



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 380**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06844685 .5**

(96) Fecha de presentación : **01.12.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1963510**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

(54) Título: **Genes GRG23 y GRG51 que confieren resistencia a los herbicidas.**

(30) Prioridad: **01.12.2005 US 741166 P**
30.06.2006 US 817799 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2010

(73) Titular/es: **Athenix Corporation**
108 T W Alexander Drive, P.O. Box 110347
Research Triangle Park, North Carolina 27709, US

(72) Inventor/es: **Peters, Cheryl, L.;**
Hinson, Jill;
Hammer, Philip, E.;
Vande Berg, Brian;
Schouten, Laura, Cooper y
Carr, Brian

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 332 380 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes GRG23 y GRG51 que confieren resistencia a los herbicidas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención proporciona nuevos genes que codifican tolerancia al glifosato que son útiles en biología de las plantas, reproducción de cultivos y cultivo de células de plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

La N-fosfonometilglicina, comúnmente denominada glifosato, es un importante compuesto químico agronómico. El glifosato inhibe a la enzima que convierte al ácido fosfoenolpirúvico (PEP) y al ácido 3-fosfoshiquímico (S3P) en ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshiquímico. La inhibición de esta enzima (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa, denominada aquí como "EPSPS") mata las células de las plantas cerrando la ruta del shiquimato, inhibiendo así la biosíntesis del ácido aromático.

Ya que los herbicidas de la clase del glifosato inhiben la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, no solamente matan células de plantas, sino que también son tóxicos para las células bacterianas. El glifosato inhibe muchas EPSP sintasas bacterianas, y por lo tanto es tóxico para estas bacterias. Sin embargo, ciertas EPSP sintasas bacterianas tienen una alta tolerancia al glifosato.

Las células de las plantas resistentes a la toxicidad del glifosato pueden ser producidas por medio de células de plantas transformantes para expresar EPSP sintasas bacterianas resistentes al glifosato. Notablemente el gen bacteriano de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizado para conferir resistencia a los herbicidas en células de plantas después de la expresión en plantas. Una EPSP sintasa mutada de la cepa CT7 de *Salmonella typhimurium* confiere resistencia al glifosato en células bacterianas, y confiere resistencia al glifosato sobre células de plantas (patentes estadounidenses Nos. 4.535.060; 4.769.061 y 5.094.945). Sin embargo, existe la necesidad de otros genes resistentes a herbicidas.

Se puede analizar la actividad cinética de EPSPS midiendo la liberación de fosfato. Se detecta la liberación de fosfato utilizando un ensayo acoplado para la detección de fluorescencia del fosfato con base en la generación de N-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina (Amplex® Red), como se conoce en el estado del arte (Vázquez y colaboradores (2003) Analytical Biochemistry 320: 292-298). Las condiciones publicadas del ensayo pueden conducir a saturación del ensayo en experimentos donde se libera fosfato muy rápidamente. Se requieren métodos adicionales para la medición de la actividad cinética de EPSPS.

Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos para conferir a las bacterias, plantas, células de plantas, tejidos, semillas, tolerancia al glifosato. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos para tolerancia al glifosato, vectores que incluyen aquellas moléculas de ácido nucleico, y células huésped que contienen a tales vectores. Las composiciones también incluyen anticuerpos para los polipéptidos de tolerancia al glifosato. Como se ha señalado, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser utilizadas en construcciones de ADN o casetes de expresión para transformación y expresión en organismos, incluidos microorganismos y plantas. Las composiciones también incluyen bacterias, plantas, células de plantas, tejidos y semillas transformados. Además, se proveen métodos para producir los polipéptidos codificados por los nucleótidos sintéticos de la invención.

Se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico y variantes de las mismas que codifican polipéptidos para tolerancia al glifosato. Adicionalmente, están incluidas las secuencias de aminoácidos y las variantes de las mismas codificadas por lo polinucleótidos que confieren tolerancia al glifosato. La presente invención proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que contienen una secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, a la secuencia de nucleótidos para tolerancia al glifosato depositada en un huésped bacteriano con los Números de Acceso NRRL B-30888 o NRRL B-30949, así como variantes y fragmentos de las mismas. Las secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de nucleótidos de la invención, o que hibridan a una secuencia de la invención están también incluidas.

