes, NJ - Estados Unidos) conectado a un puerto del reactor, unido en el exterior a una tubería Masterflex-14 (Cole-Parmer, Amberes, Bélgica), seguida de un puerto de recolección con un septo para el muestreo. El otro lado de este puerto de recolección está conectado de vuelta al recipiente del reactor con un tubo Masterflex-16. Este sistema se denomina bucle de muestreo rápido. Durante el muestreo, el caldo del reactor se bombea en el bucle de muestreo. Se ha estimado que, a un caudal de 150 ml/min, el caldo del reactor necesita 0,04 s para alcanzar el puerto de recogida y 3,2 s para volver a entrar en el reactor. A un nivel de pO₂ del 50%, hay aproximadamente 3 mg/l de oxígeno en el líquido a 37°C. El nivel de pO₂ nunca debería reducirse por debajo del 20% para evitar condiciones micro-aeróbicas. Por lo tanto, durante el tránsito a través del bucle de muestreo pueden consumirse 1,8 mg/l de oxígeno. Suponiendo una tasa de absorción de oxígeno de 0,4 g de oxígeno/g de biomasa/h (la tasa de absorción de oxígeno máxima encontrada en $\mu_{\text{máx}}$), esto proporciona 5 g/l de biomasa, una tasa de absorción de oxígeno de 2 g/l/h o 0,56 mg/l/s, que multiplicada por 3,2 s (tiempo de residencia en el bucle) da 1,8 mg/l de consumo de oxígeno.

Para inactivar el metabolismo de las células durante el muestreo, el caldo del reactor se succionó a través del puerto de recolección en una jeringa rellena con 62 g de perlas de acero inoxidable pre-enfriadas a -20 °C, para enfriar 5 ml de caldo inmediatamente a 4 °C. El muestreo vino seguido inmediatamente por centrifugación en frío (15000 g, 5 min, 4 °C). Durante los experimentos discontinuos, se tomó una muestra para la medición mediante DO_{600nm} usando el bucle de muestreo rápido y el procedimiento de muestreo de perlas inoxidables frías.

Procedimientos analíticos

La densidad celular del cultivo se supervisó frecuentemente mediante medición de la densidad óptica a 600 nm (espectrofotómetro Uvikom 922, BRS, Bruselas, Bélgica). El peso celular en seco se obtuvo por centrifugación (15 min, 5000 g, rotor GSA, Sorvall RC-5B, Goffin Meyvis, Kapellen, Bélgica) de 20 g de caldo de reactor en tubos falcon presecados y pesados. A continuación, los sedimentos se lavaron una vez con 20 ml de disolución fisiológica (9 g/l NaCl) y se secaron a 70 °C hasta un peso constante. Para poder convertir las mediciones de DO_{600nm} en concentraciones de biomasa, se realizó una curva de correlación de la DO_{600nm} con la concentración de biomasa. Las concentraciones de glucosa y ácidos orgánicos se determinaron en un sistema Varian Prostar HPLC (Varian, Sint-Katelijne-Waver, Bélgica) utilizando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Eke, Bélgica) calentada a 65 °C, equipada con una columna de 1 cm, utilizando H₂SO₄ 5 mM (0,6 ml/min) como fase móvil. Para la detección de picos se utilizó un detector UV-VIS de doble onda (210 nm y 265 nm) (Varian Prostar 325) y un detector de índice de refracción diferencial (Merck LaChrom L-7490, Merck, Lovaina, Bélgica). Los picos se pudieron identificar mediante división de las absorciones de los picos en 265 y 210 nm. La división da como resultado un valor constante, típico para un determinado compuesto (fórmula de Beer-Lambert).

Se midieron glucosa, fructosa, sacarosa, oligosacáridos y glucosa-1-fosfato mediante HPLC con una columna Hypercarb y se detectaron con un detector MSMS (Antonio et al., 2007; Nielsen et al., 2006).

Procedimientos genéticos

Los procedimientos usados para la construcción de mutantes se describen a continuación.

Los plásmidos se mantuvieron en el huésped *E. coli* DH5 α , (F⁻, ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*LacZ*YA-*argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hdsR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

Plásmidos. Se usaron los plásmidos pKD46 (plásmido Red helper, resistencia a ampicilina), pKD3 (contiene un gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por FRT (*cat*) pKD4 (contiene un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por FRT (*kan*) y pCP20 (expresa la actividad de recombinasa FLP) para la construcción de mutantes. El plásmido pBluescript (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) se utilizó para construir los derivados de pKD3 y pKD4 con una biblioteca de promotores, o con alelos portadores de una mutación puntual.

Mutaciones Las mutaciones consistían en una alteración génica (inactivación, KO). Se introdujeron utilizando el concepto de Datsenko y Wanner (27).

Los transformantes portadores de un plásmido Red helper se cultivaron en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 mg/l) y L-arabinosa (10 mM) a 30 °C hasta una DO_{600nm} de 0,6. Las células se volvieron electrocompetentes lavándolas con 50 ml de agua enfriada con hielo, una primera vez, y con 1 ml de agua enfriada con hielo, una segunda vez. Después se resuspendieron las células en 50 μ l de agua helada. La electroporación se realizó con 50 μ l de células y 10-100 ng de producto de ADN bicatenario lineal usando un Gene Pulser™ (BioRad) (600 Ω , 25 pFD, y 250 voltios).

Tras la electroporación, las células se añadieron a 1 ml de medio LB incubado 1 h a 37 °C, y finalmente se extendieron sobre LB-agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol o 50 mg/l de kanamicina para seleccionar transformantes resistentes a antibiótico. Los mutantes seleccionados se verificaron mediante PCR con cebadores cadena arriba y cadena abajo de la región modificada y se cultivaron en LB-agar a 42 °C para la pérdida del plásmido auxiliar. Los mutantes se analizaron para determinar la sensibilidad a ampicilina.

ADN bicatenario lineal. Los amplicones lineales de ADN-bc se obtuvieron mediante PCR utilizando pKD3, pKD4 y sus derivados como plantilla. Los cebadores usados tenían una parte de la secuencia complementaria al molde y otra parte complementaria al lado del ADN cromosómico en el que tiene que tener lugar la recombinación. Para la inactivación, la región de homología se diseñó 50 nt cadena arriba y 50 nt cadena abajo del codón de inicio y detención del gen de interés. Para la activación, el punto de partida transcripcional (+1) tuvo que respetarse. Los productos de PCR se purificaron por PCR, se digirieron con *DpnI*, se volvieron a purificar a partir de un gel de agarosa y se suspendieron en tampón de elución (Tris 5 mM, pH 8,0).

Eliminación del gen de resistencia a antibióticos. Los mutantes seleccionados (resistentes a cloranfenicol o kanamicina) se transformaron con el plásmido pCP20, que es un plásmido resistente a ampicilina y cloranfenicol que muestra replicación sensible a la temperatura e inducción térmica de la síntesis de FLP. Los transformantes resistentes a ampicilina se seleccionaron a 30°C, después de lo cual unos pocos se purificaron en colonias en LB a 42°C y después se sometieron a ensayo para determinar la pérdida de toda la resistencia a antibióticos y del plásmido auxiliar FLP. Las inactivaciones e inserciones génicas se comprueban con cebadores de control (Fw/Rv-gene-out).

Transformación. Los plásmidos se transformaron en células competentes a CaCl₂ usando el procedimiento simplificado de Hanahan (42) o mediante electroporación tal como se ha descrito anteriormente.

2. Material y procedimientos levadura

2.1. Cepas

Se obtuvo *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 de la colección de cultivos Euroscarf. Todas las cepas mutantes se crearon mediante recombinación homóloga o transformación de plásmidos usando el procedimiento de Gietz (40). Se obtuvo *Kluyveromyces marxianus lactis* de la colección de cultivos Laboratory of Industrial Biotechnology and Biocatalysis.

2.2. Medios

Las cepas se cultivan en medio de levadura definido sintético (SD) con mezcla de suplemento completo (CSM) (SD CSM) o CSM *drop-out* (SD CSM-Ura) que contiene 6,7 g.l⁻¹ de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB w/o AA, Difco), 20 g.l⁻¹ de agar (Difco) (cultivos sólidos), 22 g.l⁻¹ de glucosa monohidratada o 20 g.l⁻¹ de lactosa y 0,79 g.l⁻¹ de CSM o 0,77 g.l⁻¹ de CSM-Ura (MP Biomedicals).

2.3. Condiciones de cultivo

Los cultivos de levadura se inoculan en primer lugar en 5 ml del medio apropiado y se incuban durante la noche a 30°C y 200 rpm. Para obtener cultivos de mayor volumen, se inocula el 2% (o más) del precultivo en 50-200 ml de medio. Estos cultivos se incuban de nuevo a 30°C y 200 rpm.

Los experimentos de crecimiento se realizan en una placa de 96 pocillos o en una escala de Erlenmeyer. Para obtener colonias individuales como material de partida para los experimentos de crecimiento y producción, las cepas se siembran en placas SD CSM selectivas y se incuban durante 2-3 días a 30°C. A continuación, se elige una colonia y se transfiere a 5 ml de medio para los estudios en Erlenmeyer o a 1 ml de medio para los experimentos en placas de microtitulación.

Para los experimentos en Erlenmeyer, los precultivos se incuban durante la noche a 30°C y 200 rpm y se añade el 2% de estos precultivos a 100 ml de medio con el fin de iniciar los experimentos de crecimiento.

Para los experimentos de crecimiento en MTP (placas de microtitulación), se añaden colonias a 150 µl de medio y se incuban durante 24 horas a 30 °C. Después de la incubación, se añaden 2 pl de los precultivos de MTP a una MTP que contiene 150 µl de medio nuevo. La DO se mide cada quince minutos durante 48 horas con el Infinite® 200 ProTecan.

2.4. Metodología de muestreo

Se toman muestras tanto de la DO (0,2 ml) como de la fracción celular y sobrenadante (1 ml) del cultivo cada dos horas hasta la fase estacionaria y cada par de horas durante la fase estacionaria. La muestra de 1 ml es la primera centrífuga (11) después de lo cual el sedimento celular y el sobrenadante se separan y se almacenan por separado a

-20 °C. El sobrenadante se almacena para el análisis del producto extracelular mientras que los sedimentos se usan para el análisis de metabolitos intracelulares.

2.5. Procedimientos analíticos

La densidad celular del cultivo se supervisó frecuentemente midiendo la densidad óptica a 600 nm (espectrofotómetro Uvikom 922, BRS, Brussel, Bélgica) o con el lector de placa de microtitulación Biochrom Anthos Zenyth 340. El peso celular en seco se obtuvo por centrifugación (15 min, 5000 g, rotor GSA, Sorvall RC-5B, Goffin Meyvis, Kapellen, Bélgica) de 20 g de caldo de reactor en tubos falcon presecados y pesados. A continuación, los sedimentos se lavaron una vez con 20 ml de disolución fisiológica (9 g/l NaCl) y se secaron a 70 °C hasta un peso constante. Para poder convertir las mediciones de DO_{600nm} en concentraciones de biomasa, se realizó una curva de correlación de la DO_{600nm} con la concentración de biomasa. Las concentraciones de glucosa y ácidos orgánicos se determinaron en un sistema Varian Prostar HPLC (Varian, Sint-Katelijne-Waver, Bélgica) utilizando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Eke, Bélgica) calentada a 65 °C, equipada con una columna de 1 cm, utilizando H_2SO_4 5 mM (0,6 ml/min) como fase móvil. Para la detección de picos se utilizó un detector UV-VIS de doble onda (210 nm y 265 nm) (Varian Prostar 325) y un detector de índice de refracción diferencial (Merck LaChrom L-7490, Merck, Lovaina, Bélgica). Los picos se pudieron identificar mediante división de las absorciones de los picos en 265 y 210 nm. La división da como resultado un valor constante, típico para un determinado compuesto (fórmula de Beer-Lambert). Se midieron glucosa, fructosa, sacarosa, oligosacáridos y glucosa-1-fosfato mediante HPLC con una columna Hypercarb y se detectaron con un detector de MSMS (Antonio et al., 2007; Nielsen et al., 2006).

2.6. Procedimientos genéticos

Los procedimientos usados para la construcción de mutantes se describen a continuación.

Los plásmidos se mantuvieron en el huésped *E. coli* DH5 α , (F⁻, ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*LacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hdsR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

Plásmidos. El plásmido de expresión de levadura p2a_2p_Lac4 disponible en el *Laboratory of Industrial Biotechnology and Biocatalysis* se usó para permitir el crecimiento de *Saccharomyces* en lactosa como única fuente de C. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano para permitir la selección y mantenimiento en *E. coli*. El plásmido contiene además el ori de levadura 2 μ y el marcador de selección *Ura3* para la selección y mantenimiento en levaduras. Finalmente, el plásmido contiene un casete de expresión de β -galactosidasa (SEQ ID 9, figura 15).

Mutaciones. Las mutaciones consistieron en la introducción de plásmidos usando p2a_2p_Lac4 (descrito anteriormente) e inserción génica (KI) (KI en el locus de ADN_r) usando ADN lineal bicatenario (descrito anteriormente). Los transformantes se plaquearon en SD CSM-Ura después de la transformación con ADN plasmídico o en SD CSM-Ura con lactosa como única fuente de C después de la transformación con ADN lineal bicatenario. Los mutantes que portaban plásmidos seleccionados se verificaron por PCR con cebadores correspondientes a p2a_2p_Lac4. Los mutantes de inserción genómica seleccionados se verificaron por PCR con cebadores cadena arriba y cadena abajo de la región modificada y se confirmaron por secuenciación (realizada en LGC Genomics (grupo LGC, Alemania)).

ADN bicatenario lineal. Los amplicones de ADN_{bc} lineales se obtuvieron mediante PCR usando el plásmido pJet_KI_p1_Lac12_t@rDNA o pJet_KI_p2_Lac12_t@rDNA. Estos plásmidos contienen 2 regiones de homología de 500 pb (HR1 (SEQ ID 10, figura 16) y HR2 (SEQ ID 11, figura 17)) que flanquean la SEQ ID 7 y la SEQ ID 8, respectivamente, en el sitio de clonación múltiple del vector de clonación pJET (Thermoscientific). Los cebadores usados son homólogos al extremo 5' de HR1 (cebador directo) y al extremo 3' de HR2 (cebador inverso). Los productos de PCR se purificaron por PCR antes de la transformación.

Transformaciones. Los plásmidos y el ADN bicatenario lineal se transformaron usando el procedimiento Gietz (40).

3. Resultados

Ejemplo 1: Construcción de una inserción de *lacY* de lactosa permeasa de *E. coli* en el locus *agg*

En primer lugar, se construyó la cepa MG1655 Δ lacY según el procedimiento de Datsenko y Wanner tal como se ha descrito anteriormente. Para este fin, se transformó MG1655 con pKD46 y se construyó ADN lineal a partir de los plásmidos base pKD3 y pKD4 con homólogos flanqueantes al gen *lacY*. Las recombinaciones exitosas se cribaron después con los antibióticos apropiados. Para asegurar que no se podía absorber lactosa en esta cepa, la cepa se cultivó en un medio mínimo que contenía solo lactosa como fuente de carbono. No se observó crecimiento durante este experimento, por lo tanto esta célula ya no pudo transportar lactosa sobre su membrana.

Para construir adicionalmente un sistema de expresión sintético, se sintetizaron un promotor sintético y RBS en combinación con el gen *lacY* (encargado a IDT y Geneart). Esta secuencia se muestra en la figura 3. Esta secuencia también se introdujo en el genoma en el locus génico *agg* por medio de una adaptación de la metodología de Datsenko

y Wanner. Brevemente, el constructo de lactosa permeasa se ensambló en primer lugar con un casete de cribado del plásmido pKD3, dando como resultado un plásmido novedoso, pCX_{lacY}-kan. A partir de este plásmido pudo amplificarse ADN lineal por PCR con homologías con la región genómica *agp*. Este ADN lineal obtenido puede transformarse entonces en un *E. coli* MG1655Δ*lacY* en el que está presente el plásmido pKD46. Esto da lugar a la recombinación del casete de expresión del transportador de lactosa en el genoma, dando como resultado un organismo de expresión de lactosa permeasa MG1655Δ*lacY*Δ*agp*::*lacY*_{sintético}. Para asegurar que se restauraba el crecimiento en lactosa, esta cepa se cultivó en un medio mínimo de lactosa tal como se ha descrito anteriormente. Esto dio como resultado la restauración completa del crecimiento en lactosa, con una tasa de crecimiento similar al tipo silvestre.

Ejemplo 2: Efecto de la lactosa sobre la cepa de *E. coli* de tipo silvestre y una cepa de *E. coli* mutante que no experimenta destrucción por lactosa

Se preparó un experimento en matraz de agitación tal como se describe en materiales y procedimientos con la MG1655 de tipo silvestre y MG1655Δ*lacY*Δ*agp*::*lacY*_{sintético}. Estas cepas se cultivaron en un medio de matraz en agitación de glicerol (15 g/l de glicerol, tal como se describe en materiales y procedimientos) y se añadió lactosa (solución madre de 200 g/l, dando como resultado una concentración final de 10 g/l) a la fase exponencial media (aproximadamente a DO 0,8). Como puede observarse en la figura 1 y la figura 2, la cepa mutante no sufre destrucción por lactosa.

Ejemplo 3: Uso de acoplamiento traduccional o sensores traduccionales para asegurar la expresión del transportador de lactosa

Debido a que una cepa completa inactivada en lactosa permeasa tampoco sufriría destrucción por lactosa y el objetivo es obtener una lactosa permeasa expresada, activa, funcional, se necesita un cribado para garantizar la expresión de la lactosa permeasa. Para este fin, se pueden crear variantes de secuencia de promotores, sitios de unión a ribosoma, secuencias de Kozak, uso de codones y terminadores de transcripción. Sin embargo, estas variantes de secuencia pueden dar lugar a constructos de expresión nula, dando lugar, por lo tanto, a cepas mutantes negativas en transportador de lactosa. Por lo tanto, es necesario diseñar un sistema para detectar la expresión del transportador de lactosa, preferentemente mediante un gen indicador fácil de cribar tal como *LacZ*, proteínas fluorescentes o genes de resistencia a antibióticos.

Construcción de un sistema de acoplamiento traduccional que reinicia la traducción del gen indicador para detectar la expresión del transportador de lactosa

Dos genes pueden acoplarse traduccionalmente introduciendo una región de reiniciación de la traducción 3' del gen de interés y 5' del gen indicador. La traducción puede reiniciarse mediante diversos codones, tales como AUG, UUG, GUG o AUA (63). La secuencia de dicho constructo, que acopla el gen del gen de lactosa permeasa y el gen *lacZ* traduccionalmente se muestra en la figura 4. Para crear esta secuencia, las secuencias de *lacY* y *LacZ* se amplifican a partir del genoma de *E. coli* con cebadores con sitios de restricción de Golden Gate (BsaI, obtenidos de NEB). La región intergénica que permite el acoplamiento traduccional puede encargarse a cualquier empresa de síntesis génica, tal como IDT o Geneart. Todas las piezas se ensamblan a continuación mediante el procedimiento Golden Gate tal como se describe por Engler *et al.* (2013) (36) en un plásmido pUC54 junto con un promotor y una secuencia RBS tal como se muestra en la figura 3 (para *E. coli*) o en pGK12 que se replica en *Bacillus* sp. con un promotor de *Bacillus* y un sitio de unión a ribosoma.

Construcción de un sistema de acoplamiento traduccional que inicia la traducción del gen indicador para detectar la expresión del transportador de lactosa mediante la apertura de un bucle en el sitio de unión a ribosoma

Un segundo procedimiento para cribar la expresión a través del acoplamiento traduccional se describe por Mendez-Perez *et al.* (2012) (58). Este procedimiento se adaptó para el cribado de la expresión de lactosa permeasa con un gen indicador de cloranfenicol. En este caso, el transportador de lactosa *lacY* se acopla a través de una etiqueta HIS y un sitio de unión al ribosoma al gen de resistencia al cloranfenicol. Las partes de secuencia para este constructo también se encargan a IDT o Geneart y se ensamblan mediante ensamblaje de Golden Gate. La secuencia resultante se proporciona en la figura 5.

Construcción de un sistema de acoplamiento traduccional que acopla el transportador de lactosa de levadura con un gen indicador

Aunque las levaduras no usan cistrones, todavía es posible cribar la expresión mediante acoplamiento traduccional mediante sitios de entrada ribosómica internos víricos (denominados secuencias IRES) (56). Un ejemplo de tal secuencia es la secuencia T2A (10), que permite la traducción totalmente independiente (lo que significa no como una fusión de proteínas), pero acoplada, de dos proteínas en un cistron. Esto significa que si se expresa la última proteína del cistron, también se expresa la primera proteína.

En levaduras, el gen de la lactosa permeasa de, por ejemplo, *Kluyveromyces marxianus* se puede usar para transportar lactosa en la célula. Este gen puede acoplarse con la secuencia T2A al gen *aph1*, que codifica resistencia a genética. Esta secuencia se construye de forma análoga a la descrita anteriormente. La secuencia final se proporciona en la figura 6.

Construcción de un sistema de acoplamiento de aptámeros que introduce un aptámero en el ARN mensajero de la lactosa permeasa

La expresión de la lactosa permeasa también se puede detectar a nivel de ARN mensajero. Para este fin, se clona un aptámero de unión a (Z)-4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona después de la secuencia codificante de lactosa permeasa tal como se muestra en la figura 7. La expresión de este constructo se modula adicionalmente tal como se describe en el ejemplo 6. Después del crecimiento de las células, se añade (Z)-4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden)-1,2-dimetil-1H-imidazol-5(4H)-ona al medio tal como se describe por Pothoulakis *et al* (2013) (64) y las cepas mutantes que expresan lactosa permeasa se seleccionan mediante un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS).