Los métodos para medir la actividad cinética de la enzima que utilizan sustratos fluorogénicos son también suministrados.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico, una molécula aislada de ácido nucleico seleccionada entre:

- 65 a) una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, o un complemento de la misma;

ES 2 332 380 T3

- b) una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, que codifica a una EPSPS de tolerancia al glifosato, o un complemento de la misma;
- c) la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o B-30949, o un complemento de la misma;
- d) una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6; y
- e) una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato.

La invención también proporciona:

- un vector que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, conteniendo dicho vector opcionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido heterólogo.
- una célula huésped que contiene a tal vector;
- una planta transgénica que contiene a la célula huésped; o
- una semilla transformada de tal planta.

La invención proporciona adicionalmente un polipéptido aislado seleccionado entre:

- a) un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;
- b) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;
- c) un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato;
- d) un polipéptido que es codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y
- e) un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos para tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRR B-30949;
- dicho polipéptido comprende opcionalmente además una secuencia heteróloga de aminoácidos.

La invención proporciona además un método para producir un polipéptido con actividad de tolerancia al glifosato, que comprende el cultivo de la célula huésped de la invención bajo condiciones en las cuales se expresa una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido, siendo dicho polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:

- a) un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;
- b) un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;
- c) un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato;
- d) un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y
- e) un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos para tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRR B-30949.

La invención proporciona además un método para conferir tolerancia al glifosato en una planta, comprendiendo dicho método la transformación de dicha planta con una construcción de ADN, conteniendo dicha construcción un promotor que dirige la expresión en una célula de una planta operativamente enlazada con una secuencia de ácido nucleico al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5 que codifica una EPSPS para tolerancia al glifosato y la regeneración de una planta transformada.

La invención proporciona además una planta o célula de planta que tiene incorporada en forma estable dentro de su genoma una construcción de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica a una proteína que tiene actividad de tolerancia la glifosato, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de:

- a) una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;
- b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad de tolerancia al glifosato;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y
- e) la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRRL B-30949; en donde dicha secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación en una célula de una planta.

Además, la invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a una enzima EPSPS de tolerancia al glifosato, en donde dicha enzima EPSPS de tolerancia al glifosato tiene una K_m para el fosfoenolpiruvato (PEP) entre 1 y 150 μM y una K_i (glifosato)/ K_m (PEP) entre 500 y 1000.

La invención proporciona además una planta que tiene incorporada en forma estable dentro de su genoma una construcción de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido EPSPS, teniendo dicho polipéptido EPSPS una K_m para PEP aproximadamente entre 1 y aproximadamente 150 μM y un K_i (glifosato)/ K_m (PEP) aproximadamente entre 500 y aproximadamente 1000, exhibiendo dicha planta tolerancia al herbicida glifosato.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos ORF1 de GRG23 (SEQ ID NO: 2) y de GRG51 (SEQ ID NO: 6) con *Bacillus clausii* (SEQ ID NO: 7), *Rubrobacter xylophilus* (SEQ ID NO: 8), *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 11), cepa CP4 de *Agrobacterium sp.* (SEQ ID NO: 10) y *Zea mays* (SEQ ID NO: 9).

La Figura 2 muestra una gráfica de dispersión de la actividad de la enzima GRG23 (eje y) en función de la concentración de PEP (eje x) con concentraciones de glifosato de 0, 3, 5 y 10 mM.

La Figura 3 muestra una gráfica de dispersión de K_m (app) (eje y) en función de la concentración de glifosato (eje x). El intercepto en X representa la K_i para el glifosato.

Descripción detallada

Se describirán ahora las presentes invenciones más completamente de aquí en adelante con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales, se muestran algunas pero no todas las modalidades de la invención. En realidad, estas invenciones pueden ser expresadas en muchas formas diferentes y no deben ser consideradas como limitadas a las modalidades expuestas aquí; en vez de eso, se proporcionan estas modalidades de tal manera que esta descripción satisfaga los requerimientos legales aplicables. Los números similares se refieren a elementos similares a todo lo largo de la descripción.

Muchas modificaciones y otras modalidades de las invenciones expuestas aquí vendrán a la mente de alguien capacitado en el arte a la cual pertenecen estas invenciones teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que las invenciones no están limitadas a las modalidades específicas divulgadas y se pretende que las modificaciones y otras modalidades estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Aunque se empleen aquí términos específicos, se los utiliza únicamente en sentido genérico y descriptivo y no con el propósito de constituirse en una limitación.