Ejemplo 4: Detección de la expresión de un transportador de lactosa acoplado traduccionalmente con un gen de resistencia a cloranfenicol

Se construyeron dos cepas en las que la lactosa permeasa se suprimió del genoma. En ambas cepas se transformó un plásmido pSC101 que contenía un gen de resistencia a kanamicina, con la diferencia de que uno de los plásmidos contenía una lactosa permeasa expresada constitutivamente tal como se describe en los ejemplos 1 y 2, dando como resultado una cepa de referencia MG1655AlacY pSC101_kan y la cepa acoplada traduccionalmente a lacY_cat MG1655ΔlacY pSC101_kan_lacY_{sintético}_cat tal como se describe en el ejemplo 4 y la figura 5. Ambas cepas se cultivaron en un medio mínimo tal como se ha descrito anteriormente a diferentes concentraciones de cloranfenicol (entre 0 y 30 mg/l). Las figuras 8 y 9 muestran después de 48 y 92 horas de crecimiento que el crecimiento de la cepa de referencia se inhibe a una concentración de cloranfenicol más baja que la cepa acoplada traduccionalmente a lacY_cat mutante, lo que hace de dicho sistema un excelente cribado para constructos genéticos que expresan lactosa permeasa.

Ejemplo 5: Procedimiento de cribado para mutantes que expresan lactosa permeasa que no sufren destrucción por lactosa

De forma similar al ejemplo 2, se cultivó una mezcla de dos cepas resistentes al cloranfenicol, una cepa que no experimenta destrucción por lactosa y está acoplada traduccionalmente al cloranfenicol y una cepa con el casete del cloranfenicol pero con el sistema de expresión natural de la lactosa permeasa. Ambas cepas se cultivaron en el medio tal como se describe en el ejemplo 2 y se añadió lactosa en fase exponencial media tal como se muestra en el ejemplo 2. La cepa mutante que no experimenta destrucción por lactosa se mantuvo en crecimiento mientras que la otra cepa, que es sensible a la destrucción por lactosa, dejó de crecer. Al final de la fase exponencial, se inocularon 0,1 ml de este cultivo en un segundo matraz de agitación con un medio similar al descrito anteriormente. De nuevo, a DO 0,8 se añadió lactosa, deteniendo el crecimiento de la cepa sensible a la destrucción por lactosa y enriqueciendo adicionalmente la cepa mutante que no sufre destrucción por lactosa. Después de 5 repeticiones de este procedimiento se obtuvo un enriquecimiento del 99% de la cepa mutante que no sufría destrucción por lactosa, que después se aisló fácilmente del cultivo.

Ejemplo 6: Creación de mutantes de casetes de expresión de lactosa permeasa

Las variantes de promotores, sitios de unión a ribosomas, secuencias de Kozak, terminadores de la transcripción y variantes de genes de lactosa permeasa (con diferentes usos de codones) se encargan a proveedores de síntesis génica tales como IDT, Geneart, Genscript, Gen9,... El diseño de una biblioteca de promotores para bacterias se basa en la secuencia consenso de promotores bacterianos, con dos regiones conservadas a -10 y -35 pb del inicio de la transcripción. Las bases intermedias, anteriores y posteriores a estas regiones conservadas se varían entonces aleatoriamente con A, T, G o C, dando lugar a promotores con diferentes fuerzas de expresión. Alternativamente, las regiones conservadas se varían y la secuencia circundante se mantiene fija, lo que también da lugar a promotores con diferentes fuerzas. Estas mezclas de secuencias se clonan a continuación (a través de ensamblaje de Gibson, ensamblaje de Golden Gate, ensamblaje de Cliva, LCR o ligación de restricción) (25, 36, 50, 79) delante de una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente, dando lugar a una biblioteca de casetes de expresión de lactosa permeasa que se puede cribar por medio del protocolo de cribado descrito en el ejemplo 5.

Se crea una biblioteca de promotores eucariotas basándose en un promotor central (13). Para *Saccharomyces cerevisiae* este promotor puede ser un promotor de TEF heterólogo pTEF1 que se potencia con secuencias UAS y se muta para variar la fuerza del promotor (12). Dicho promotor se encarga y se clona tal como se ha descrito anteriormente delante de una lactosa permeasa acoplada traduccionalmente y el constructo final se transforma en una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* en un plásmido o para integración en un cromosoma.

La región no traducida consiste en procariotas de un sitio de unión a ribosomas y en eucariotas de una secuencia de Kozak. Ambas secuencias se distribuyen aleatoriamente y se clonan delante de la secuencia codificante tal como se ha descrito anteriormente, lo que da lugar a una biblioteca de casetes de expresión con diferentes eficacias traduccionales. La aleatorización puede racionalizarse con herramientas tales como el calculador de RBS que calcula la correlación de la eficacia de traducción de secuencia, y reduciendo el número de variantes que tienen que incluirse en la biblioteca (67).

El uso de codones se cambia por medio del cambio de la secuencia codificante del gen sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esto se denomina adaptación de codones. Los usos de codones a través de la secuencia de codones se cambian de tal manera que se introducen codones más o menos raros en determinadas regiones, lo que da lugar a eficacias de expresión y eficacias de plegamiento alteradas. Una permeasa con solo codones raros en su secuencia (determinada sobre una base de organismos por medio de la base de datos de uso de codones (61)) muestra tasas de traducción más bajas que permeasas con una secuencia completamente optimizada por codones (con solo codones con alta aparición en el organismo diana). Además, los primeros codones de la secuencia codificante también influyen en la eficacia de Kozak o del sitio de unión a ribosoma (62, 69, 78).

La región terminadora de la transcripción se varía por medio de secuencias terminadoras de la transcripción endógenas o exógenas que se encuentran en la base de datos (18, 26). Estos terminadores de la transcripción también se clonan de forma similar al procedimiento descrito anteriormente.

Ejemplo 7: Enriquecimiento de casetes de expresión que expresan lactosa permeasa y no dan lugar a la destrucción por lactosa

Los casetes de expresión se crean según los ejemplos 3 y 7. Esto da lugar a una biblioteca de casetes de expresión de lactosa permeasa. Los casetes de expresión que dan como resultado la expresión de lactosa permeasa se seleccionan según los procedimientos de los ejemplos 3 y 4. Los casetes de expresión, la expresión de la lactosa permeasa, que no dan lugar a la destrucción por lactosa, se seleccionan según los procedimientos descritos en los ejemplos 2 y 5. Los casetes de expresión seleccionados se analizan adicionalmente mediante secuenciación y mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Ejemplo 8: Producción fermentativa de 2-fucosil-lactosa con una fucosiltransferasa que se origina a partir de *Helicobacter pylori* con *E. coli*

La cepa mutante en la que los genes *acZ*, *glgC*, *agp*, *pfkA*, *pfkB*, *pgi*, *arcA*, *iclR*, *wcaJ* se inactivan y *lacY* se expresó mediante expresión constitutiva tal como se describe en el ejemplo 1 y el ejemplo 2 para asegurar la expresión en todas las condiciones de cultivo, se transformó adicionalmente con una fucosiltransferasa que se origina a partir de *Helicobacter pylori* y una sacarosa fosforilasa que se origina a partir de *Bifidobacterium adolescentis*, que también se expresaron constitutivamente. Los promotores constitutivos proceden de la biblioteca de promotores descrita por De Mey *et al.* 2007. Esta cepa se cultivó en un medio tal como se describe en materiales y procedimientos, pero con 30 g/l de sacarosa y 50 g/l de lactosa. Esto dio como resultado la formación de hasta 1,5 g/l de 2'-fucosil-lactosa.

Ejemplo 9: Producción por lotes alimentados de 2-fucosil-lactosa con *E. coli*

Se construyó una cepa mutante mediante las metodologías de ingeniería genética descritas anteriormente con el siguiente genotipo:

$\Delta lacZYA \Delta glgC \Delta agp \Delta pgi \Delta pfkA$ -P22-*baSP* $\Delta pfkB \Delta arcA \Delta iclR$::*sl* $\Delta wcaJ \Delta lon \Delta adhE$ -P14-*frk* + pCXP14-FT_*H. pylori* (un vector con la secuencia SEQ ID N° 6, véase la figura 10) con la expresión de lactosa permeasa alterada tal como se describe en el ejemplo 1 y el ejemplo 2. El promotor P22 y P14 se origina a partir de la biblioteca de promotores construida por De Mey *et al.* (29) y se clonó de forma similar a la metodología descrita por Aerts *et al.* (1). "::*sl*" marca una supresión génica sin cicatriz, por lo tanto sin un sitio FRT que permanece en el cromosoma.

Esta cepa se cultivó en un biorreactor tal como se ha descrito anteriormente en materiales y procedimientos, en el medio mineral con 30 g/l de sacarosa y 50 g/l de lactosa. Después de la fase de lote, el biorreactor se alimentó con 500 g/l de sacarosa, 50 g/l de lactosa y 1 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado. Esto dio lugar a la acumulación de 27,5 g/l de fucosil-lactosa en el sobrenadante.

Ejemplo 10: Producción de lactoMtriosa con *E. coli*

Se construyó una cepa mutante mediante ingeniería genética con las metodologías descritas anteriormente de expresión de una UDP-N-acetilglucosamina transferasa, una sacarosa fosforilasa y una L-glutamina:D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa y una glucosamina uridiltransferasa en un plásmido pBR322 con, en cada caso, un promotor constitutivo de la biblioteca de promotores de De Mey *et al.* (29) y con un marcador de selección de beta-lactamasa. Este vector se transformó en una cepa de *E. coli* mutante con genotipo $\Delta LacZYA \Delta glgC \Delta agp$::P14-*frk*-P22-*BaSP* $\Delta pgi \Delta pfkA \Delta pfkB \Delta nagABCDE \Delta manA \Delta nanA$ TEK $\Delta manXYZ$ que expresa lactosa permeasa constitutivamente tal como se ha descrito anteriormente. Esta cepa se cultivó en un matraz en agitación tal como se ha descrito

anteriormente con lactosa y sacarosa como fuentes de carbono, con o sin glicerol adicional. Este huésped de producción no sufrió destrucción de lactosa y produjo 62,5 y 55,3 mg/l de lactoNtriosa, respectivamente, a partir de la lactosa añadida.

5 Ejemplo 11: Construcción de una inserción de lactosa permeasa de levadura *K. marxianus* (p1) en el locus de ADNr.

En primer lugar, se usó el plásmido p2a_2p_Lac4 para transformar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo silvestre BY4742. La transformación se realizó usando un total de 4 µg de plásmido usando el protocolo de Gietz (40). Las células de levadura transformadas se sembraron en placas con SD-CSM *drop-out* (sin uracilo). Después de dos días, se observó crecimiento en las placas y se analizó la presencia del plásmido deseado en las colonias de levadura. La PCR de colonias se llevó a cabo en las 33 colonias. Todas las colonias dieron positivo en cuanto a la presencia del plásmido p2a_2p_Lac4. La colonia 5 se seleccionó para su uso posterior. Esta colonia se transformó con 2 µg de ADN lineal bicatenario obtenido de pJet_KI_p1_Lac12_t@rDNA. Las células transformadas se sembraron en placas SD-CSM-Ura con lactosa como única fuente de C. Tres días después de la transformación, se hicieron crecer varias colonias suficientemente para analizar la presencia del casete de expresión *Lac12* en el ADNr de *Saccharomyces*. La PCR de colonias se llevó a cabo en todas las colonias. Todas las colonias dieron positivo en cuanto a la presencia del casete de expresión *Lac12*. La colonia 6 se seleccionó para su uso posterior (*Saccharomyces* KI_p1_Lac12_t@rDNA).

20 Ejemplo 12: Construcción de una inserción de lactosa permeasa de levadura *K. marxianus* (p2) en el locus de ADNr.

En primer lugar, se usó el plásmido p2a_2p_Lac4 para transformar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo silvestre BY4742. La transformación se realizó usando un total de 4 µg de plásmido usando el protocolo de Gietz (40). Las células de levadura transformadas se sembraron en placas con SD-CSM *drop-out* (sin uracilo). Después de dos días, se observó crecimiento en las placas y se analizó la presencia del plásmido deseado en las colonias de levadura. La PCR de colonias se llevó a cabo en las 33 colonias. Todas las colonias dieron positivo en cuanto a la presencia del plásmido p2a_2p_Lac4. La colonia 5 se seleccionó para su uso posterior. Esta colonia se transformó con 2 µg de ADN lineal bicatenario obtenido de pJet_KLp2_Lac12_t@rDNA. Las células transformadas se sembraron en placas SD-CSM-Ura con lactosa como única fuente de C. Tres días después de la transformación, se hicieron crecer varias colonias suficientemente para analizar la presencia del casete de expresión *Lac12* en el ADNr de *Saccharomyces*. La PCR de colonias se llevó a cabo en todas las colonias. Todas las colonias dieron positivo en cuanto a la presencia del casete de expresión *Lac12*. La colonia 7 se seleccionó para su uso posterior (*Saccharomyces* KI_p2_Lac12_t@rDNA).

35 Ejemplo 13: Crecimiento en lactosa de una cepa de levadura de tipo silvestre y 2 cepas de levadura mutantes

Se preparó un experimento en matraz en agitación tal como se describe en los materiales y procedimientos con *Kluyveromyces* de tipo silvestre, *Saccharomyces* KI_p1_Lac12_t@rDNA y *Saccharomyces* KI_p2_Lac12_t@rDNA. Estas cepas se cultivaron en un medio de matraz en agitación que contenía lactosa como única fuente de C (20 g/l). Como se puede observar en la tabla 1, las cepas de *Saccharomyces* mutantes crecen tan rápido como la *Kluyveromyces marxianus lactis* de tipo silvestre, que es conocida por el rápido crecimiento sobre lactosa (31). La lactosa permeasa expresada constitutivamente asegura así un influjo rápido y eficaz de lactosa en la célula de levadura.

45 Tabla 1

Cepa	µ _{máx}
<i>Kluyveromyces marxianus lactis</i>	0,14
<i>Saccharomyces</i> KI_p1_Lac12_t@rDNA	0,18
<i>Saccharomyces</i> KI_p2_Lac12_t@rDNA	0,18

50 Ejemplo 14: El efecto de la lactosa sobre la cepa de levadura de tipo silvestre y las cepas de levadura mutantes que no sufren destrucción por lactosa

Se preparó un experimento en matraz en agitación tal como se describe en los materiales y procedimientos con *Kluyveromyces* de tipo silvestre, *Saccharomyces* KI_p1_Lac12_t@rDNA y *Saccharomyces* KI_p2_Lac12_t@rDNA. Estas cepas se cultivaron en un medio de matraz en agitación de glucosa (20 g/l de glucosa, tal como se describe en materiales y procedimientos) y se añadió lactosa (solución madre de 200 g/l, dando como resultado una concentración final de 10 g/l) a la fase exponencial media. Como puede observarse en la figura 11 y la figura 12, las cepas mutantes no sufren destrucción por lactosa. Sin embargo, en el ejemplo 13 se demostró un influjo rápido y eficaz de lactosa en estas células de levadura.

60 Ejemplo 15: Secuenciación de casetes de expresión de lactosa permeasa que no sufren destrucción de lactosa

Se secuenciaron 46 colonias que se originaron del cribado descrito anteriormente, dando como resultado las SEQ ID N° 12-57 (figura 18). Estas secuencias son promotores y variantes de RBS que no dan como resultado la destrucción por lactosa cuando se expresan en *E. coli*. Obsérvese que esta es una selección de una enorme cantidad de colonias que se han secuenciado, por lo tanto, la metodología de cribado ha dado como resultado muchas más secuencias que las mostradas en la figura 18 y metodologías de creación de bibliotecas alternativas tal como se ha descrito anteriormente también darán lugar a otras secuencias distintas de las mostradas en la figura 18.

Ejemplo 16: Determinación de μ_{MAX} de las cepas mutantes del casete de expresión de lactosa permeasa

Todas las cepas se iniciaron a partir de una placa de agar LB o se iniciaron a partir de criovial y se inocularon en 5,0 ml de medio de caldo Luria (10 g de tripton; 5 g de extracto de levadura; 10 g de NaCl). Después de cultivar durante toda la noche a 37°C, se añadió 1 ml de este precultivo a un matraz agitador de 500 ml que contenía 100 ml de medio de lactosa mínimo (2,0 g/l de NH_4Cl ; 5,0 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 g/l de KH_2PO_4 ; 7,3 g/l de K_2HPO_4 ; 8,4 g/l de MOPS; 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/l de NaCl; 10 g/l de lactosa; 0,4 mg/l de $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,03 mg/l de H_3BO_3 ; 1,01 mg/l de tiamina HCl; 0,94 mg/l de ZnCl_2 ; 0,5 mg/l de $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,38 mg/l de $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1,59 mg/l de $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 3,6 mg/l de CaCl_2 y 0,096 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0. Después de cultivar durante toda la noche a 37°C, ambos precultivos se diluyeron con medio de lactosa mínimo hasta una DO_{600} de 0,050. La suspensión se transfirió después a una placa de 96 MTP ($n=32$), cubierta por una cubierta de sello fácil. Las mediciones de DO se realizaron cada 10 minutos durante 24 horas usando el Infinite M200 pro (TECAN) en las siguientes condiciones: Temperatura: 37 °C $\pm$ 0,5; agitación 597 segundos; amplitud de agitación 2 mm; 280 rpm; longitud de onda DO_{600} ; Flash#10; tiempo de sedimentación 150 ms).

Ejemplo 17: Caracterización de casetes de expresión de lactosa permeasa

Un procedimiento para reducir o eliminar la destrucción por lactosa es reducir o eliminar significativamente la actividad de la lactosa permeasa (véase el ejemplo 16). Sin embargo, a la luz de la producción de bioproductos basados en lactosa o galactosa, se requiere un alto influjo de lactosa en la célula. A este respecto se prueba que el influjo de lactosa de las cepas mutantes resistentes a la destrucción por lactosa es todavía comparable, igual o incluso mayor que el influjo de lactosa del organismo de tipo silvestre que sufre destrucción por lactosa. Para este fin, los nuevos casetes de expresión de lactosa permeasa se introdujeron en una cepa MG1655 ΔlacY , que todavía expresa beta-galactosidasa. La velocidad de crecimiento de estas nuevas cepas es una medida para el influjo de lactosa, porque cualquier cepa que tenga una expresión significativamente reducida en la expresión de lactosa permeasa tendrá una velocidad de crecimiento significativamente reducida.

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 19. Casi todas las cepas mostradas en esta figura tienen una tasa de crecimiento igual o superior al tipo silvestre, lo que indica una actividad de lactosa permeasa y una expresión que es igual o superior al tipo silvestre, sin embargo, en contraste con el sistema de expresión de tipo silvestre, estos casetes de expresión no dan como resultado la destrucción por lactosa. Sin embargo, este procedimiento está limitado por la expresión del gen de beta galactosidasa que se convierte en la etapa limitante de la velocidad para el crecimiento. Por lo tanto, la expresión del gen de la lactosa permeasa se midió a través del sistema de acoplamiento traduccional descrito anteriormente. La concentración de inhibición mínima (MIC) para cloranfenicol es indicativa de la expresión del gen de la lactosa permeasa y esto se determinó para cada uno de los casetes. La MIC más baja que todavía dio como resultado la misma tasa de crecimiento en comparación con el tipo silvestre se usó como un indicador para la expresión de la expresión de la lactosa permeasa de tipo silvestre.

Los casetes con la MIC más baja que tienen la misma tasa de crecimiento que la cepa de tipo silvestre tienen una MIC de aproximadamente 20 mg/l de cloranfenicol. Las cepas mutantes con una tasa de crecimiento ligeramente inferior tienen una MIC que varía entre 15 y 20 mg/l y las cepas mutantes con una tasa de crecimiento igual o superior tienen una MIC entre 20 y 80 mg/l. El 85% de las secuencias entran dentro de la última categoría, lo que significa que la mayor parte de las secuencias que se identificaron como casetes de expresión negativos a la destrucción por lactosa tienen una expresión de lactosa permeasa más alta, al contrario de lo que se ha descrito previamente en la literatura.

Ejemplo 18: Construcción de un casete de expresión del promotor lacIq

De forma similar a la metodología descrita anteriormente, se clonó un promotor placIQ delante del gen lacY de *E. coli*. La secuencia final de este constructo se muestra en la figura 20.

Ejemplo 19: Otros promotores usados en la técnica que experimentan destrucción por lactosa

El promotor placIQ es un promotor que se ha usado en la técnica para la expresión de lactosa permeasa en *E. coli*. El uso de este promotor dio como resultado la absorción de lactosa en la célula. Sin embargo, no se analizó el efecto de dicha absorción. La velocidad de crecimiento en lactosa del tipo silvestre no fue significativamente diferente del promotor lacIq (μ_{MAX} de 0,1 y 0,11 h^{-1} respectivamente), lo que indica, por lo tanto, una tasa de absorción de lactosa similar. Un cribado de destrucción por lactosa de este casete de expresión de lacIQ demostró que este promotor también daba lugar a destrucción por lactosa (véase la figura 21). Esto prueba que hay secuencias de promotor específicas que dan lugar a la destrucción por lactosa y otras secuencias que no dan lugar a la destrucción de la

lactosa. La racionalización de las secuencias no es posible y el ensayo y error de secuencias individuales es un trabajo laborioso que daría lugar a enormes costes, por lo tanto la metodología descrita anteriormente para identificar los casetes de expresión que no sufren destrucción con lactosa es la forma perfecta de evitar trabajos de cribado largos y costosos.

Ejemplo 20: Producción de lactoNtetraosa con *S. cerevisiae*

Las cepas mutantes construidas en los ejemplos 11 y 12 se transformaron adicionalmente con una β -1,4-galactosiltransferasa y una β 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa que se originan a partir de *Neisseria meningitidis*, que también se expresaron constitutivamente, utilizando un vector de expresión de levadura estándar, por ejemplo tal como se describe por Lee *et al.* (52). Las cepas se cultivaron en un medio tal como se describe en materiales y procedimientos, pero con 20 g/l de sacarosa y 20 g/l de lactosa. Esto dio como resultado la formación de hasta 30 mg/l de lactoNtetraosa.

Ejemplo 21: Producción de 2-fucosil-lactosa con *S. cerevisiae*

Las cepas mutantes construidas en los ejemplos 11 y 12 se transformaron adicionalmente con una GDP-fucosa sintasa y una GDP-manosa 4,6-deshidratasa de *E. coli* y una fucosiltransferasa que se origina a partir de *Helicobacter pylori*, que también se expresaron constitutivamente, utilizando un vector de expresión de levadura estándar, por ejemplo tal como se describe por Lee *et al.* (52). Las cepas se cultivaron en un medio tal como se describe en materiales y procedimientos, pero con 20 g/l de sacarosa y 20 g/l de lactosa. Esto dio como resultado la formación de hasta 10 mg/l de 2 fucosil-lactosa.

Referencias

1. Aerts, D., T. Verhaeghe, M. De Mey, T. Desmet y W. Soetaert. 2010. A constitutive expression system for high throughput screening. *Engineering in Life Sciences* 10:DOI: 10.1002/elsc.201000065.
2. Agrawal, N., P. V. N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar y S. K. Mukherjee. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:657-685.
3. Alper, H., C. Fischer, E. Nevoigt y G. Stephanopoulos. 2005. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 102:12678-12683.
4. Avihoo, A., I. Gabdank, M. Shapira y D. Barash. 2007. In silico design of small RNA switches. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 6:4-11.
5. Ayres, E. K., V. J. Thomson, G. Merino, D. Balderes y D. H. Figurski. 1993. Precise deletions in large bacterial genomes by Vector-mediated Excision (VEX) : The *trfA* gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several gram-negative hosts. *Journal of Molecular Biology* 230:174-185.
6. Balbás, P., M. Alexeyev, I. Shokolenko, F. Bolivar y F. Valle. 1996. A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome. *Gene* 172:65-69.
7. Balbas, P. y G. Gosset. 2001. Chromosomal editing in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology* 19:1-12.
8. Barrett, A. R., Y. Kang, K. S. Inamasu, M. S. Son, J. M. Vukovich y T. T. Hoang. 2008. Genetic tools for allelic replacement in *Burkholderia* species. *Applied and Environmental Microbiology* 74:4498-4508.
9. Beauprez, J. 2010. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* for succinate production. PhD. Universidad de Gante, Gante.
10. Beekwilder, J., H. M. van Rossum, F. Koopman, F. Sonntag, M. Buchhaupt, J. Schrader, R. D. Hall, D. Bosch, J. T. Pronk, A. J. A. van Maris y J.-M. Daran. 2014. Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production.
11. Biofuge, H. Thermo.
12. Blazeck, J., R. Garg, B. Reed y H. S. Alper. 2012. Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters. *Biotechnology And Bioengineering* 109:2884-2895.
13. Blount, B. A., T. Weenink, S. Vasylechko y T. Ellis. 2012. Rational Diversification of a Promoter Providing Fine-Tuned Expression and Orthogonal Regulation for Synthetic Biology. *PLoS ONE* 7:e33279.

14. Bode, L. 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22:1147-1162.
15. Bode, L. 2006. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *The Journal of Nutrition* 136:2127-2130.
16. Base de datos Brenda 2006, fecha de registro [En línea.]
17. Cabantous, S., T. C. Terwilliger y G. S. Waldo. 2005. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotech* 23:102-107.
18. Cambray, G., J. C. Guimaraes, V. K. Mutalik, C. Lam, Q.-A. Mai, T. Thimmaiah, J. M. Carothers, A. P. Arkin y D. Endy. 2013. Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators. *Nucleic Acids Research* 41:5139-5148.
19. Canton, B., A. Labno y D. Endy. 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotech* 26:787-793.
20. Caspi, R., T. Altman, R. Billington, K. Dreher, H. Foerster, C. A. Fulcher, T. A. Holland, I. M. Keseler, A. Kothari, A. Kubo, M. Krummenacker, M. Latendresse, L. A. Mueller, Q. Ong, S. Paley, P. Subhraveti, D. S. Weaver, D. Weerasinghe, P. Zhang y P. D. Karp. 2014. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* 42:D459-D471.
21. Chen, X. y A. Varki. 2009. Advances in the Biology and Chemistry of Sialic Acids. *ACS Chemical Biology* 5:163-176.
22. Cherepanov, P. P. y W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14.
23. Consortium, T. U. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* 43:D204-D212.
24. Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi y O. Gabrielli. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease* 38:5291-5294.
25. Coussement, P., J. Maertens, J. Beauprez, W. Van Bellegem y M. De Mey. 2014. One step DNA assembly for combinatorial metabolic engineering, p. 70-77, vol. 23.
26. Curran, K. A., A. S. Karim, A. Gupta y H. S. Alper. 2013. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications, p. 88-97, vol. 19.
27. Datsenko, K. A. y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 97:6640-6645.
28. Davis, S. S. 1997. Biomedical applications of nanotechnology - implications for drug targeting and gene therapy. *Trends in Biotechnology* 15:217-224.
29. De Mey, M., J. Maertens, G. J. Lequeux, W. K. Soetaert y E. J. Vandamme. 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *BMC Biotechnology* 7:34-48.
30. DiCarlo, J. E., J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach y G. M. Church. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*.
31. Drozdíková, E., M. Garaiová, Z. Csáky, M. Obernauerová y I. Hapala. 2015. Production of squalene by lactose-fermenting yeast *Kluyveromyces lactis* with reduced squalene epoxidase activity. *Letters in Applied Microbiology* 61:77-84.
32. Dumon, C., B. Priem, S. L. Martin, A. Heyraud, C. Bosso y E. Samain. 2001. In vivo fucosylation of lactoN-neotetraose and lactoN-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* α -1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconjugate Journal* 18:465-474.
33. Dykhuizen, D. y D. Hartl. 1978. Transport by the lactose permease of *Escherichia coli* as the basis of lactose killing. *Journal of Bacteriology* 135:876-882.
34. Eames, M. y T. Kortemme. 2012. Cost-Benefit Tradeoffs in Engineered lac Operons. *Science* 336:911-915.

35. Edwards, J. S., R. Ramakrishna, C. H. Schilling y B. O. Palsson. 1999. Metabolic flux balance analysis. *Metabolic Engineering*:13 - 57.
- 5 36. Engler, C., R. Gruetzner, R. Kandzia y S. Marillonnet. 2009. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. *PLoS ONE* 4:e5553.
37. Filonov, G. S., J. D. Moon, N. Svensen y S. R. Jaffrey. 2014. Broccoli: Rapid Selection of an RNA Mimic of Green Fluorescent Protein by Fluorescence-Based Selection and Directed Evolution. *Journal of the American Chemical Society*.
- 10 38. Galperin, M. Y. y G. R. Cochrane. 2009. Nucleic Acids Research annual Database Issue and the NAR online Molecular Biology Database Collection in 2009. *Nucleic Acid Research* 37:D1-4.
- 15 39. Ghazi, A., H. Therisod y E. Shechter. 1983. Comparison of lactose uptake in resting and energized *Escherichia coli* cells: high rates of respiration inactivate the lac carrier. *Journal of Bacteriology* 154:92-103.
40. Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems y R. A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-360.
- 20 41. Hammer, K., I. Mijakovic y P. R. Jensen. 2006. Synthetic promoter libraries - tuning of gene expression. *TRENDS in Biotechnology* 24:53-55.
42. Hanahan, D., J. Jessee y F. R. Bloom. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* 204:63-113.
- 25 43. Hebert, C. G., J. J. Valdes y W. E. Bentley. 2008. Beyond silencing -- engineering applications of RNA interference and antisense technology for altering cellular phenotype. *Current opinion in biotechnology* 19:500-505.
- 30 44. Heinemann, M., A. Kummel, R. Ruinatscha y S. Panke. 2005. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Staphylococcus aureus* metabolic network. *Biotechnol Bioeng* 92:850 - 864.
- 35 45. Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma y H. P. Schweizer. 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77-86.
- 40 46. Jiang, W., D. Bikard, D. Cox, F. Zhang y L. A. Marraffini. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotech* 31:233-239.
47. Kanehisa, M., M. Araki, S. Goto, M. Hattori, M. Hirakawa, M. Itoh, T. Katayama, S. Kawashima, S. Okuda, T. Tokimatsu y Y. Yamanishi. 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acid Research* 36:D480-484.
- 45 48. Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata y A. Ozaki. 1998. Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria. *Nat Biotech* 16:847-850.
49. Kojima, K. K., T. Matsumoto y H. Fujiwara. 2005. Eukaryotic Translational Coupling in UAAUG Stop-Start Codons for the Bicistronic RNA Translation of the Non-Long Terminal Repeat Retrotransposon SART1. *Molecular and Cellular Biology* 25:7675-7686.
- 50 50. Kok, S. d., L. H. Stanton, T. Slaby, M. Durot, V. F. Holmes, K. G. Patel, D. Platt, E. B. Shapland, Z. Serber, J. Dean, J. D. Newman y S. S. Chandran. 2014. Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction. *ACS Synthetic Biology* 3:97-106.
- 55 51. Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin y V. De Lorenzo. 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *Journal of Bacteriology* 177:52-58.
- 60 52. Lee, M. E., W. C. DeLoache, B. Cervantes y J. E. Dueber. 2015. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synthetic Biology* 4:975-986.
53. Levin-Karp, A., U. Barenholz, T. Bareia, M. Dayagi, L. Zelcbuch, N. Antonovsky, E. Noor y R. Milo. 2013. Quantifying Translational Coupling in *E. coli* Synthetic Operons Using RBS Modulation and Fluorescent Reporters. *ACS Synthetic Biology* 2:327-336.
- 65

54. Llaneras, F. y J. Picó. 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105:1-11.
55. Lodi, T. y C. Donnini. 2005. Lactose-induced cell death of β -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 5:727-734.
56. Martin, P., D. Albagli, M. Poggi, K. Boulukos y P. Pognonec. 2006. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. *BMC Biotechnology* 6:4.
57. McShan, D. C., S. Rao e I. Shah. 2003. PathMiner: predicting metabolic pathways by heuristic search. *Bioinformatics* 19:1692-1698.
58. Mendez-Perez, D., S. Gunasekaran, V. J. Drier y B. F. Pfeleger. 2012. A translation-coupling DNA cassette for monitoring protein translation in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 14:298-305.
59. Merighi, M., J. M. McCoy y M. I. Heidtman. 2012. Biosynthesis of human milk oligosaccharides in engineered bacteria. Documento WO2012112777
60. Mutalik, V. K., J. C. Guimaraes, G. Cambray, C. Lam, M. J. Christoffersen, Q.-A. Mai, A. B. Tran, M. Paull, J. D. Keasling, A. P. Arkin y D. Endy. 2013. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat Meth* 10:354-360.
61. Nakamura, Y., T. Gojobori y T. Ikemura. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research* 28:292.
62. Pechmann, S. y J. Frydman. 2012. Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nat Struct Mol Biol* 20:237-243.
63. Peijnenburg, A. C. M., G. Venema y S. Bron. 1990. Translational coupling in a penP-lacZ gene fusion in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*: Use of AUA as a restart codon. 1990 221:267-272.
64. Pothoulakis, G., F. Ceroni, B. Reeve y T. Ellis. 2014. The Spinach RNA Aptamer as a Characterization Tool for Synthetic Biology. *ACS Synthetic Biology* 3:182-187.
65. Rasmussen, L., H. Sperling-Petersen y K. Mortensen. 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial Cell Factories* 6:24.
66. Rhodius, V. A., V. K. Mutalik y C. A. Gross. Predicting the strength of UP-elements and full-length *E. coli* SigmaE promoters. *Nucleic Acids Research* 40:2907-2924.
67. Salis, H. M., E. A. Mirsky y C. A. Voigt. 2009. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotech* 27:946-950.
68. Seed, B. y J. Holgersson. 1999. Fucosyltransferase genes and uses thereof, documento de patente US5858752
69. Supek, F., \#352 y T. muc. 2010. On Relevance of Codon Usage to Expression of Synthetic and Natural Genes in *Escherichia coli*. *Genetics* 185:1129-1134.
70. Timblin, C. R. y M. L. Kahn. 1984. Lactose inhibits the growth of *Rhizobium meliloti* cells that contain an actively expressed *Escherichia coli* lactose operon. *Journal of Bacteriology* 158:1204-1207.
71. Varki, A. 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25-40.
72. Waldo, G. S., B. M. Standish, J. Berendzen y T. C. Terwilliger. 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotech* 17:691-695.
73. Welch, M., S. Govindarajan, J. E. Ness, A. Villalobos, A. Gurney, J. Minshull y C. Gustafsson. 2009. Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 4:e7002.
74. Williams, J., J. Luke y C. Hodgson. 2009. Strain engineering by genome mass transfer: Efficient chromosomal trait transfer method utilizing donor genomic DNA and recipient recombineering hosts. *Molecular Biotechnology* 43:41-51.

75. Wilson, D. M., R. M. Putzrath y T. H. Wilson. 1981. Inhibition of growth of *Escherichia coli* by lactose and other galactosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 649:377-384.
- 5 76. Xu, X. J., L. M. Cao y X. Chen. 2008. Elementary flux mode analysis for optimized ethanol yield in anaerobic fermentation of glucose with *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 16:135-142.
- 10 77. Yanase, H., J. Kurii y K. Tonomura. 1988. Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a Lac+ recombinant plasmid. *Journal of Fermentation Technology* 66:409-415.
78. Zhou, M., J. Guo, J. Cha, M. Chae, S. Chen, J. M. Barral, M. S. Sachs y Y. Liu. 2013. Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. *Nature* 495:111-115.
- 15 79. Zou, R., K. Zhou, G. Stephanopoulos y H. P. Too. 2013. Combinatorial Engineering of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Pathway Using Cross-Lapping *<italic>In Vitro</italic> Assembly (CLIVA) Method*. *PLoS ONE* 8:e79557.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa cuando se cultivan en un entorno en el que la lactosa se combina con otra fuente de carbono, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a. mutar la expresión de un transportador de lactosa dentro de microorganismos mediante la introducción de un promotor heterólogo delante de un gen de transportador de lactosa endógeno o exógeno a) suprimiendo los transportadores de lactosa endógenos del genoma y reintroduciéndolos en otra ubicación dentro del genoma de dicho microorganismo, b) introduciendo un promotor heterólogo delante de los transportadores de lactosa endógenos, o c) inactivando el promotor de lactosa endógeno e introduciendo un promotor heterólogo en la misma ubicación en el genoma de dicho microorganismo, y/o, mutando la región no traducida delante de la secuencia codificante que contiene las secuencias de unión a ribosoma o de Kozak y/o modificando el uso de codones del gen de transportador de lactosa endógeno, en el que dicha mutación da como resultado la expresión de dicho transportador de lactosa.
 - b. cultivar dichos microorganismos mutados en un medio que comprende una fuente de carbono que no es lactosa,
 - c. añadir lactosa a dicho medio durante el crecimiento de dichos microorganismos mutados, y
 - d. seleccionar los microorganismos que resisten el fenómeno de destrucción por lactosa al crecer en dicho medio que comprende lactosa y que retienen al menos el 50% del influjo de lactosa obtenido con el casete de expresión de tipo silvestre de dicho transportador de lactosa.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la expresión del transportador de lactosa se detecta mediante acoplamiento traduccional con un gen indicador y/o mediante acoplamiento de aptámero.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1-2, en el que la expresión del transportador de lactosa se detecta por medio de constructos genéticos tal como se proporcionan por las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y/o 5.
4. El procedimiento según las reivindicaciones 1-3, en el que dicho transportador de lactosa es una lactosa permeasa.
5. El procedimiento según las reivindicaciones 1-4 en el que dicho microorganismo es una bacteria, una levadura o una célula fúngica.
6. Una secuencia heteróloga delante de un gen de transportador de lactosa tal como se proporciona por las SEQ ID NO: 1, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57 que da lugar a la expresión de un transportador de lactosa y que no da como resultado un fenotipo de destrucción por lactosa.
7. Un microorganismo que resiste el fenómeno de destrucción por lactosa cuando se cultiva en un entorno en el que la lactosa se combina con una o varias otras fuentes de carbono, en el que dicho microorganismo es una bacteria que tiene una secuencia heteróloga delante de un gen de transportador de lactosa tal como se proporciona por las SEQ ID NO: 1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 o 57, o en el que dicho microorganismo es una levadura que tiene una secuencia heteróloga delante de un gen transportador de lactosa tal como se proporciona por las SEQ ID NO: 7 u 8.
8. El microorganismo según la reivindicación 7, en el que dicha bacteria es *E. coli* y dicha levadura es *S. cerevisiae*.
9. El microorganismo según la reivindicación 7 u 8, en el que los genes que codifican las enzimas de las rutas de degradación de lactosa y/o galactosa se vuelven menos funcionales o no funcionales.
10. Uso de un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o secuencia según la reivindicación 6 para la producción de productos de especialidad basados en lactosa y/o galactosa.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dichos productos de especialidad basados en lactosa son carbohidratos, glicolípidos y compuestos galactosilados de especialidad.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que dichos carbohidratos de especialidad son 2-fucosil-lactosa o 2'-fucosil-lactosa o 3-fucosil-lactosa o 2',3-difucosil-lactosa o lacto-Mtriosa o lacto-N-tetraosa, o lacto-nN-tetraosa o 3'sialil-lactosa o 6'sialil-lactosa.