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para regular la resistencia a los herbicidas en organismos, particularmente en plantas o en células de plantas. Los métodos involucran la transformación de organismos con secuencias de nucleótidos que codifican al gen de tolerancia al glifosato de la invención. Las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para la preparación de plantas que muestren mayor tolerancia al herbicida glifosato.

Por lo tanto, se proporcionan bacterias, plantas, células de plantas, tejidos de plantas y semillas transformadas. Las composiciones incluyen ácidos nucleicos y proteínas relacionados con tolerancia a los herbicidas en microorganismos y plantas así como en bacterias, plantas, tejidos de plantas y semillas transformados. Se describen las secuencias de nucleótidos del gen de tolerancia al glifosato (*grg23* y *grg51*) y las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas de este modo. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para la transformación posterior en plantas de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes de tolerancia al glifosato, como marcadores seleccionables, y similares. De este modo, por “gen de tolerancia al glifosato de la invención” se entiende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 ó 3, y variantes y fragmentos de la misma (SEQ ID Nos: 5, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32), que codifica un polipéptido de tolerancia al glifosato. Asimismo, un “polipéptido para el glifosato de la invención” es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos: 2 ó 4, y variantes y fragmentos de las mismas (SEQ ID Nos: 6, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 33), que confieren tolerancia al glifosato a una célula huésped.

Los plásmidos que contienen las secuencias de nucleótidos de tolerancia al glifosato de la invención fueron depositados en la colección permanente de la Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory (NRRL) el 18 de noviembre de 2005, y con el Acceso asignado No. NRRL B-30888 (*grg23*), y el 26 de junio de 2006, y con el Acceso asignado No. NRRL B-30949 (*grg51*). Este depósito será mantenido bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento de Patente. Este depósito fue hecho simplemente como una conveniencia para aquellos capacitados en el arte y no es una admisión de que se requiere un depósito bajo la regla 35 U.S.C. § 112.

Por “glifosato” se entiende cualquier forma herbicida de N-fosfonometilglicina (incluida cualquier sal de la misma) y otras formas que resulten en la producción del anión glifosato en planta. Una “proteína de resistencia al herbicida” o una proteína resultante de la expresión de una “molécula de ácido nucleico que codifica para la resistencia al herbicida” incluyen proteínas que le confieren a una célula la habilidad para tolerar una concentración mayor de un herbicida que las células que no expresan la proteína, o para tolerar una cierta concentración de un herbicida durante un periodo de tiempo más largo que las células que no expresan la proteína. Una “proteína de resistencia al glifosato” incluye a una proteína que le confiere a una célula la habilidad para tolerar una mayor concentración de glifosato que las células que no expresan la proteína, o para tolerar una cierta concentración de glifosato durante un periodo de tiempo más largo que las células que no expresan la proteína. Por “tolerar” o “tolerancia” se entiende ya sea la supervivencia, o llevar a cabo funciones celulares esenciales tales como la síntesis de proteínas y respiración en una forma que no es fácilmente discernible a partir de las células no tratadas.

Moléculas Aisladas de Ácido Nucleico, y Variantes y Fragmentos de las Mismas

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas aisladas de ácido nucleico que contienen secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de tolerancia al glifosato o porciones biológicamente activas de las mismas, así como moléculas de ácido nucleico suficientes para ser usadas como sondas de hibridación para identificar ácidos nucleicos que codifican para la tolerancia al glifosato. Como se lo utiliza aquí, el término “molécula de ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado utilizando análogos de nucleótido. La molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen a las secuencias expuestas en las SEQ ID Nos.: 1, 3 y 5, a la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato depositada en un huésped bacteriano con los números de Acceso NRRL B-30888 y NRRL B-30949, y variantes, fragmentos, y complementos de las mismas. Por “complemento” se entiende una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria a una secuencia dada de nucleótidos de tal manera que pueda hibridar a la secuencia dada de nucleótido para formar así un dúplex estable. La secuencia correspondiente de aminoácidos para la proteína de tolerancia al glifosato codificada por estas secuencias de nucleótidos está expuesta en las SEQ ID Nos.: 2, 4 ó 6. La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias de nucleótidos que codifican proteínas de tolerancia al glifosato de longitud parcial, y complementos de las mismas.