Curva de crecimiento de tipo silvestre

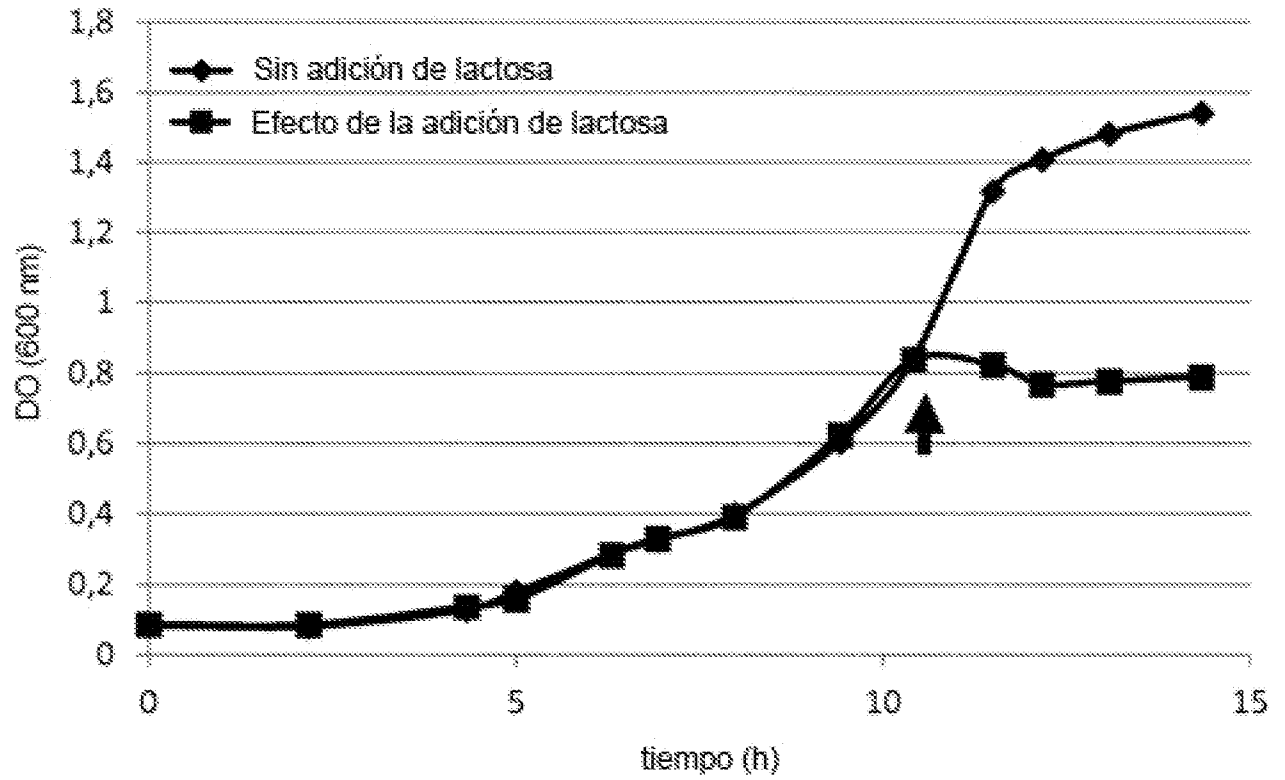


Figura 1

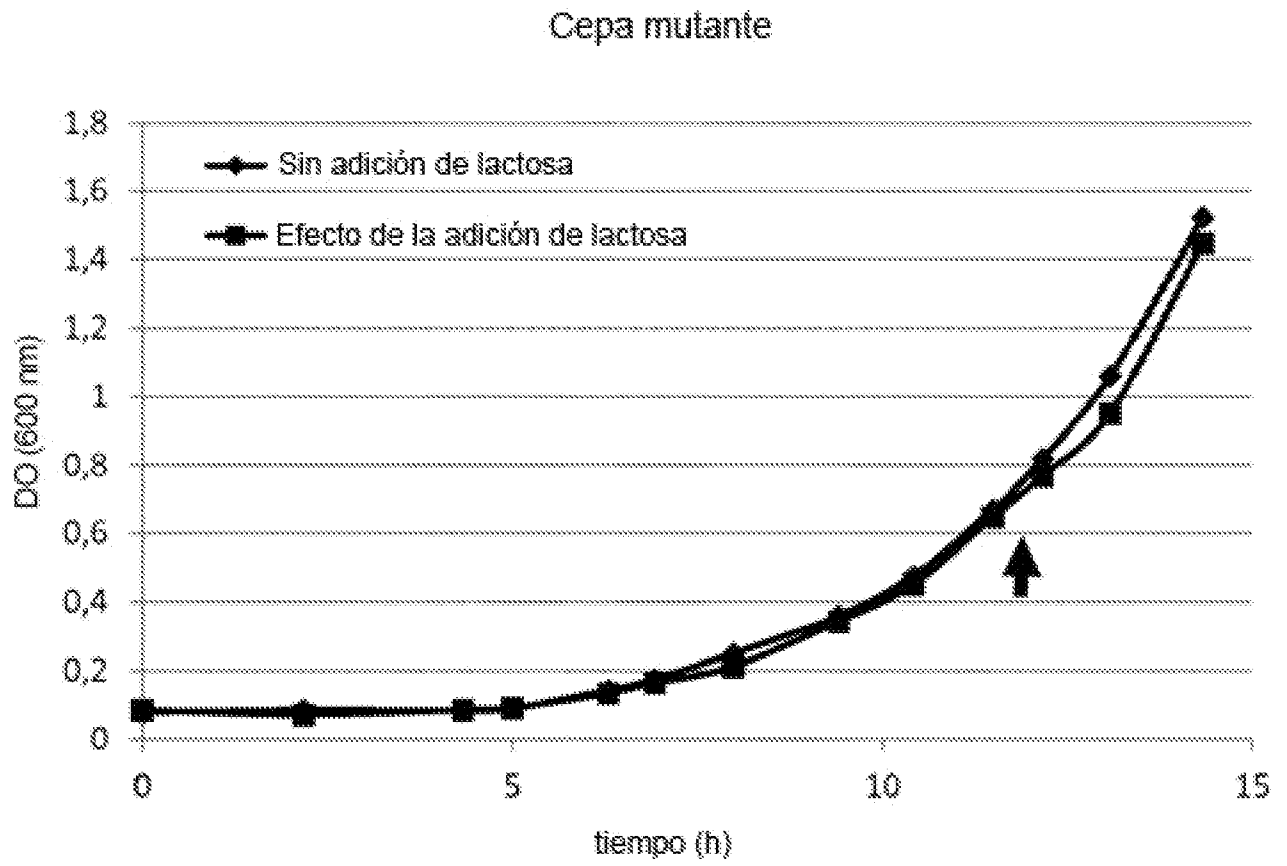


Figura 2

Secuencia del gen de lactosa permeasa con un promotor mutante y región no traducida

AGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTGTGTAGGCTG
 GAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGA
 GGATATTCATATGGACCGATATCCCGGGCGGCCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTGGA
 CCTCGAATTCGGAGGAAACAAAGATGTACTAATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGG
 TTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGTGG
 CTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTC
 TGTTCCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAA
 ATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTTATC
 TTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAG
 GCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCG
 CAGTAAFTTCGAATTTGGTCCGCGCGCGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCC
 TCGATTGTCCGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCT
 GTGCACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCAC
 GGTGCGCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTG
 TTCAGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTACACIGTATGTTATTGGCGTTTTCTGACACCTACG
 ATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGG
 TACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTT
 TTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTA
 TTATGTCGTACGATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCT
 GAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACC
 AGCCAGTTTGAAGTGGTTTTTTCAGCGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGC
 AACTGGCGATGATTTTTATGTCGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCA
 GGGCGCTTATCTGGTGTGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACG
 CTTAGCGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ
 ID N° 1)

Figura 3

Secuencia del gen de lactosa permeasa acoplado traduccionalmente al gen lacZ

ATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTCCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTT
 TTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAG
 CAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCG
 CTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCG
 GCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGGCCACTGTTACAATACAA
 CATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCG
 CCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTCAATTTGGTTCGCG
 CGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGGCATCATGTTTAC
 CATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTA
 CTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCA
 ACCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAACCTGTGGTT
 TTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCT
 AATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAA
 CGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCG
 CATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGC
 TCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
 TACCGTTCCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTCCGTTTTTC
 AGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCT
 GTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGGGTC
 TGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGGCCCCGGCCCGCTTTC
 CCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTGATAAAAACCTGGAGGCGTCATAGGGGATCC
 CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCA
 GCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCC
 AACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAAGCGGT
 GCCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCGGATACTGTGCTGCTCCCCTCAAAC
 TGGCAGATGCACCGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCA
 ATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGA
 TGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTT
 CATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCCGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGCTCTGAAT
 TTGACCTGAGCGCATTTTACGCGCCGGAGAAAAACCCCTCGCGGTGATGGTGTGCGCTG
 GAGTGACSGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGAC
 GTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTA
 ATGATGATTTACGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGGCAGTTGCGTGA
 CTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTGCGCCAGCGGCACCGCG
 CCTTTCCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCCGCTCACACTACGTC
 TGAACGTGCAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGCGTGGT
 TGAAGTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTCCGTTTCCGC
 GAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTTCGAGGCG
 TTAACCGTCAACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTGATGGATGAGCAGACGATGGTGCA
 CGATATCCTGCTGATGAACGAGAACAACCTTTAACGCCGTGCCCTGTTCCGATTATCCGAAC
 CATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATA
 TTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGA

Figura 4

CCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGA
 TCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAAT
 CACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAG
 GCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGA
 AGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGA
 GAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTT
 TCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCGGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGA
 CTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGC
 GGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCG
 ACCGACGCGCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCG
 TTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATAACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAG
 CTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGG
 ATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGC
 CGGSCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACCGGACCGCATGGTCAGAAGCC
 GGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCG
 CCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTGCATCGAGCTGGG
 TAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAGATGTGGATTGGCGAT
 AAAAAACAACCTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACA
 TTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGC
 GGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGGCAGATACACTTGCTGATGCG
 GTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGA
 AAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAG
 CGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGG
 GTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTT
 TTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAA
 CGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTC
 CAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGC
 TGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGA
 CGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTGAGCGCCGGTCTGCTACCATTAC
 CAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAAGCTGGTTTGAAGGGTATTGGTCGGTCAGTTTCACCTG
 ATTTACGTAAAAACCCGCTTCGGCGGGTTTTTGTCTTTTGGAGGGGCAGAAAGATGAATGAC
 TGTC (SEQ ID N° 2)

Figura 4 bis

Secuencia del gen de lactosa permeasa *lacY* acoplado traduccionalmente al gen *cat*

ATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTCCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTT
 TTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGGCTACATGACATCAACCATATCAG
 CAAAAGTGATACGGGTATTATTTTGGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCG
 CTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCG
 GCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCCGGCCACTGTTACAATACAA
 CATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTIATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGCG
 CCAGCAGTAGAGGCATTIATTGAGAAAGTCAGCCGTGCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCGCG
 CGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTICGGCATCATGTTTAC
 CATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTA
 CTCTTTTTCCGCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGSGTSGCCAATGCGGTAGGTGCCA
 ACCATTCCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTACAGACAGCCAAAACCTGTGGTT
 TTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCT
 AATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTGGCTACGTAA
 CGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCG
 CATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGC
 TCAATCGTTCCGCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
 TACCGTTCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTC
 AGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCT
 GTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTC
 TGGTGGCGCTGGGCTTCACTTAATTTCCGTGTTTACCGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTC
 CCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTCATCATCACCACCATCATTAGGATGGTGGT
 GATGATAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGT
 AAAGAACATTTTGAAGCATTTTCACTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTACGC
 TGGATATTACGGCCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCCTT
 TATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGAC
 GGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTTACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTG
 AAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATA
 TTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 AATAIGTTTTTCGTCAGCGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGG
 CCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTTTTCACTATGGGCAATATTATACGCAAGGCGA
 CAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTC
 GGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAGGAT
 CCAAAGGTACCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCCTTCGTAAATCTGGCGAGTGGGGAACTGCC
 AGACATCAAATAAAACAAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTTGTTTTATCTGTTGTT
 TGTCGGTGAACACTCTCCC (SEQ ID N° 3)

Figura 5

**Secuencia del gen de lactosa permeasa de *K. marxianus* acoplado
traduccionalmente al gen aph 1**

ATGGCAGATCATTCCGACGAGCTCATCTTCGCTGCAGAAGAAGSCCAATTAATACTATCGAGC
ATAAAGACACTTTGGGCAATGATCGGGATCACAAGGAAGCCTTGAACAGTGATAATGATAA
TACTTCTGGATTGAAAATCAATGGTGTCCCCATCGAGGACGCTAGAGAGGAAGTGCTCTTA
CCAGGTTACTTGTGGAAGCAATATTACAAATTGTACGGTTTATGTTTTATAACATATCTGT
GTGCTACTATGCAAGGTTATGATGGGGCTTTAATGGGTTCTATCTATACCGAAGATGCATA
TTTGAAATACTACCATTTGGATATTAACCTCAICCTCTGGTACTGGTCTAGTGTCTCTATT
TTCAACGTTGGTCAAATTTGGGGTGCATTCTTTGTTCCCTCTTATGGATTGGAAAGGTAGAA
AACCTGCTATTTTAATTGGGTGTCTGGGTGTTGTTATTGGTGCTATTATTTCTGCTCTTAAC
AACAACAAAGAGTGCATTAATTGGTGGTAGAAGGTTTCGTGGCCTTTTTCTGCTACAATCGCT
AATGCAGCAGCTCCAACATACTGTGCAGAAGTGGCTCCAGCTCACTTAAGAGGTAAGGTTG
CAGGTCTTTATAACACCCCTTTGGTCTCTCGGTTCCATTGTTGCTGCCCTTTAGCACTTACGG
TACCAACAAAACTTCCCTAACTCCTCCAAGGCTTTTAAAGATTCCATTATACTTACAAATG
ATGTTCCCAGGTCTTGTGTGTATATTTGGTTGGTTAATCCCAGAATCTCCAAGATGGTTGG
TTGGTGTGGCCGTGAGGAAGAAGCTCGTGAATTCATTATCAAATACCACITAAATGCCGA
TAGAACTCAICCATTTATTGGATATGGAGATGGCAGAAATAATAGAATCTTTCCATGGTACA
GATTTATCAAACCCCTCTAGAAATGTTAGATGTAAGGAGCTTATTCAGAACGAGATCGGATA
GGTACAGAGCAATGTTGGTTATACTTATGGCTTGGTTCCGCTCAATTTTCCGGTAACAATGT
GTGTTCCGTACTATTTGCCTACCATGTTGAGAAATGTTGGTATGAAGAGTGTCTCATTGAAT
GTGTTAATGAATGGTGTTTATTCATCGTCACTTGGATTTCTTCAATTTGCGGTGCATTCT
TTATTGATAAGATTGGTAGAAGGGAAGGTTTCTTGGTTCTATCTCAGGTGCTGCATTAGC
ATTGACAGGTCTATCTATCTGTACTGCTCGTTATGAGAAGACTAAGAAGAAGAGTGTCTTCC
AATGGTGCATTTGGTGTTCATTTATCTCTTTGGTGGTATCTTTTCTTTTGGCTTTCACTCCAA
TGCAATCCAATGTACTCAACAGAAGTGTCTACAAACTTGACGAGATCTAAGGCCCAACTCCT
CACTTTGTGGTTTCTGGTGTTCGCCAATTTGTTAATCAATTTGCTACTCCAAAGGCAATG
AAGAATATCAAATATTGGTTCATGTGTCTACGTTTTCTTCGATATTTTCGAATTTATTG
TTATCTACTTCTTCTTCGTTGAACTAAGGGTAGAAGCTTAGAAGAATTAGAAGTTGTCTT
TGAAGCTCCAAACCCAAGAAAGGCATCCGTTGATCAAGCATTCTTGGCTCAAGTCAGGGCA
ACTTTGGTCCAACCAAATGACGTTAGAGTTGCAAATGCTCAAAATTTGAAAGAGCAAGAGC
CTCTAAAGAGCCGATGCTGATCATGTGCAAAAGCTTTCAGAGGSCAGAATCTGTTAGAGCAGA
AGGAAGGGGTTCTTTGTTGACTTGTGGAGATGTTGAGGAGAATCCAGGACCAGGTAAAGGAA
AAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATA
AATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCC
CGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCBAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGAT
GAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTA
TCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGGCAAAACAGCATTCCA
GGTATTAGAAGAATATCCTGATTACAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTG
CGCCGGTTGCATTCCATTCCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCCATCGCGTATTTCTG
TCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGA
GCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCA
COGGATTCACTCGTCACTCATGGTGAATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGA
AATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGC
CATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAA
TATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTT
TCTAA (SEQ ID N° 4)

Figura 6

Secuencia de un gen de lactosa permeasa acoplado a una secuencia de aptámero

ATGTAAGTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTT
TATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCA
AAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTG
TTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCAT
GTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTT
TAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCA
GTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTGCGCAGTAATTTTGAATTTGGTCCGCGCGCGAT
GTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCCTCGATTGTGCGCATCATGTTTACCATCAATA
ATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTC
GCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCCGTAGGTGCCAACCATTCCGC
ATTTAGCCTTAAGCTGCCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGT
ATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGAACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACT
TCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGA
ATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAA
ACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACC
TCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTTCTGCTGGT
GGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGG
TCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATG
TATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCAC
CTTAATTTCCGTGTTTACGCTTAGCGGCCCGCGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGA
ATGAAGTCGCTGATAACTCTACGACAACCTCTTACAGCCAACTCTCGCCCGGATAGCTCAGT
CGGTAGAGCAGCGGCCCGGACGCAACTGAATGAAATGGTGAAGGACGGGTCCAGGTGTGGCTG
CTTCGGCAGTGCAGCTTGTTGAGTAGAGTGTGAGCTCCGTAAGTACGCGTCCGGCCCGCGG
GTCCAGGTTCAAGTCCCTGTTCCGGGCGCCA (SEQ ID N° 5)

Figura 7

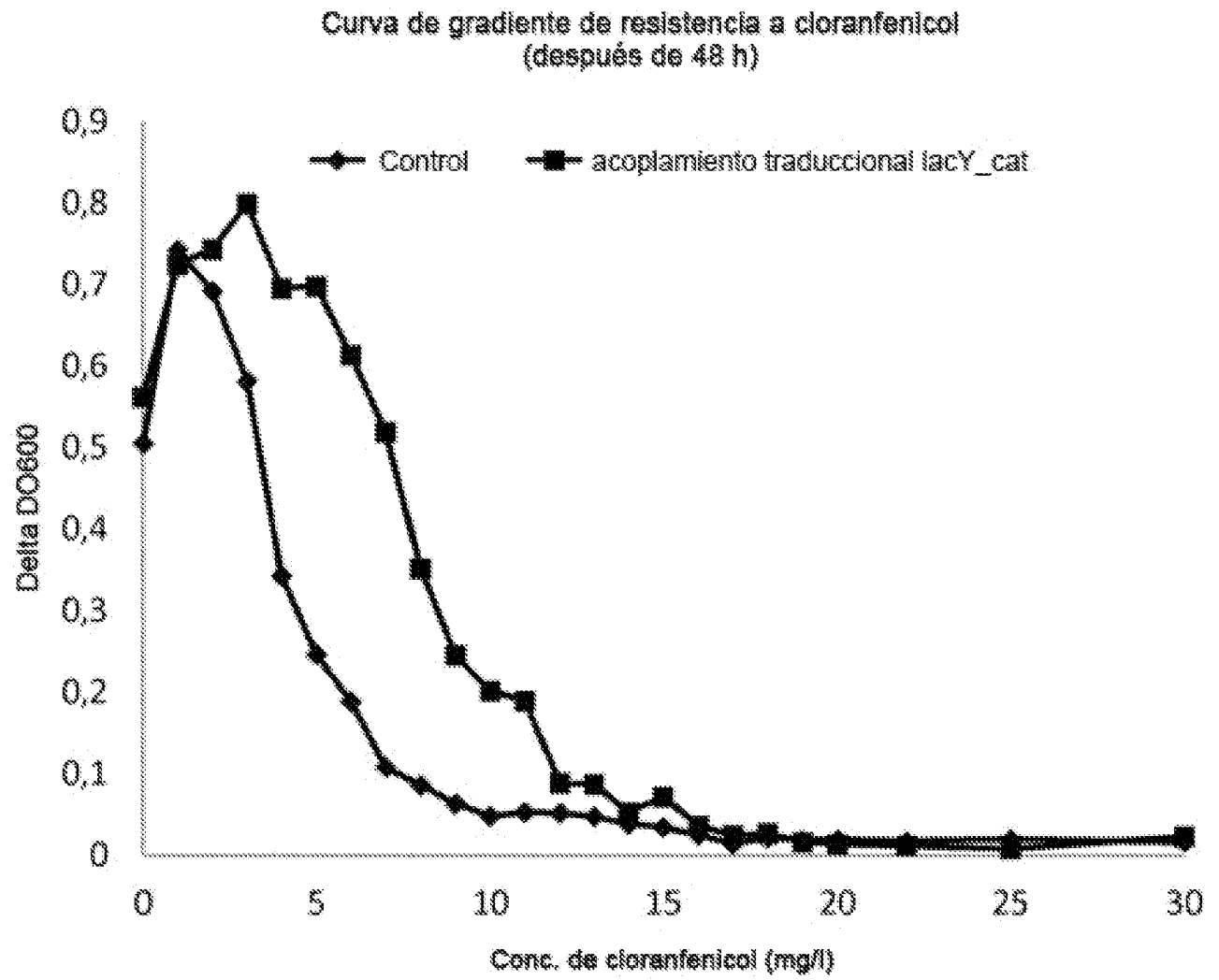


Figura 8

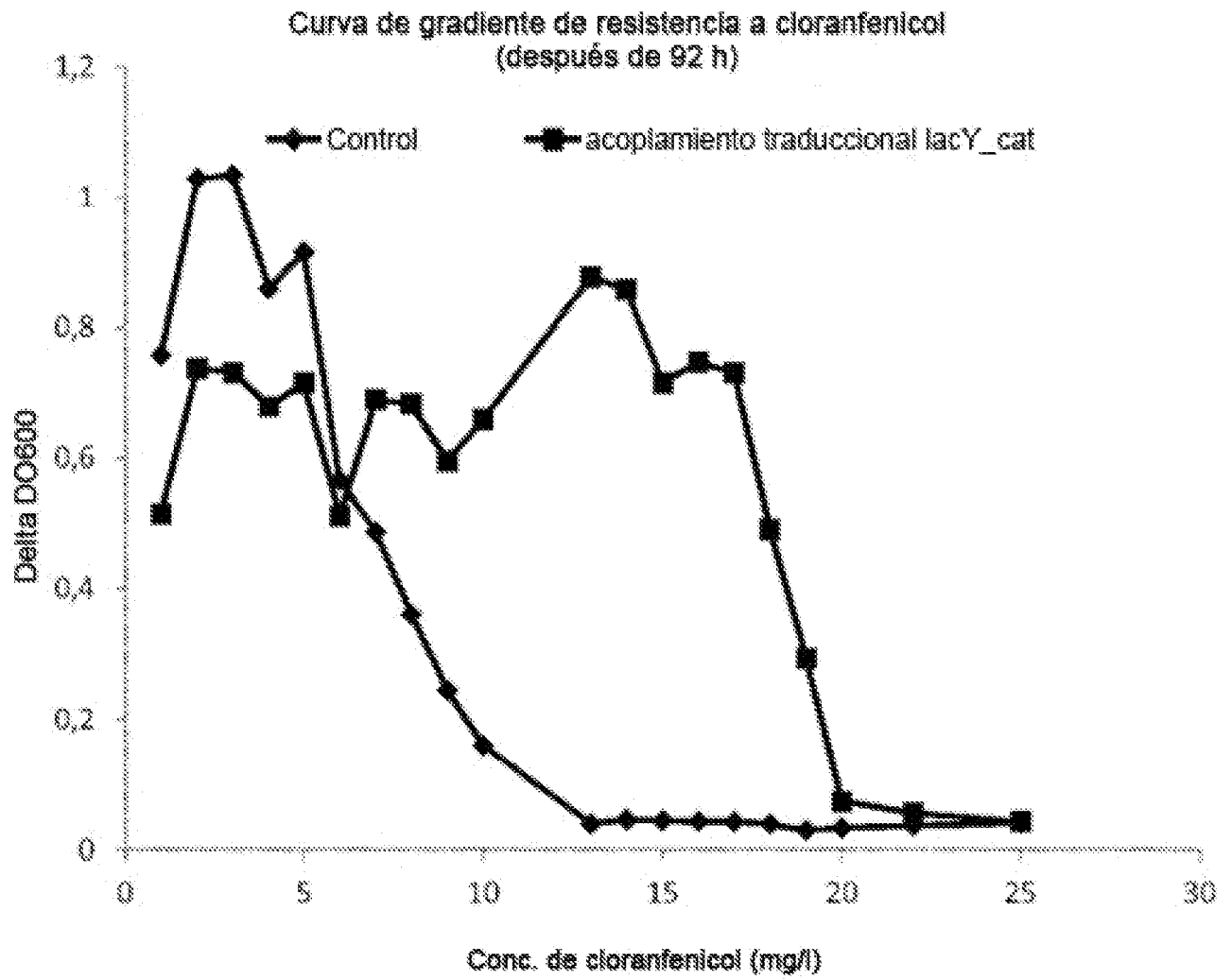


Figura 9

pCXP14-FT_*H. pylori*

CGCGTTGGATGSCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCC
 TGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCA
 GTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTCAAGAGTGAAGCGCCGTAGCGCCG
 ATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGA
 AAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTC
 CTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGGAGGG
 TGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTG
 ACGGATGGCCTTTTTTGCCTTTCTACAAACTCTTTTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
 ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGA
 AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCTTTTTTGGCGGCATTTTGCC
 TTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
 GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTC
 GCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
 TATCCCGTGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATG
 ACTTGGTTGAGTACTCACAGTCAAGAGCAATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
 AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTCT
 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA
 CGATGCCTACAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTC
 TAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC
 TGGCTCGGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
 GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
 TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
 GTGCCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA
 TTGATTTAAAACTTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATC
 TCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
 AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAA
 AAAAACCACCGCTACCAAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
 CGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
 TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGAC
 GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCA
 GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
 CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGT
 TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTAT
 GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTC
 ACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGT
 GAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG
 CGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCA
 TATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCC

Figura 10

GCTATCCTACGTGACTGGGTGCTGCTGCGCCCGGACACCCGGCCAAACACCCGGCTGACGC
 GGCCTGACGGGCTTGTCTGCTGCCGGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
 GAGAGCTCGATATCCCGGGCGGGCGCCTTCATTTCTATAAGTTTCTTGACATCTTGGCCGG
 CATATGGTATAATAGGGAAATTTCCATGGCGGGCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTC
 GACCTCGAATTCGGAGGAAACAAAGATGGCCCTTTAAAGTTTGTTCAGATTTGTGTTGGTCT
 GGGCAATCAGATGTTTCAGTATGCATTTGCAAAAAGCCTGCAGAAACATAGCAATACACC
 GGTTCGTGCTGGATATTACCAGCTTTGATTGGAGCAATCTTAAATTCAGCTTGGAACTGTT
 TCCGATTGATCTGCCCTATGCAAGCGAAAAAGAAATTGCAATTGCCAAAATGCAGCATCT
 GCGGAAACTGGTTTCTAATGTTCGAAATGCATGGGTTTGGATCGTGTGAGCCAAAGAAAT
 CGTGTTCGAAATGAAACCGAAACTGCTGAAAACCCAGCCGCTCTGACCTATTTTATGCGCTA
 TTTTCAGGATCCGCGTTATTTTGATGCAATTAGTCCGCTGATCAAAACAGACCTTTACCCCT
 GCCTCCGCTCCCGGAAAATGGTAATACAAAAAAGAGAAGAGTATCATCGTAAACT
 GGCCTGATTCTGGCAGCAAAAAATAGCCTGTTTGTGCATATTCTGTCGCGGTGATTATGT
 TGGTATTTGTTTGTGAGCTGGGCATCGATTATCAGAAAAAAGCACTGGAATACATGCCAAA
 ACGTGTTCGGAATATGGAAC TGTTTGTGTTTTCGAGGACCTGGAAATTTACCCAGAACTT
 GSATCTGGGCTATCCGTTTATGATATGACCACCCGTGATAAAGAGGAAGAGGCATATTG
 GGATATGCTGCTGATGCAGAGCTGTAAACATGGTATTATTGCCAACAGCACCTATAGTTG
 GTGGGCAGCATATCTGATTAAATAACCCGGAAAAAATCATTATTGGTCCGAAACATTGGCT
 GTTTGGGCATGAAAACATCCTGTGTAAAGAAATGGGTGAAAATCGAAAGCCACTTTCGAAGT
 GAAAAGCCAGAAATATAATGCCTAATAAGACCTCCCAA (SEQ ID N° 6)

Figura 10 bis

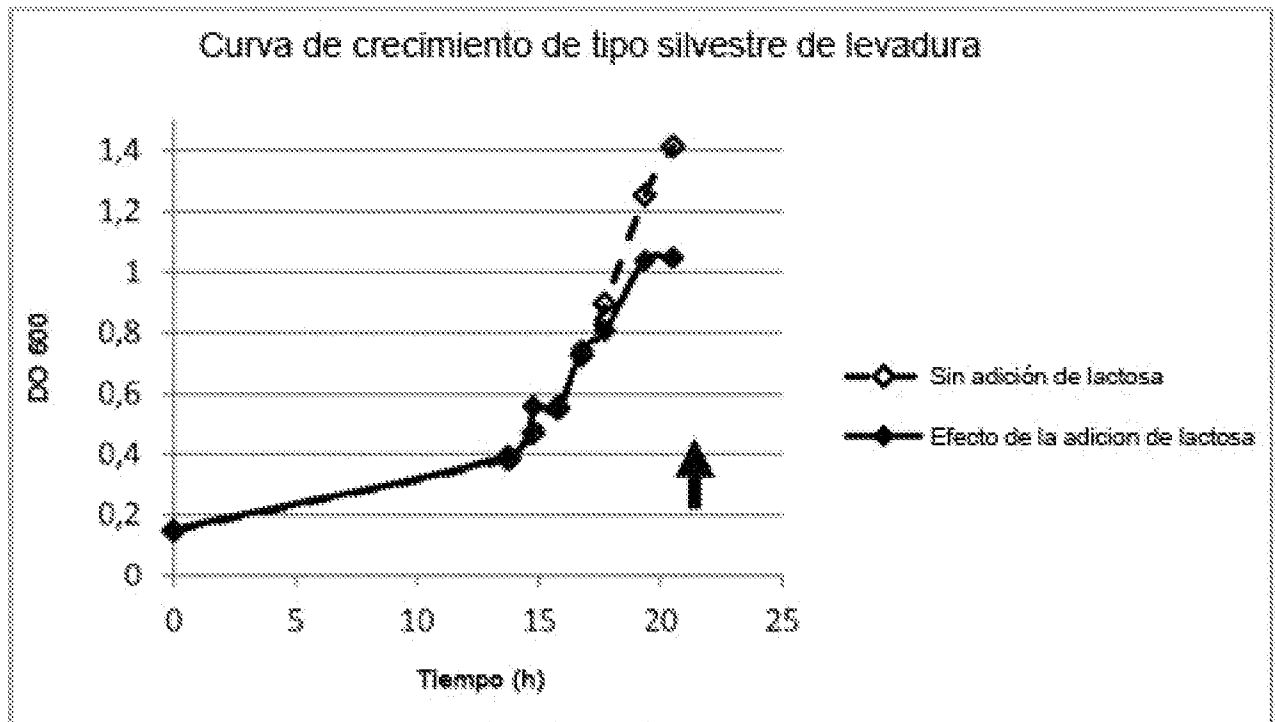


Figura 11

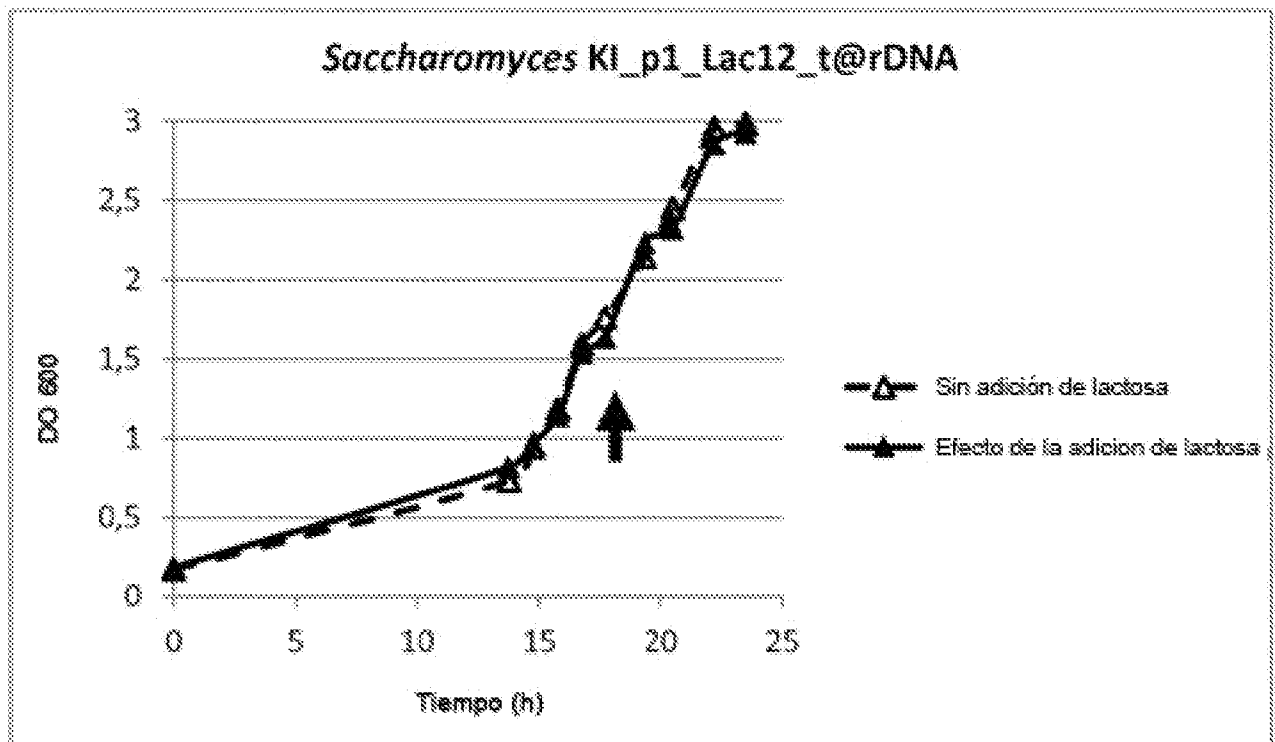


Figura 12

Secuencia de la secuencia codificante de lactosa permeasa de *K. marxianus* con una combinación de promotor mutante (p1), Kozak y terminador

TATTTTAGATTCTGACTTCAACTCAAGACGCACAGATATTATAACATCTGCAGAATAGGCATT
 TGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACCTGCATTTAAAGATGC
 CGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGG
 AAGTGTTCCTCCTTCTTGAATTGATGTTACCCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAA
 GAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAAAACCTGAAAAAACCCAGACACGCTC
 GACTTCCTCTCTTCTTATTGATTGCAGCTTCCAATTTTCGTACACACAACAAGGTCCTAGCGACGG
 CTCACAGGTTTTGTAAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAAGGGTTTAGTACCACAT
 GCTATGATGCCCACTGTGATCACCAGAGCAAAGTTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTCTT
 TCAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAA
 CCAAGGGGGTGGTTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAACTTACATTTACATATATATAAACTTGC
 ATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTTCAAGTTCT
 TAGATGCTTTCTTTTCTCTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTTACAAC
 AAATATAAAAAAATGGCAGATCATTTCGAGCAGCTCATCTTCGCTGCAGAAGAAGCCATTAAAT
 ACTATCGAGCATAAAGACACTTTGGGCATTGATCTGGATCACAAGGAAGCCTTGAACAGTGATA
 ATGATAATACTTCTGGATTGAAAAICAAATGGTGTCCCCATCGAGGACGCTAGAGAGGAAGTGCT
 CTTACCAGGTTACTTGTGCAAGCAATATTACAAATGTACAGTTTATGTTTTGTAAACATATCTG
 TGTGCTACTATGCAAGGTTATGATGGGGCTTTAATGGGTCTATCTATAACCGAAAATGCATATT
 TGGAATACTACCATTGATATTAACTCATCCAGTGGTACTGGTCTAGTGTCTCTATTTTCAA
 CGTTGGTCAAATTTGCGGTGCATTCTTTGTTCCCTCTTATGGATTGGAAAGGTAGAAAACCTGCT
 ATTTTAAATGGGTGTCTGGGTGTTGTTATTTGGTGGTATTATTACGCTCTGTAAACAACAACAAGA
 GTGCATTAATTGGTGGTAGATGGTTTCATGGCCTTTTTTCGCTACAATCGCTAATTCAGCAGCTCC
 AGCATACTGTGCAGAAGTGGCTCCAGCTCACTTAAGAGGTAAGGTTGCAGGTCTTTATAACACC
 CTTTGGTCTGTGCGTTCCATTGTTGCTGCCCTTACCACCTCTCGGTACCAACAACAACTTCCCTA
 ACTCCTCCAAGGCTTTTAAGATTCCATTATACTTACAAATGATGTTCCAGGTCTTGTGTGTAT
 ATTTGGTGGTTAATCCCAGAATCTCCAAGATGGTTGGTTGGTGTGGCCGTGAGGAAGAAGCT
 CGTGAATTCATTATCAAATACCACTTAAATGGCGATAGAACTCATCCATTATTGGATATGGAGA
 TGGCAGAAATAATAGAATCTTCCATGGTACAGATTTATCAAACCCCTCTAGAAATGTTAGATGT
 AAGGATCTTATTCAGAACGAGATCGGATAGGTACAGAGCAATGTTGGTTATACTTATGGCTTGG
 TTCGGTCAATTTTCCGGTAACAATGTGTGTTTCGTACTATTTGCCTACCATGTTGAGAAATGTTG
 GTATGAAGAGTGTCTCATTGAATGTGTTAATGAATGGTGTATTATCCATCGTCTCTTGGATTTC
 TTCAATTTGCGGTGCATTCTTTATTTGATAAGATTGGTAGAAGGGAAGGTTTCCCTTGGTTCTATC
 TCAGGTGCTGCATTAGCATTGACAGGTCATCTATCTGTACTGCTCGTTATGAGAAGACTAAGA
 AGAAGAGTGCTTCCAATGGTGCATTGGTGTTCATTTATCTCTTTGGTGTATCTTTTCTTTTGC
 TTTCACTCCAATGCAATCCATGTACTCAACAGAAGTGTCTACAACTTGACGAGATCTAAGGCC
 CAACTCCTCAACGGTGTGGTTTCTGGTGTGCCCCAATTTGTTAATCAATTTGCTACTCCAAAGG
 CAATGAAGAATATCAAATATIGGTTCTAIGTGTCTACGTTTTCTTCGATATTTTTCGAATTIAT
 TGTTATCTACTTCTTCTTCGTTGAAACTAAGGGTAGAAGCTTAGAAGAATTAGAAGCTGTCTTT
 GAAGCTCCAAACCCAAGAAAGGCATCCGTTGATCAAGCATTCTTGGCTCAAGCCAGGGCAACTT
 TGGTCCAACAAAATGACGTTAGAGTTGCAAAATGCTCAAAATTTGAAAGAGCAAGAGCTTCTAAA
 GAGCGATGCTGATCATGTGCAAAAGCTTTTCAGAGGCAGAACTCTGTTTAAAGAGTCTTTTGTAAAC
 GACCCCGTCTCCACCAACTTGGTATGCTTGAAATCTCAAGGCCATTACACATTCAGTTATGTGA
 ACGAAAGGTCTTTATTIAACGTAGCATAACTAAAT (SEQ ID N° 7)

Figura 13

Secuencia de la secuencia codificante de lactosa permeasa de *K. marxianus* con una combinación de promotor mutante (p2), Kozak y terminador

AGGAATAAGGATACTTCAAGACTAGATTCCCCCCTGCATTCCCATCAGAACCGTAAACCTTGGC
GCTTTCCTTGGGAAGTATTCAAGAAGTGCCCTTGTCGGTTTCTGTGGCTCACAAACCAGCGCGC
CCGATATGGCTTTCTTTTCACTTATGAATGTACCAGTACGGGACAATTAGAACGCTCCTGTAAC
AATCTCTTTGCAAATGTGGGGTTACATTCTAACCATGTACACTGCTGACGAAATTCAAAGTAA
AAAAAATGGGACCACGTCTTGAGAACGATAGATTTTCTTTATTTTACATTGAACAGTTCGTTGT
CTCAGCGCGCTTTATGTTTTCACTTATCATATTATAAAATAACAAAAGAAGAATTTTCATA
TTCACGCCCAAGAAATCAGGCTGCTTTCCAAATGCAATTGACACTTCATTAGCCATCACACAAA
ACTCTTTCTTGCTGGAGCTTCTTTTAAAAAAGACCTCAGTACACCAAACACGTTACCCGACCTC
GTTATTTTACGACAACCTATGATAAAATTCTGAAGAAAAAATAAAAAAATTTTCATACTTCTTGC
TTTTATTTAAACCATTGAATGATTTCTTTTGAACAAAACCTACCTGTTTCACCAAAGGAAATAGA
AAGAAAAAATCAATTAGAAGAAAACAAAAAACAAAATGGCAGATCATTCSAGCAGCTCATCTTC
GCTGCAGAAGAAGCCAATTAATACTATCGAGCATAAAGACACTTTGGGCATTGATCTGGATCAC
AAGGAAGCCTTGAACAGTGATAATGATAATACTTCTGGATTGAAAATCAATGGTGTCCCCATCG
AGGACGCTAGAGAGGAAGTGCTCTTACCAGGTTACTTGTGCAAGCAATATTACAAATTGTACAG
TTTATGTTTTGTAAACATATCTGTGTGCTACTATGCAAGGTTATGATGGGGCTTTAATGGGTCT
ATCTATACCGAAAATGCATATTTGGAATACTACCATTGATATTAACCTCATCCAGTGGTACTG
GTCTAGTGTCTCTATTTTCAACGTTGGTCAAATTTGCGGTGCATTCCTTTGTTCCTCTTATGGA
TTGGAAAGGTAGAAAACCTGCTATTTTAATTGGGTGTCTGGGTGTTGTTATTGGTGGTATTATT
ACGCTCTGTAACAACAACAAGAGTGCATTAATTGGTGGTAGATGGTTCAATGGCCTTTTTCGCTA
CAATCGCTAATTCAGCAGCTCCAGCATACTGTGCAGAAGTGGCTCCAGCTCACCTAAGAGGTAA
GGTTGCAGGTCTTTATAACACCCTTTGGTCTGTCCGGTCCATTGTTGCTGCCCTTACCACCTC
GGTACCAACAAAAACTTCCCTAACTCCTCCAAGGCTTTTAAGATTCCATTATACTTACAAATGA
TGTTCCCAAGGTCTTGTGTGTATATTTGGTTGGTTAATCCCAGAATCTCCAAGATGGTTGGTTGG
TGTTGGCCGTGAGGAAGAAGCTCGTGAATTCATTATCAAATACCACCTTAATGGCGATAGAAT
CATCCATTATTGGATATGGAGATGGCAGAAATAATAGAATCTTCCATGGTACAGATTTATCAA
ACCTCTAGAAATGTTAGATGTAAGGATCTTATTCAGAACGAGATCGGATAGGTACAGAGCAAT
GTTGGTTATACTTATGGCTTGGTTCCGTCAATTTTCCGGTAACAATGTGTGTTCGTACTATTG
CCTACCATGTTGAGAAATGTTGGTATGAAGAGTGTCTCATTTGAATGTGTTAATGAATGGTGTTT
ATTCCATCGTCTCTTGGATTTCTTCAATTTGCGGTGCATTCCTTTATTGATAAGATTGGTAGAAG
GGAAGGTTTCTTGGTTCTATCTCAGGTGCTGCATTAGCATTGACAGGTCTATCTATCTGTACT
GCTCGTTATGAGAAGACTAAGAAGAAGAGTGCTTCCAATGGTGCATTGGTGTTCATTTATCTCT
TTGGTGTATCTTTTTCTTTTGCTTTCACCTCCAATGCAATCCATGTACTCAACAGAAGTGTCTAC
AACTTGACGAGATCTAAGGCCCACTCCTCAACGGTGTGGTTTCTGGTGTTCGCCAATTTGTT
AATCAATTTGCTACTCCAAAGGCAATGAAGAATATCAAATATTGGTTCTATGTGTTCTACGTTT
TCTTCGATATTTTCGAATTTATTGTTATCTACTTCTTCTTCGTTGAAACTAAGGGTAGAAGCTT
AGAAGAATTAGAAGCTGTCTTTGAAGCTCCAAACCCCAAGAAAGGCATCCGTTGATCAAGCATTC
TTGGCTCAAGCCAGGGCAACTTTGGTCCAACAAAATGACGTTAGAGTTGCAAAATGCTCAAAATT
TGAAAGAGCAAGAGCTTCTAAAGAGCGATGCTGATCATGTGAAAAGCTTTTCAGAGGCAGAATC
TGTTTAAAGAGTCTTTTGTAACGACCCCGTCTCCACCAACTTGGTATGCTTGAAATCTCAAGGC
CATTACACATTCAGTTATGTGAACGAAAGGTCTTTATTTAACGTAGCATAACTAAAT (SEQ
ID N° 8)

Figura 14

Ejemplo de una combinación de promotor, secuencia codificante de β -galactosidasa de *K. marxianus* y terminador

TATTTTAGATTCTGACTTCAACTCAAGACGCACAGATATTATAACATCTGCAGAATAGGCATT
 TGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACCTGCATTTAAAGATGC
 CGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGG
 AAGTGTTTCCCTCCTTCTTGAATTGATGTTACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAA
 GAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAAAACCTGAAAAAACCCAGACACGCTC
 GACTTCCTCTCTTCCCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTACACACAACAAGGTCCTAGCGACGG
 CTCACAGGTTTTGTAAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAAGGGTTTAGTACCACAT
 GCTATGATGCCCACTGTGATCACCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTCTT
 TCAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAA
 CCAAGGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAACTTACATTTACATATATATAAACTTGC
 ATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTTCAAGTTCT
 TAGATGCTTTCTTTTTCTTTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTTACAAC
 AAATATAAAAAAATGCTTGCCTTATTCCTGAGAATTTAAGGAACCCCCAAAAAGGTTACCGAA
 AATAGATTGCCTACTAGGGCTTACTACTATGATCAGGATATTTTCGAATCTCTCAATGGGCCTT
 GGGCTTTTGGCGTTGTTTGTATGCACCTCTTGACGCTCCGGATGCTAAGAATTTAGACTGGGAAAC
 GGCAAAGAAATGGAGCACCATTCTGTGCCATCCCATTTGGGAACTTCAGGAAGACTGGAAGTAC
 GGTAAACCAATTTACACGAACGTACAGTACCCTATCCCAATCGACATCCCAAATCCTCCCACTG
 TAAATCCTACTGGTGTGTTATGCTAGAACTTTTGAATTAGATTTCGAAATCGATTGAGTCGTTTGA
 GCACAGATTGAGATTTGAGGGTGTGGACAATTGTTACGAGCTTTATGTTAATGGTCAATATGTG
 GGTTTCAATAAGGGGTCCCGTAACGGGGCTGAATTTGATATCCAAAAGTACGTTTCTGAGGGCG
 AAAACTTAGTGCTGTCAGGTTTTCAAGTGGTCCGATTCCACTTATATCGAGGACCAAGATCA
 ATGGTGGCTCTCTGGTATTTACAGAGACGTTTTCTTTACTAAAATTGCCTAAGAAGGCCCATATT
 GAAGACGTTAGGGTCACTACAACCTTTTGTGGACTCTCAGTATCAGGATGCAGAGCTTTCTGTGA
 AAGTTGATGTCCAGGGTTCTTCTTATGATCACATCAATTTACACACTTTACGAACCTGAAGATGG
 ATCTAAAGTTTACGATGCAAGCTCTTTGTTGAACGAGGAGATGGGAACACGACTTTTTCAACT
 AAAGAATTTATTTCTTCTCCACCAAAAAGAACGAAGAAACAGCTTTCAAGATCAACGTCAAGG
 CCCCAGAACATTGGACCCGAGAAAATCCTACTTTGTACAAGTACCAGTTGGATTTAATTGGATC
 TGATGGCAGTGTGATTCAATCTATTAAGCACCATGTTGGTTTTAGACAAGTGGAGTTGAAGGAC
 GGTAACATTACTGTAAATGGCAAAGACATTCTCTTTAGAGGTGTCAACAGACATGATCACCATC
 CAAGGTTCCGCTAGAGCTGTGCCATTAGATTTTGTGTTAGGGACTTGATTCTAATGAAGAAGTT
 TAACATCAATGCTGTTTCGTAACCTCGCATATCCAAACCATCCTAAGGTGTATGACCTCTTCGAT
 AAGCTGGGCTTCTGGGTCAATTGACGAGGCAGATCTTGAAACTCATGGTGTTCAGAGCCATTTA
 ATCGTCATACGAACCTTGGAGGCTGAATATCCAGATACTAAAAATAAACTCTACGATGTTAATGC
 CCATTACTTATCAGATAATCCAGAGTACGAGGTGCGGTACTTAGACAGAGCTTCCCAACTTGTC
 CTAAGAGATGTCAATCATCCTTCGATTATTATCTGGTCTTTGGGTAACGAAGCTTGTTATGGCA
 GAAACCACAAAGCCATGTACAAGTTAATTAAACAATTGGATCCTACCAGACTTGTGCATTATGA
 GGGTGACTTGAACGCTTTGAGTGCAGATATCTTTAGTTTTATGTACCCAACATTTGAAATTATG
 GAAAGGTGGAGGAAGAACCACACTGATGAAAA

Figura 15

TGGTAAGTTTGAAAAGCCTTTGATCTTGTGTGAGTACGGCCATGCAATGGGTAACGGTCCTGGC
 TCTTTGAAAGAATATCAAGAGTTGTTCTACAAGGAGAAGTTTTACCAAGGTGGCTTTATCTGGG
 AATGGGCAAATCACGGTATTGAATTCGAAGATGTTAGTACTGCAGATGGTAAGTTGCATAAAGC
 TTATGCTTATGGTGGTGAACTTTAAGGAAGAGGTTTCATGACGGAGTGTTCATCATGGATGGTTTG
 TGTAAACAGTGAGCATAATCCTACTCCGGGCCTTGTAGAGTATAAGAAGGTTATTGAACCCGTTT
 ATATTTAAAATTGCGCACGGATCTGTAACAATCACAAATAAGCACGACTTCATTACGACAGACCA
 CTTATTGTTTATCGACAAGGACACGGGAAAGACAATCGACGTTCCATCTTTAAAGCCAGAAGAA
 TCTGTTACTATTCTTCTGATACAACTTATGTTGTTGCCGTGTTGAAAGATGATGCTGGTGTTC
 TAAAGGCAGGTCATGAAATTGCCTGGGGCCAAAGCTGAACTTCCATTGAAGGTACCCGATTTTGT
 TACAGAGACAGCAGAAAAAGCTGCCAAGATCAACGACGGTAAACGTTATGTCTCAGTTGAATCC
 AGTGGATTGCATTTTATCTTGGACAAATTGTTGGGTAAAATTGAAAGCCTAAAGGTCAAGGGTA
 AGGAAATTTCCAGCAAGTTTGAGGGTTCTTCAATCACTTTCTGGAGACCTCCAACGAATAATGA
 TGAACCTAGGGACTTTAAGAACTGGAAGAAGTACAATATTGATTTAATGAAGCAAAACATCCAT
 GGAGTGAGTGTCGAAAAAGGTTCTAATGGTTCTCTAGCTGTAGTCACGGTTAACTCTCGTATAT
 CCCCAGTTGTATTTTACTATGGGTTTGAGACTGTTTCAAGATACACGATCTTTGCTAACAAAAT
 AAACCTTGAACACTTCTATGAAGCTTACTGGCGAATATCAGCCTCCTGATTTCCCAAGAGTTGGG
 TACGAATTCTGGCTAGGAGATAGTTATGAATCATTTGAATGGTTAGGTGCGGGGCCCGGCGAAT
 CATATCCGGATAAGAAGGAATCTCAAAGATTCCGGTCTTTACGATTCCAAAGATGTAGAGGAATT
 CGTATATGACTATCCTCAAGAAAAATGGAAATCATAACAGATACCCACTTTTTGAACATCAAATTT
 GAAGGTGCAGGAAACTATCGATCTTCCAAAAGGAGAAGCCATTTAACTTCAAGATTTTCAAGC
 AATACGGGTTGATGAAGCTGCCCACGCTTGTGACGTTAAAAGATACGGCAGACACTATCTAAG
 GTTGGACCATGCAATCCATGGTGTGGTAGCGAAGCATGCGGACCTGCTGTTCTGGACCAGTAC
 AGATTGAAAGCTCAAGATTTCAACTTTGAGTTTGATCTCGCTTTTGAATAAGCCGGCCATTGAA
 TTGAATTGAAATCGATAGATCAATTTTTTTCTTTTCTTTTCCCCATCCTTTACGCTAAAAATAA
 TAGTTTATTTTATTTTGAATATTTTATTTATATACGTATATATAGACTATTATTTATCTT
 TTAATGATTATTAAGATTTTATTAATAAAAAAAATTGCGACCTCTTTAATGCCTTTATGCAGTT
 TTTTTTTCCCATTCGATATTTCTATGTTTCGGGTTTACGCGTATTTTAAGTTTAATAACTCGAAAA
 TTCTGCGTTTTCGA (SEQ ID N° 9)

Figura 15 bis

Secuencia del ADN_r de HR1

TTAATCTCAGCAGATCGTAACAACAAGGCTACTCTACTGCTTACAATACCCCGTTGTACATCTA
 AGTCGTATACAAATGATTTATCCCCACGCCAAAATGACATTGCAATTCCGCCAGCAAGCACCCCAAG
 GCCTTTCCGCCAAGTGCACCGTTGCTAGCCCTGCTATGGTTTCAGCGACGCCACAAGGACGCCTTA
 TTCGTATCCATCTATATTGTGTGGAGCAAAGAAATCACCGCGTTCTAGCATGGATTCTGACTTA
 GAGGCGTTTCAGCCATAATCCAGCGSATGGTAGCTTCGCGGCAATGCCTGATCAGACAGCCGCAA
 AAACCAATTATCCGAATGAACTGTTCTCTCGTACTAAGTTCAATTACTATTGCGGTAACATTC
 ATCAGTAGGGTAAACTAACCCTGTCTCACGACGGTCTAAACCCAGCTCACGTTCCCTATTAGTG
 GGTGAACAATCCAACGCTTACCGAATTCTGCTTCGGTATGATAGGAAGAGCCGACATCGAAGAA
 TCAAAAAGCAATGTCGCTATGAACGCTTGACTGCCACAAGCCAGTTATCCCTGTGGTAACTTTT
 CTGGCACCTCTAGCCTCAAATTCCGAGGGACTAAAGGATCGATAGGCCACACTTTTCATGGTTTG
 TATTCACACTGAAAATCAAAATCAAGGGGGCTTTTACCCTTTTGTCTACTGGAGATTTCTGTT
 CTCCATGAGCCCCCTTAGGACATCTGCGTTATCGTTTAAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAACT
 CCCCACCTGACAATGTCTTCAACCCGGATCAGCCCCGAATGGGACCTTGAATGCTAGAACGTGG
 AAAATGAATTCAGCTCCGCTTCATTGAATAAGTAAAGAAACTATAAAGGTAGTGGTATTTTAC
 TGGCGCCGAAGCTCCCACCTTATTCTACACCCTCTATGTCTCTTCACAATGTCAAACCTAGAGTCA
 AGCTCAACAGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTCTGCCAAGCCCGTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGC
 TAGATAGTAGATAGGGACAGTGGGAATCTCGTTAATCCATTTCATGCGCGTCACTAATTAGATGA
 CGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTACTCCCGCGTTTACCCGCGCTTGGTTGAA
 TTTCTTCACTTTGACATTCAGAGCACTGGGCAGAA (SEQ ID N° 10)

Figura 16

Secuencia del ADN de HR2

AGTAGTCCGCCTAGCAGAGCAAGCCCCACCAAGCAGTCCACAAGCACGCCCGCTGCGTCTGACC
 AAGGCCCTCACTACCCGACCCCTTAGAGCCAATCCTTATCCCGAAGTTACGGATCTATTTTGCCG
 ACTTCCCTTATCTACATTATTCTATCAACTAGAGGCTGTTACCTTGGAGACCTGCTGCGGTTA
 TCAGTACGACCTGGCATGAAAACCTATTCCCTTCCTGTGGATTTTCACGGGCCGTCACAAGCGCAC
 CGGAGCCAGCAAAGGTGCTGGCCTCTTCCAGCCATAAGACCCCATCTCCGGATAAACCAATTCC
 GGGGTGATAAGCTGTAAAGAAGAAAAGATAACTCCTCCCAGGGCTCGCGCCGACGTCTCCACAT
 TCAGTTACGTTACCGTGAAGAATCCATATCCAGGTTCCGGAATCTTAACCGGATTCCCTTTTGA
 TGGTGGCCTGCATAAAATCAGGCCCTTTGAAACGGAGCTTCCCCATCTCTTAGGATCGACTAACC
 CACGTCCAACCTGCTGTTGACGTGGAACCTTTCCCCACTTCAGTCTTCAAAGTTCTCATTTGAAT
 ATTTGCTACTACCAACCAAGATCTGCACTAGAGGCGGTTCCGACCCGACCTTACGGTCTAGGCTTC
 GTCAGTACCTCCACGCCCTGCCCTACTCGTCAGGGCATCATATCAACCTGACGGTAGAGTATAG
 GTAAACACGCTTGAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTCAATTCGGCCGGTGAGTTGTTACACAC
 TCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCGGCTGTCTAGATGAACATAACACCTTTTGT
 GGTGTCTGATGAGCGTGTATTCGGGCACCTTAACTCTACGTTCCGTTTATCCCCGCATCGCCAGT
 TCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAAAAGCTCTTCATTCAAATGTCCACGTTCAATTAAGTAAC
 AAGGACTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATAGGTCAAGGTCATTTTCGACCCCGGAACCTCTA
 ATCATTCCGCTTTACCTCATAAACTGATACGAGCTTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCAGG
 AACCAGCTACTAGATGGTTTCGATTAGTCTTTCCGCCCTATACCCAAATTCGACGATCGATTTGC
 ACGTCAGAACCGCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCCTCTGGCTTCACCCCTATTTCAGGCATAGTT
 CACCATCTTTCCGGTCCCAACAGCTATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAAGACATCAGGATCGG
 TCGATTGTGCACCTCTTGCGAGGCCCAACCTACGTTCACTTTTCAATTACGCGTATGGGTTTTAC
 ACCCAAACACTCGCATAGACGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGGCGGCATATAACC
 ATTATGCCAGCATCCTTGACTTACGTCGCAGTCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTCCCACAGGC
 TATAATACTTACCGAGGCAAGCTACATTCCCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGG
 CCCAGTGAAATGCGAGATTCCCTTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACAAAACACCATGTCTGATC
 AAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACAGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATC
 TTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTAC
 CACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAGGCACTTTACAAAGAACCGCA
 CTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAAC
 GGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTACAACTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGA
 GCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTTCTTTTCCCTCCGCTTATT
 GATATGCTTAAGTTACGCGGGTACTC (SEQ ID N° 11)

Figura 17

Ejemplos de secuencias seleccionadas que se originan a partir de la metodología de cribado de destrucción por lactosa tal como se describe en los ejemplos

> Cas 1.

```

CCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCAATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTA
CAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAA
ACACAAACTTTTGGATGTTCCGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTAICATGGGAGCCTACTT
CCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATT
TTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAAC
TCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCCGTTCTT
TATTTTTATCTTCCGGCCACTGTTACAATAACAATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATT
TATCTAGGCITTTGTTTTAACGCCGCTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCC
GTCCGAGTAATTTTGAATTTGGTCCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGC
CTCGATTGTCCGCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTITTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGT
GCACTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGSATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTG
CCAATGCCGTAGGTGCCAACCAATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTACAGACA
GCCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGAC
CAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTG
GCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCAT
TAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATT
GGCTCATCGTTTCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
TACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGC
GACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTTATGTCTGTACTG
GCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGC
TGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTTACGCTTAGCGGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCG
TCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 12)

```

Figura 18

> Cas 2.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACACTT
ACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAA
TATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAT
TTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAA
CTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTT
TTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCG
CTATTTCTCTGTCTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCT
GCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTT
ATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATGTTTGGTGGTATTTATCTAG
GCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAG
TAATTTCGAATTTGGTTCGCCGCGCGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATT
GTCCGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCA
TCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGC
GGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTACAGACAGCCAAA
CTGTGGTTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGT
TTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCCGGGTATTTGGCTACGT
AACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGC
ATCCGTGCGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCAT
CGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTT
CCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGTTTTTTCAGCGACGATT
TATCTGGTCTGTTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCA
ATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTT
CACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTG
AATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 13)

```

Figura 18 - cont

> Cas 3.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTCGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACATGTACTATTTAAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTCCGGTTTATTCTTT
TTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCA
ACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATT
CCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATT
ACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACA
ACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGCGCC
AGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTCAATTTGGTCCGCGCGCGG
ATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTCGGCATCATGTTCAACCATCAATA
ATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACCTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGC
CAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATT
AGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTACAGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTA
TTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTTACTTCGTTCCT
TGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAC
GCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGC
TGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGT
GGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATAT
ATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTACGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTA
AGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCA
GGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGCTCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTTACGCTT
AGCGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID
N° 14)

```

Figura 18 - cont

> Cas 4.

```

CCCGTCTTACTGTCTCGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCTTACTGTCTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTA
CAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAA
ACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTT
CCCGTTTTTCCCGATTTGGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATT
TTTGCCGCTATTTCTCTGTTCCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAAC
TCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTT
TATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATT
TATCTAGGCTTTTGTTTTTAACGCCGSGTCCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCC
GTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCCGCCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGC
CTCGATTGTCTGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGT
GCACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTG
CCAATGCCGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACA
GCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACCGATGTTTTTGAC
CAACAGTTTGCTAATTTCTTTTACTTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTG
GCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCAT
TAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATT
GGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
TACCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGC
GACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTG
GCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGC
TGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCG
TCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 15)

```

Figura 18 - cont

> Cas 5.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCTTATAAATCATTATCTTCTTGACATTTTA
GAAACAATATGGTATAATATAACGATAAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAA
ACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTT
CCCGTTTTTCCCGATTTGGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATT
TTTGCCGCTATTTCTCTGTTCCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAAC
TCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCCGTTCTT
TATTTTTTATCTTTCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATT
TATCTAGGCTTTTGTTTTTAACGCCGSGTCCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCC
GTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCCGCCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGC
CTCGATTGTCTGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGT
GCACTCATCTCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTG
CCAATGCCGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACA
GCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACCGATGTTTTTGAC
CAACAGTTTGCTAATTTCTTTTACTTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTG
GCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCAT
TAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATT
GGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
TACCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGC
GACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTG
GCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGC
TGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCG
TCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 16)

```

Figura 18 - cont

> Cas 6.

```

CCCGTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGCCGATTCTTATTAACAATATCCTTCTTGACATTTTGCAGGGATTGTGATATAATCAATA
AGTATGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACAT
CTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGT
TTATTTCTTTTTCTTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCATTGTTGGCTAC
ATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTC
GCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTG
TGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGT
TACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGC
CGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTGCGAGTAATTTTCGAATTTGGT
CGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCATGTTCA
CCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTACT
CTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCAT
TCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTTCAC
TGTATGTTATTGGCGTTTCTCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTAC
TTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAA
TTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACG
CCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGC
GCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGGGCTGC
TTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTACGCGACGATTTATCTGGTCTGTCTCT
GCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCAT
CGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTG
TTCACGCTTAGCGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA
(SEQ ID N° 17)

```

Figura 18 - cont

> Cas 7.

```

CCCGTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATA
AGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTAAA
AAGGAGATCAACACTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTT
GACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTAAAAGGAGA
TCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAATGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTCTATGTAC
TATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCCTTTTTCTTTTACTTTTTATCATGG
GAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTCGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATAC
GGGTATTATTTTTGCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTT
TCTGACAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTT
CGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGT
TGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATPGAG
AAAGTCAGCCGTCGCAATAATTTTGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTGGCTGGG
CGCTGTGTGCTCGATTGTTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGG
CTCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCT
GCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAC
TGTTTCAGACAGCCAAAACACTGTTGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGA
TGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACG
CGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGC
CACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGT
ACGTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTATTCTGAAAACGCTGCAT
ATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGCTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGC
GTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTAT
GTCTGTACTGGCGGGCAATAATGATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGT
CTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTTACGCTTAGCGGGCCCCGSCCGCTTTCCC
TGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 18)

```

Figura 18 - cont

> Cas 8.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTA
CAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAA
ACACAAACTTTTGGATGTTGCGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTT
CCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATT
TTTGCCCGCTATTTCTCTGTTCCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAAC
TCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTT
TATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATT
TATCTAGGCTTTTGTTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCCAITTTATTGAGAAAAGTCAGCC
GTGCGAGTAATTTCSAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGC
CTCGATTGTCTGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGCTGGGCTCTGGGCTGT
GCACTCATCTCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTG
CCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACA
GCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTCTGCACCTACGATGTTTTTGAC
CAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTG
GCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCAT
TAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTCCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATT
GGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
TACCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAGC
GACGATTTATCTGGTCTGTTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGSCGATGATTTTTATGTCTGTACTG
GCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGC
TGGGCTTCACCTTAAATTTCCGTGTTACCGCTTAGCGGCCCGGCGCGCTTTCCCTGCTGCGTGG
TCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 19)

```

Figura 18 - cont

> Cas 9.

```

CCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAGGCTTACCCGCTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGT
TCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGG
AGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAATGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATG
TACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCA
TGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGA
TACGGGTATTATTTTTGCGCGTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTG
CTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGT
TTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGAT
TGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATT
GAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCT
GGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTGTTTCTGGCT
GGGCTCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCT
TCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGG
AACTGTTTCAAGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTCTGCACCTA
CGATGTTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGT
ACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTG
CGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTC
TGTACGTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTG
CATATGTTTGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAG
TGCGTTTTTTCAGCGACGATTIATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTT
TATGCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTG
GGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTT
CCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 20)

```

Figura 18 - cont

> Cas 10.

```

CCCCGCTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTGTGGCCGATTCAATTTAACCGATAAGCTTCTTGACATGTT
TAGGGTGTATGATATAATCACCCAATTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGTATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTCAGAC
AGCCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTCGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCGTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGSTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 21)

```

Figura 18 - cont

> Cas 11.

```
GGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGSCAGTGAA
TGGGGGTAAATGGCACTACAGGGCGCCTTTTATGGATTTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAA
GAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGAC
TTTTTGCTGTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGSAATTATCCCGTG
ACAGGTCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGT
CTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTGCGGAAT
TCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATA
ATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAGCGGTATCATCAA
CAGGCTTACCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTT
GACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGAT
CAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACT
ATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGG
AGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACG
GGTATTATTTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCACACCGCTGTTTGGTCTGCTTT
CTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGC
GCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTT
GGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGA
AAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGC
GCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGC
TCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTG
CCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAC
GTTTCAGACAGCCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGAT
GTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGC
GGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGCCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCC
ACTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTA
CGTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATA
TGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGC
TTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATG
TCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTC
TGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCT
GCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 22)
```

Figura 18 - cont

> Cas 12.

```

CCCCTCTTACTGTCTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTG
GCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCTCGGGAATT
CGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTA
CAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCTTACTGTCTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTAC
AATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAA
AGCAATTTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAA
CACAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTC
CCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTT
TTGCCGCTATTTCTCTGTCTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAACT
CGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGSATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTT
ATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTT
ATCTAGGCTTTTTGTTTTAACGCCCGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCG
TCGCAGTAATTTTCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCC
TCGATTGTCGGCATCATGTTTCACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTG
CACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGC
CAATGCCGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTTCAGACAG
CCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACC
AACAGTTTGCTAATTTCTTTTACTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGG
CTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATT
AATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTC
GCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATAATGTTTGAAGT
ACCGTTCCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTTCAGCG
ACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGG
CGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCGCT
GGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACCGCTTAGCGGCCCGGCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGT
CAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 23)

```

Figura 18 - cont

> Cas 13.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATACTAAGCATTATATTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACA
ATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAA
GCAATTTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAAC
ACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCC
CGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATTTT
TGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTC
GGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGTATGTTTGGCGCGTTCTTTA
TTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTA
TCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGT
CGCAGTAAATTCGAATTTGGTTCGCGCGCGSATGTTTGGCTGTGTGGCTGGGCGCTGTGTGCCT
CGATTGTCTGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGC
ACTCATCCTTCGCGCTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCC
AATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACAGC
CAAAACTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTAATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCA
ACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGGGGGTATTTGGC
TACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTCCGCCACTGATCATT
ATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGG
CTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTA
CCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAGCGA
CGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGC
GGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCGCTG
GGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTC
AGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 24)

```

Figura 18 - cont

> Cas 14.

```

CCCGTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCCGG
AATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATA
ATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTTCGGGAATTCGCG
TTGGCCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTA
GTTAGGGGCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAGGCTTACCCGTCTTACTGT
CGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGG
TATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG
TACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTT
GGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCC
GATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATT
TCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCA
AATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCCGTTCTTTATTTTTATCTT
CGGGCCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCITT
TGTTTTTAACGCCGCTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATT
TCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTTCGG
CATCATGTTACACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTC
GCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAG
GTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTACAGACAGCCAAAACCTGTG
GTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGGACCAACAGTTTGGCT
AATTTCTTTACTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGA
CAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGG
TGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTC
GCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGC
TGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTACAGCGACGATTTATCT
GGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATG
TATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTCTGSGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCT
TAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTTCGTACGGTGAATGA
AGTCGCTTAA (SEQ ID N° 25)

```

Figura 18 - cont

> Cas 15.

```

CCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGG
GGTAAATGSCACTACAGGCGCCTTTTTATGGATTTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAA
AGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTT
TGCTGTTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTTCCAGTCTGACCACCTTCGGATTATCCCGTGACAG
GTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCCTA
CTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTCGGGAATTCGC
GTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTT
AGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAGCGGTATCATCAACAGG
CTTACCCGCTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACA
TCTTACAATCAATATGGCATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAAC
AATGAAAGCAATTTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTT
AAAAAACACAAACTTTTTGGATGTTGCGTTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCC
TACTTCCCGTTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTA
TTATTTTTGCGCGTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGA
CAAACCTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCG
TTCTTTATTTTTATCTTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTG
GTATTTATCTAGGCTTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTIATTGAGAAAGT
CAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTGCGCCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCCCTG
TGTGCCTCGATTGTTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTG
GCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCAC
GGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCAATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTT
AGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTT
TTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGT
ATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTG
ATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTA
TTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTT
TGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTT
TCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTG
TACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGT
GGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTG
CGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 26)

```

Figura 18 - cont

> Cas 16.

```

CCCGTCTTACTGTCCGGGAATTCGCGGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGGTTGGCCGATTTCGAATT
CGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGGTTGGCCAATTAATTAAT
GGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGT
TCACCTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCG
TAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTT
TTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGTTGGCTACATGACA
TCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTTGGCGCTATTTCTCTGTTCTCGCT
ATTATTTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTG
TGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGGCCAC
TGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTGT
TAACGCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGCTCGCAGTAATTTT
GAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTCTG
GCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTGTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCAT
CCTCGCGGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAAT
GCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTACAGACAGC
CAAAACTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTA
TTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCAC
TGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGT
ACGTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTG
CATATGTTTGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTG
AAGTGCCTTTTTTACGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGAT
GATTTTTATGTCIGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTAT
CTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTTACGCTTAGCGGCC
CCGGCCCCGTTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCCCTTAA (SEQ ID N° 27)

```

Figura 18 - cont

> Cas 17.

```

CCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTGCTGCGCTCACGGCTCTGSCAGTGAATGGG
GGTAAATGSCACTACAGGCGCCTTTTTATGGATTTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAA
AGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTT
TGCTGTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAG
GTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTA
CTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTGCGGAATTCGC
GTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTT
AGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAGCGGTATCATCAACAGG
CTTACCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTTGAC
ATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCA
ACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTTCTATGTACTA
TTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTCCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGSGA
GCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGG
GTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTC
TGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGC
CCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTG
GTGGTATTTATCTAGGCTTTTTGTTTTAAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAA
AGTCAGCCGTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCCGCGCGCGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCG
CTGTGTGCCTCGATTGTCGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCT
CTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGC
CACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAAGCTGGCACTGGAAGT
TTCAGACAGCCAAAACGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATG
TTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGSGTACGCG
GGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCA
CTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTAC
GTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTATTCTGAAAACGCTGCATAT
GTTTGAAGTACCGTTCCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGT
TTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGT
CTGTA CTGGCGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCT
GGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTG
CTGCGTCGTGAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 28)

```

Figura 18 - cont

> Cas 18.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGCATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACACTT
ACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAA
TATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAT
TTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTATGATTTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAA
CTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTT
TTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCG
CTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCT
GCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTT
ATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAG
GCTTTTGTTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAG
TAATTTTGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATT
GTCCGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCA
TCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGC
GGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAA
CTGTGGTPTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGT
TTGCTAATTTCTTTACTTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGT
AACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGC
ATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCAT
CGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTTGAAGTACCGTT
CCTGCTGCTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAGCGACGATT
TATCTGGTCTGTTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCA
ATAIGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTT
CACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTG
AATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 29)

```

Figura 18 - cont

> Cas 19.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTGTTGAGAC
AGCCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTGACACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCGTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 30)

```

Figura 18 - cont

> Cas 20.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTCATCCAATAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACACTT
ACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAA
TATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAT
TTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAA
CTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTT
TTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCG
CTATTTCTCTGTCTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCT
GCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTT
ATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTATCTAG
GCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAG
TAATTTCGAATTTGGTTCGCCGCCGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATT
GTCCGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCA
TCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGC
GGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTGAGACAGCCAAAA
CTGTGGTTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGT
TTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCCGGGTATTGCGCTACGT
AACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGC
ATCCGTGCGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATGGCTCAT
CGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTT
CCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGTTTTTTTCAGCGACGATT
TATCTGGTCTGTTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCA
ATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGCTGGGCTT
CACCTTAAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTG
AATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 31)

```

Figura 18 - cont

> Cas 21.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTGTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACAT
CTTACAATCAATATGGGATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCA
ACAATGAAAGCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTGTGGCCGATTCCTTATAAATCATTATCTTCTT
GACATTTTAGAAACAATATGGTATAATATAACGATAAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGA
GATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTA
TGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTTCTTTTACTTTTT
TATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGC
AAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGC
TGTTTGGTCTGCTTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGG
CATGTTAGTGAATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATAACAAC
ATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGGCGC
CAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTGGCGC
GCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCCTCGATTGTGCGGCATCATGTTCCACC
ATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTAC
TCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAA
CCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACAGCCAAAACCTGTGGTTT
TTGTCACCTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGGACCAACAGTTTGCTA
ATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACCGGGGTATTTGGCTACGTAAC
GACAATGGGCGAATTACTTAAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGC
ATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCT
CATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGT
ACCGTTCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCGTTTTTCA
CGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTG
TACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCT
GGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTCACGCTTAGCGGCCCCCGGCCGCTTTCC
CTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 32)

```

Figura 18 - cont

> Cas 22.

```

CCCCGCTCTTACTGTCTCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GCTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTAAAGGAGATCAACTATGAAAGCTTACTGTCTGGG
AATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGCTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATA
ATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACT
GAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGAT
GTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATT
TGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTC
TGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATA
CCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCGTTCTTTATTTTATCTTCGGG
CCACTGTTACAATAACAATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGT
TTAACGCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTGGA
ATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTCTGGCATC
ATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCG
TTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGC
CAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTT
TTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATT
TCTTTACTTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAAT
GGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGGTGGG
AAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTAATGGCTCATCGTTCCGCCA
CCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCCCTGCTGGT
GGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTC
TGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATG
AAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGGTGGGCTGCGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAAT
TTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCCGGCCCGCTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTC
GCTTAA (SEQ ID N° 33)

```

Figura 18 - cont

> Cas 23.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCACTACTACCCATAATGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGAC
AGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCGTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 34)

```

Figura 18 - cont

> Cas 24.

```

CCCCTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTCGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACACTT
ACTGTCGGGAATTCGCGTTCGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAA
TATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAAT
TTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAA
CTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTT
TTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCG
CTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCT
GCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTT
ATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAG
GCTTTTGTTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAG
TAATTTCGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATT
GTCGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCA
TCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGC
GGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAA
CTGTGGTPTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGT
TTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGT
AACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGC
ATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCAT
CGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTT
CCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTTCAGCGACGATT
TATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCA
ATAIGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTT
CACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTG
AATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 35)

```

Figura 18 - cont

> Cas 25.

```

CCCGTCTTACTGTCCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGGATGGCCGATTTCGAATT
CGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTCTTACACGATATATACTTCTTGACATT
TTGCGGGAATTATGGTATAATCACAAAGGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAA
CAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACT
ATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCAT
GGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGT
GATACGGGTATTATTTTTGCGCGTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTG
GTCTGCTTICTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTT
AGTGATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTA
GTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTTCGCCCAGCAG
TAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTCGAATTTGGTCGCGCGCGCGAT
GTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCATGTTTCACCATCAAT
AATCAGTTTGTTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACCTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTT
TCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTC
GGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCA
CTGTATGTTATTGGCGTTTCCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCT
TTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAAT
GGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGT
GGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGT
TCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTT
CCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGCGACG
ATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGG
CGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGCTCTGGTGGC
GCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTG
CGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 36)

```

Figura 18 - cont

> Cas 26.

```

CCCGTCTTACTGTCTGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAGGGCCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCT
TAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTT
ATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACAT
GACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGC
TATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAAATACCTGCTGTG
GATTATTACCGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTA
CAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCCTTTTGTTTTAACGCCG
GTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAAGTAATTTGGAATTTGGTCG
CGCGCGGAIGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGGCATCATGTTCCACC
ATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACCTCATCCTCGCCGTTTTACTCT
TTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTC
GGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTG
TATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTT
CGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATT
ACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCC
CTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGC
TGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTT
TAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGC
TTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCG
GTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGGCTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTT
CACGCTTAGCGGCCCGGCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA
(SEQ ID N° 37)

```

Figura 18 - cont

> Cas 27.

```

CCCCTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTCTTACACGATATATACTTCTTGACATTTTGCGG
GAATTATGGTATAATCACAAGGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAG
CAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACA
CAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCCTACTTCCC
GTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTT
GCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCG
GGCTGCGCAAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTAT
TTTTATCTTCGGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTAT
CTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTTCGCCAGCAGTAGAGGCATTATGAGAAAGTCAGCCGTC
GCAGTAATTTTGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTC
GATTGTTCGCGCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCA
CTCATCCTTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCA
ATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTACAGACAGCC
AAAACCTGTGGTTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAA
CAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCT
ACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTA
TCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTAIGTCTGTACGTATTATTGGC
TCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTAC
CGTTCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGCGAC
GATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCG
GGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGG
GCTTCACCTTAAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGCCCGCTTTCCTGCTGCGTCGTCA
GGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 38)

```

Figura 18 - cont

> Cas 28.

CCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGG
GGTAAATGGCACTACAGGCGCCTTTTTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATACAAGAAA
AGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTT
TGCTGTTTCAGCAGTTTCTGCCCTCTGATTTTTCCAGTCTGACCACCTTCGGATTATCCCGTGACAG
GTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCCTTA
CTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAAT
ATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTAC
TGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATA
TGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACT
GTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATAT
GGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCGGGA
TTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAAT
AATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGTGA
AACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTTGGATGT
TCGGTTTATTCTTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTG
GCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTTGCCGCTATTTCTCTG
TTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAAATACC
TGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCC
ACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTT
AACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCGAGTAATTCGAAT
TTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCAT
GTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTT
TTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCA
ACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTT
GTCAGTGTATGTTATTGGCGTTTTCTGACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCT
TTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTGGCTACGTAACGACAATGG
GCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAA
AAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTTCGCCACC
TCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGG
GCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTG
TTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAA
AGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTT
CCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCCG
TTAA (SEQ ID N° 39)

Figura 18 - cont

> Cas 29.

TGTCCTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGC
 ACTACAGGCGCCTTTTATGGATTTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCAC
 GGGCTTCTCAGGGCGTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTTTGCTGTTTCAG
 CAGTTCCTGCCCCCTCGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTTCAGA
 CTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTCTTACTGTCGGGAA
 TTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAAT
 AATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCGGGAAT
 TCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATA
 ATTTAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTCGGGAATTCG
 CGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATT
 TAGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCGGGAATTCGC
 GTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTT
 AGTTAGGGCCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTCGGGAATTCGCCGTTGG
 GCCAATTTAATTAATGGGTATAAGGTTCTTGACAATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTT
 GGATGTTCCGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCC
 GATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATT
 TCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCA
 AATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCGTTCTTTATTTTTATCTT
 CGGGCCACTGTTACAATAACAATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTATCTAGGCCTT
 TGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTGCGCAGTAATT
 TCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTCCG
 CATCATGTTACACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTC
 GCCGTTTTACTCTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCCGTAG
 GTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACAGCCAAAACCTGTG
 GTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCT
 AATTTCTTTACTTCTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTGCTACGTAACGA
 CAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGG
 TGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGCTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTC
 GCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCCCTGC
 TGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTCAGCGACGATTTATCT
 GGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATC
 TATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCT
 TAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGA
 AGTCGCTTAA (SEQ ID N° 40)

Figura 18 - cont

> Cas 30.

```
TCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGT
AAATGGCACTACAGGCGCCTTTTTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATAACAAGAAA
AGCCCGTTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACT
TTTTGCTGTTTACGCAGTTTCTGCCCCCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCG
TGACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTA
CCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACAT
CTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCA
ACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATCGTATAAGGTTCTT
GACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGA
GATCAACAATGAAAGCACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATCGTATAAGGTT
CTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGGTAGGGGCCAAGTTCACCTTAGAAA
GGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATA
AGGTTCTTGACATCTTACAATCTATATGGTATCATAATATACTTAGGGCCCAAGTTCACCTT
AAAAAGGAGATCAACACTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCCAATTAATTCATGGTATAAG
GTTCTTGACATCTTACAATCAATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTCCGGT
TTATTCCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGCGC
TACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCGCGCTATTTCTCT
GTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAA
TACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCT
TCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGG
CTTTTGTTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGC
AGTAATTTTCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCT
CGATTGTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCATCATCCTCGCGCTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACG
GTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTGT
TCAGACAGCCAAAACGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGA
TGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGT
ACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCT
TTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTAT
TATGTCGTGTACGTATTTATGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTG
AAAACGCTGCAIATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCA
GCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCA
ACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAG
GGCGCTTATCTGGTCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGC
TTAGCGGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA
(SEQ ID N° 41)
```

Figura 18 - cont

> Cas 31.

```

GCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTT
GCTGTTTCAGCAGTTCCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGG
TCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTAC
TGTCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATA
TGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACT
GTCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATAT
GGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTC
GGGAATTTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGT
ATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGT
ACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTG
GATGTTCCGGTTTATTCTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCG
ATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTGGCGCTATTT
CTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAA
ATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCCTTTATTTTTATCTTC
GGGCCACTGTTACAATAACAATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTT
GTTTTAACGCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTT
CGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCCTCGATTGTGGC
ATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCG
CCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGG
TGCCAACCATTCGGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTTCAGACAGCCAAAACGTGTGG
TTTTTGTCAGTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTA
ATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTGGCTACGTAAACGAC
AATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGT
GGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTGG
CCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTTGCT
GGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTTCAGCGACGATTTATCTG
GTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGT
ATGAAAGCATCGSTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTT
AATTTCCGTGTTTCACGCTTAGCGGGCCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAA
GTCGCTTAA (SEQ ID N° 42)

```

Figura 18 - cont

> Cas 32.

GCTGTTTCAGCAGTTCCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGG
TCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCGGTCTTAC
TGTCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATA
TGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACT
GTCCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATAT
GGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGT
CGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGG
TATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG
TACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTT
GGATGTTTCGTTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCC
GATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATT
TCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCA
AATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCCCGTTCTTTATTTTATCTT
CGGGCCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTATCTAGGCTTT
TGTTTTAACGCCCGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATT
TCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTTCGG
CATCATGTTACACCATCAATAATCAGTTTGTCTTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTC
GCCGTTTTACTCTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAG
GTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTCAGACAGCCAAAACCTGTG
GTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGTCT
AATTTCTTTACTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGA
CAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCGG
TGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTC
GCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGC
TGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTCAGCGACGATTTATCT
GGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATG
TATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTCTGSGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCT
TAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGA
AGTCGCTTAA (SEQ ID N° 43)

Figura 18 - cont

> Cas 33.

GGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAA
 TGGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCTTTTATGGATTTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAA
 GAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGAC
 TTTTGTGCTGTTTACGACAGTTTCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTG
 ACAGGTCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGT
 CTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAAT
 CAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGC
 TTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATC
 AATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCA
 CTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAAT
 ATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTAC
 TGTCGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATA
 TGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTGCGGA
 ATTCGCGTTGGCCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAA
 TAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTG
 AAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATG
 TTCCGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGSGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTT
 GGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCT
 GTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAATAC
 CTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGC
 CACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTT
 TAAOCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTGCGAGTAATTTGAA
 TTTGGTCCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCA
 TGTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGT
 TTTACTCTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCC
 AACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTGTTAGACAGCCAAAACGTGTGGTTTT
 TGTCACCTGTATGTTATTGGCGTTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTT
 CTTTACTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATG
 GGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGA
 AAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCAC
 CTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGCTGGTG
 GGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTTACGCGACGATTTATCTGGTCT
 GTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGA
 AAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATT
 TCCGTGTTACCGCTTAGCGGCCCGCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGAGGTGAATGAAGTCG
 CTAA (SEQ ID N° 44)

Figura 18 - cont

> Cas 34.

GCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGG
 GTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTTTGCTGTTTACGACAGTTCCCTGCCCTCTGATTTTCCAGT
 CTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGC
 GGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTAATTAATGGT
 ATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTT
 AAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCATTAATGGTA
 TAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTA
 AAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAGGCTTACCCGTCTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGAT
 TCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCC
 CAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAAT
 GGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCAC
 CTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATCGCTAGGAT
 TTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTCCGTTTATTCTTTTTCTTTTAC
 TTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCA
 GCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCT
 GTTTGGTCTGCTTTCTGACAACTCGGGCTGCGCAAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATG
 TTAGTGATGTTTGGCCGTTCTTTATTTTTATCTTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAG
 TAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGA
 GGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTCGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGC
 TGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGGCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTG
 TTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGA
 TGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTCCGCATTTAGCCTTAAG
 CTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTT
 CCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGG
 TGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATT
 ATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCA
 CTATTATGCTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCT
 GAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGC
 CAGTTTGAAGTGGTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGG
 CGATGATTTTTATGCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTA
 TCTGGTGTGGGCTGCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCC
 GGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 45)

Figura 18 - cont

> Cas 35.

TTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCTTTT
 ATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATAACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGT
 TTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTGGCTGTTGAGCAGTTCCTGCCCTCTG
 ATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTGAGACTGGCTAATGCACCCA
 GTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTTACTGTGCGGAATTGCGGTTGGCCGATT
 CATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCC
 AAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTGCGGTTGGCCGATT
 ATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCA
 AGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCACTGTGCGGAATTGCGGTTGGCCGATTGATT
 AATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGT
 TCACTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTGCGGAATTGCGGTTGGCCAATTAATTAATGGTAT
 AAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAA
 AAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGTCAATATGCGTAGGATTTTCTATGTACTATTT
 AAAAAACACAACTTTTGGATGTTGCGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTT
 TATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGCGTACATGACATCAACCATATCAGCAAA
 AGTGATACGGGTATTATTTTGGCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTTCCAACCGCTGTTT
 GTCTGCTTTCTGACAACTCGGGCTGCGCAAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGT
 GATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTTATCTTCCGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGA
 TCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCAT
 TTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTT
 TGGCTGGGCGCTGTGTGCTCGATTGTTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTT
 TGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCCCAAAACGGATGCGC
 CCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGC
 ACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTGTC
 ACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAAC
 AGGGTACCGCGGTATTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTT
 CTTTGGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATT
 ATGCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAA
 CGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTT
 TGAAGTGGTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATG
 ATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGG
 TGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGGCCC
 GCTTTCCCTGCTGCGTCTGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 46)

Figura 18 - cont

> Cas 36.

GCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGCACTACAGGCGCCTTTTATGGATT
 ATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTATGGC
 GGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTGTGCTGTTACAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCA
 GTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTACAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCA
 GCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGCTTACTGTGCGGAATTGCGGTTGGCCGATTTCGAATTCG
 CGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTT
 GGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCC
 GATTTCATTAATGGTATAAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGG
 GCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTTCGCGTTGGCCG
 ATTCATTAATGGTATAAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGG
 CCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTTCGCGTTGGCCG
 TTCATTAATGGTATAAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGC
 CCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTGGTACTGAAACATCTTAATCAT
 GCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTGCGTTTATTCTTT
 TTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGGCTACATGACATCA
 ACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTTTGGCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATT
 CCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATT
 ACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCTTTATTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACA
 ACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCCGTGCGCC
 AGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTCGAATTTGGTCCGCGCGG
 ATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCATGTTACCATCAATA
 ATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGC
 CAAAACGSATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTT
 AGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTA
 TTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTT
 TGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAAC
 GCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGC
 TGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCACCTCAGCGCTGGAAGT
 GGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATAT
 ATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTTCAGCGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTA
 AGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCA
 GGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACCGCTT
 AGCGGCCCGCGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID
 N° 47)

Figura 18 - cont

> Cas 37.

GCTGTTTCAGCAGTTCCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGG
TCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCGGTCTTAC
TGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTAAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATA
TGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACT
GTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATAT
GGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAGGCTT
ACCGGTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCT
TACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACACT
TACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCA
ATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTANAAAGGAGATCAACACTTACTGTTCG
GGAATTCGCGTTGGCCNCATTAATTAATGGTATANAGTTCTTGACATCTTACCAATCATATGGTA
TAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTA
CTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTGG
ATGTTTCGGTTTATTCCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGA
TTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGGCCGCTATTTTC
TCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAA
TACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTTCGCGCTTCTTTAFTTTTATCTTCG
GGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTG
TTTTAACGCCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTC
GAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTTCGGCA
TCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGC
CGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGT
GCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTACAGACAGCCAAAACCTGFGGT
TTTTGTCACCTGTAATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAA
TTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACA
ATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTG
GGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTTCGC
CACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGCTG
GTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGG
TCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTA
TGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTA
ATTTCCGTGTTTACGCTTACCGGGCCCCGGCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTCAGGTGAATGAAG
TCGCTTAA (SEQ ID N° 48)

Figura 18 - cont

> Cas 38.

```

CCCGTCTTACTGTCCGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCTTACTGTCCGGAATTCGCGTTGCCCCGATTCTTATAAATCATTATCTTCTTGACATTTTA
GAAACAATATGGTATAATATAACGATAAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGA
AAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAA
ACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTT
CCCGTTTTTCCCGATTGTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATT
TTTGCCGCTATTTCTCTGTTCCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAAC
TCGGGCTCCGCAAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTT
TATTTTTTATCTTCCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATT
TATCTAGGCTTTTGTTTTAAACGCCGCTGCCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCC
GTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCGCCGCCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGC
CTCGATTGTCCGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGT
GCACTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTG
CCAATGCCGTAGGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTTCAGACA
GCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTAFTGGCGTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGAC
CAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTG
GCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCGATTATGTTCTTTGCCGCCACTGATCAT
TAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATT
GGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAG
TACCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGCGTTTTTTCAGC
GACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTG
GCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGCTCTGGTGGCGC
TGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCG
TCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 49)

```

Figura 18 - cont

> Cas 39.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTTAACCGATAAGCTTCTTGACATGTT
TAGGGTGTATGATATAATCACCCAATTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTTCAGAC
AGCCAAAACGTGGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 50)

```

Figura 18 - cont

> Cas 40.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTGCGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTGTCAGAC
AGCCAAAACGTGTTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTGACACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTTCA
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 51)

```

Figura 18 - cont

> Cas 41.

```

CCCGTCTTACTGTTCGGGAATTTCGCGTTGGCCGATTCTTAAATTCAATAACTTTCTTGACATGTT
ATTAGATTTATGGTATAATGACCCGATATGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTTCGGCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGAC
AGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCGTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 52)

```

Figura 18 - cont

> Cas 42.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTAAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAGGCTTACCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGT
TCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGG
AGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAATGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATG
TACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCA
TGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGA
TACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTG
CTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGT
TTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGAT
TGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTATT
GAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCT
GGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCT
GGGCTCTGGCTGTGCACTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCT
TCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGG
AACTGTTTACAGACAGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTTGCACCTA
CGATGTTTTTTGACCAACAGTTTGTCTAATTTCTTTACTTTCGTTCTTTTGTACCGGTGAACAGGGT
ACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTG
CGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTC
TGTACGTATTATTTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGTTATTCTGAAAACGGCTG
CATATGTTTGAAGTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAG
TGCGTTTTTTCAGCGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTT
TATGCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTAICTGGTGCTG
GGTCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTT
CCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 53)

```

Figura 18 - cont

> Cas 43.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTGGAATTTGGTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGSCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGCGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACTGTTTCAGAC
AGCCAAAACCTGTGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCGTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTCGTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTGCTGGGTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 54)

```

Figura 18 - cont

> Cas 44.

```

CCCGTCTTACTGTTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGC
GTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAA
TCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTG
TCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATG
GTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGT
CGGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGG
TATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTC
GGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGT
ATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTTCGGGAATTC
GCGTTGGCCAATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACCATCAATATGGGGCCCAAGT
TCACCTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGTGAACATCTTAATCATGCGTAG
GATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTTCTTTTCTTT
TACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGGCTACATGACATCAACCATA
TCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTTCCAACC
GCTGTTTTGGTCTGCTTTCTGACAACTCGGGCTGCGCAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGC
ATGTTAGTGATGTTTTCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTT
TAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGGCCAGCAGT
AGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTT
GGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTTCGGCATCATGTTTACCATCAATAATCAGT
TTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACCTCATCCTCGCCGTTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAC
GGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTT
AAGCTGGCACTGGAACGTGTTTCAGACAGCCAAAACGTGGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCG
TTTCCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTAC
CGGTGAACAGGGTACCGCGGTATTTGGCTACGTAAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCCTCG
ATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTG
GCACTATTATGCTGTGACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTAT
TCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACC
AGCCAGTTTGAAGTGCCTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGCTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAAC
TGGCGATGATTTTTATGCTGTGACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGC
TTATCTGGTGTGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGC
CCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 55)

```

Figura 18 - cont

> Cas 45.

```

CCCGTCTTACTGTCGGGAATTCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGGGATAAGGTTCTTGACATCTT
ACAATCAATATGGTATAATAATTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATG
AAAGCAATTTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAA
AACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCTTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACT
TCCCGTTTTTCCCGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTAT
TTTTGCCGCTATTTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAA
CTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCGTTCT
TTATTTTTTATCTTCGGGCCACTGTTACAATACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTAT
TTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGC
CGTCGCAGTAATTTCGAATTTGGTTCGCGCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTG
CCTCGATTGTGCGGCATCATGTTCAACCATCAATAATCAGTTTGTTTTCTGGCTGGGCTCTGGCTG
TGCACCTCATCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTT
GCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACGTGTTTTCAGAC
AGCCAAAACGTGGGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTTCTTGCACCTACGATGTTTTTGA
CCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTCTTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTT
GGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCA
TTAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTTCTGTACGTATTAT
TGGCTCATCGTTTCGCCACCTCAGCGCTCGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAA
GTACCGTTTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGGTTTTTTCAG
CGACGATTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTATGTTCTGTACT
GGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGTCTGGSTCTGGTGGCG
CTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGCCCGGCCCGCTTTCCCTGCTGCGTC
GTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID N° 56)

```

Figura 18 - cont

> Cas 46.

GGCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAA
TGGGGGTAAATGGCACTACAGGGCGCCTTTTATGGATTTCATGCAAGGAACTACCCATAATACAA
GAAAAGCCCGTCACGGGCTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGAC
TTTTTGCTGTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTG
ACAGGTCATTTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGT
CTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCCGATTTCGAATTCGCGTTGGCCGATTCTTAGAGATAAAAA
ATTTCTTGACATGTTCTATGTTTTGTGATATAATCGTGAGATAAAGGGCCCAAGTTCACCTAAAA
AGGAGATCAACAATGAAAGCAAGCGGTATCATCAACAGGCTTACCCGTCTTACTGTGCGGAATT
CGCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAA
TTTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTC
GCGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAAT
TTAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCTTACTGTGCGGAATTCG
CGTTGGCCGATTTCATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATGGTATAATAATT
TAGTTAGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAGGAGATCAACACTTACTGTGCGGAATTCGCGTTGGCC
AATTAATTAATGGTATAAGGTTCTTGACATCTTACAATCAATATTTGTATAATAATTTAGTTAGG
GCCCAAGTTCACCTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATC
ATGCGTAGGATTTTTTCTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTTCGGTTTATTCT
TTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGATTGCGCTACATGACAT
CAACCATATCAGCAAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCGCGTATTTCTCTGTTCTCGCTATTA
TTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGCAAATACCTGCTGTGGATTA
TTACCGGCAIGTTAGTGATGTTTGCGCCGTTCTTTATTTTTATCTTCGGGGCCACTGTTACAATA
CAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTTTTGTTTTAACGCCGGTGGC
CCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAATTTTGAATTTGGTGGCGCGC
GGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTGCGCATCATGTTACCATCAA
TAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCTCGCCGTTTTACTCTTTTTTC
GCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTAGGTGCCAACCATTGGGCAT
TTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAAGTGTTCAGACAGCCAAAAGTGTGGTTTTTGTCACTGTATGT
TATTGGCGTTTCTGTCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGCTAATTTCTTTACTTCGTTT
TTTGCTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACGACAATGGGCGAATTACTTA
ACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAAATCGCATCGGTGGGAAAAACGCCCTGCT
GCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTTCCGCCACCTCAGCGCTGGAA
GTGGTTATTTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCTCTGCTGGTGGGCTGCTTTAAAT
ATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGTTTTTTCAGCGACGATTTATCTGGTCTGTTTCTGCTTCTT
TAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATATGTATGAAAGCATCGGTTTC
CAGGGCGCTTATCTGGTGGTGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACCTTAATTTCCGTGTTACGCG
TTAGCGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCGTCAGGTGAATGAAGTCGCTTAA (SEQ ID
N° 57)

Figura 18 - cont

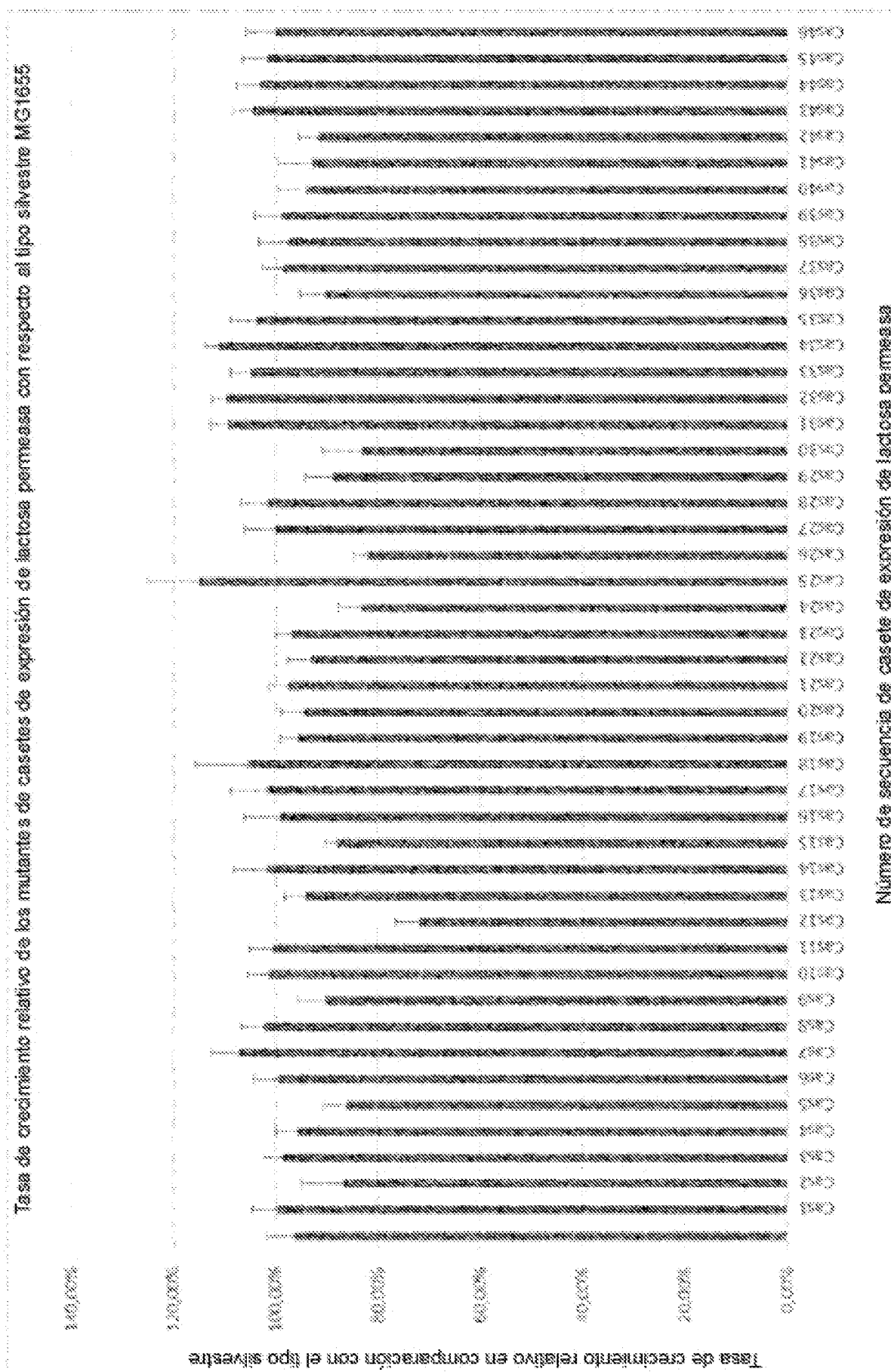


Figura 19

Secuencia del constructo *placIQ_JacY_terminador*

TCGCGTTGGCCGATTTCGGAATAGGACACCCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATG
 ATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTT
 TGGATGTTTCGGTTTATTTCTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCCTTTTTC
 CGATTTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTAT
 TTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGGCTGCGC
 AAATACCTGCTGTGGATTATTACCGGCATGTTAGTGATGTTTGGCGCCGTTCTTTATTTTTATCT
 TCGGGCCACTGTTACAATAACAACATTTTAGTAGGATCGATTGTTGGTGGTATTTATCTAGGCTT
 TTGTTTTAACGCCGGTGCGCCAGCAGTAGAGGCATTTATTGAGAAAGTCAGCCGTCGCAGTAAT
 TTCGAATTTGGTGCGCCGCGGATGTTTGGCTGTGTTGGCTGGGCGCTGTGTGCCTCGATTGTG
 GCATCATGTTACCATCAATAATCAGTTTGTCTTCTGGCTGGGCTCTGGCTGTGCACTCATCCT
 CGCCGTTTTACTCTTTTTTCGCCAAAACGGATGCGCCCTCTTCTGCCACGGTTGCCAATGCGGTA
 GGTGCCAACCATTCGGCATTTAGCCTTAAGCTGGCACTGGAACCTGTTACAGACAGCCAAAACCTGT
 GGTTTTTGTCACTGTATGTTATTGGCGTTTCTCTGCACCTACGATGTTTTTGACCAACAGTTTGC
 TAAATTTCTTTACTTCGTTCTTTTGTACCGGTGAACAGGGTACGCGGGTATTTGGCTACGTAACG
 ACAATGGGCGAATTACTTAACGCCTCGATTATGTTCTTTGCGCCACTGATCATTAATCGCATCG
 GTGGGAAAAACGCCCTGCTGCTGGCTGGCACTATTATGTCTGTACGTATTATTGGCTCATCGTT
 CGCCACCTCAGCGCTGGAAGTGGTTATTCTGAAAACGCTGCATATGTTTGAAGTACCGTTCCCTG
 CTGGTGGGCTGCTTTAAATATATTACCAGCCAGTTTGAAGTGGCTTTTTACGCGACGATTTATC
 TGGTCTGTTTCTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGATGATTTTTATGTCTGTACTGGCGGGCAATAT
 GTATGAAAGCATCGGTTTCCAGGGCGCTTATCTGGTGCTGGGTCTGGTGGCGCTGGGCTTCACC
 TTAATTTCCGTGTTACGCTTAGCGGGCCCCGGCCCCGCTTTCCCTGCTGCGTCTCAGGTGAATG
 AAGTCGCTCATCATCACCACCATCATTAGGATGGTGGTGAATGATAATGGAGAAAAAATCACTG
 GATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCACTCAGT
 TGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCACTGGATATTACGGCCCTTTTTAAAGACCGTAAAG
 AAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCCTTTATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATC
 CGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCTTTGTTA
 CACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTT
 CGGCAGTTTCTACACATATATTCCGAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCC
 CTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTACGCGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTT
 TGATTTAAACGTGGCCAAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCACTATGGGCAAAATATTAT
 ACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCT
 TCCATGTCCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTA
 AGGATCCAAAGGTACCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCCCTTCGTAAATCTGGCGAGTGGGGAACTG
 CCAGACATCAAATAAAACAAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTTGTTTTTATCTGTTGTTT
 GTCGGTGAACACTCTCCCGTGTAGGCTGGAGCTG (SEQ ID N° 58)

Figura 20

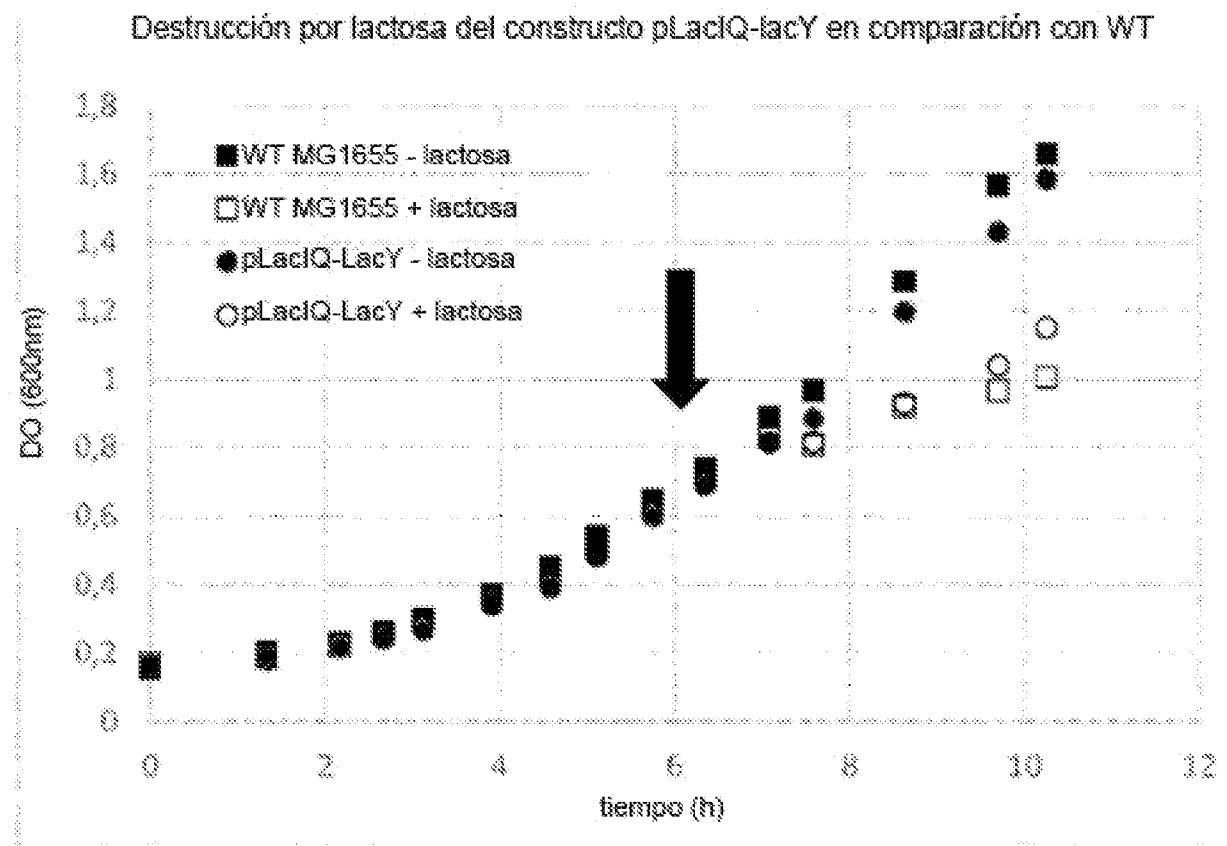


Figura 21