Una molécula de ácido nucleico o proteína “aislada” o “purificada”, o porción biológicamente activa de las mismas, está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se las produce por medio de técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se las sintetiza químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está libre de secuencias (preferiblemente secuencias que codifican proteína) que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico. Para propósitos de la invención, “aislado” cuando se lo utiliza para referirse a moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en diferentes modalidades, la molécula aislada de ácido nucleico que codifica para la tolerancia al glifosato puede contener aproximadamente menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, 0,1 kb de secuencia de nucleótido que flanquea naturalmente la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula a partir de la cual

se deriva el ácido nucleico. Una proteína de tolerancia al herbicida que esté sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tengan aproximadamente menos del 30%, 20%, 10% ó 5% (en peso seco) de proteína sin tolerancia al herbicida (también denominada aquí como una “proteína contaminante”).

5 Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican para la tolerancia al glifosato son también abarcadas por la presente invención. Por “fragmento” se entiende una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica a la proteína de tolerancia al glifosato. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción biológicamente activa de una proteína de tolerancia al glifosato, o puede ser un fragmento que puede ser utilizado como una sonda de hibridación o iniciador de PCR utilizando métodos descritos
10 más abajo. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato incluyen aproximadamente al menos 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de longitud completa de nucleótidos que codifican para tolerancia al glifosato divulgada aquí (por ejemplo, 1892
15 nucleótidos para la SEQ ID No.: 1, 1259 nucleótidos para la SEQ ID No.: 3, y 1242 nucleótidos para la SEQ ID No.: 5). Por nucleótidos “contiguos” se entiende residuos de nucleótidos que están inmediatamente adyacentes entre sí.

Los fragmentos de las secuencias de nucleótidos de la presente invención generalmente codificarán fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína de longitud completa de tolerancia al glifosato, es decir, actividad de tolerancia al herbicida. Por “retiene la actividad de tolerancia al herbicida” se entiende que el fragmento
20 tendrá aproximadamente al menos 30%, aproximadamente al menos 50%, aproximadamente al menos 750%, o aproximadamente al menos 80% de la actividad de tolerancia al herbicida de las proteínas de longitud completa de tolerancia al glifosato divulgadas aquí como las SEQ ID Nos.: 2, 4 ó 6. Los métodos para medir la actividad de resistencia al herbicida son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4.535.060, y 5.188.642,
25 cada una de las cuales es incorporada aquí como referencia en su totalidad.

Un fragmento de secuencia de nucleótidos que codifica para la tolerancia al glifosato que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará aproximadamente al menos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en
30 una proteína de longitud completa de tolerancia al glifosato de la invención (por ejemplo, 436 aminoácidos para la SEQ ID No.: 2, 413 aminoácidos para la SEQ ID No.: 4, y 413 aminoácidos para la SEQ ID No.: 6).

Las proteínas de tolerancia al glifosato de la presente invención son codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos.: 1, 3 ó 5. El término “suficientemente idéntica” se refiere a una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que tiene aproximadamente al menos 60% ó
35 65% de identidad de secuencia, aproximadamente 70% ó 75% de identidad de secuencia, aproximadamente 80% u 85% de identidad de secuencia, aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia comparada con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineación descritos aquí utilizando parámetros estándar. Alguien capacitado en el arte reconocerá que estos valores se pueden
40 ajustar apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración del codón, la similitud de aminoácidos, la ubicación del marco de lectura, y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleico, se alinean las
45 secuencias para propósitos de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones de superposición) x 100). En una modalidad, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a aquellas descritas más adelante, con o sin permitir vacíos. En el cálculo del
50 porcentaje de identidad, se cuentan típicamente las correspondencias exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Tal algoritmo está incorporado en los programas BLASTN y
55 BLASTX de Altschul y colaboradores, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. La búsqueda de nucleótidos por BLAST se puede llevar a cabo con el programa BLASTN, puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico tipo GDC de la invención. Las búsquedas de proteína por BLAST se pueden llevar a cabo con el programa BLASTX, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de resistencia al herbicida de la invención. Para obtener alineamientos de vacíos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y colaboradores, (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Alternativamente, se puede utilizar PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda reiterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Ver Altschul y colaboradores, (1997) más arriba. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). Ver
65 www.ncbi.nlm.nih.gov. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins y colaboradores, (1994) Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o de ADN, y así puede proporcionar datos

acerca de la conservación de la secuencia, de la secuencia completa de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se utiliza en diferentes paquetes comercialmente disponibles de software para análisis de ADN/aminoácidos, tales como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad de los aminoácidos. Un ejemplo no limitante de un programa de software útil para el análisis de alineaciones ClustalW es GeneDoc™. Genedoc™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud e identidad de los aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4: 11-17. Tal algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que hace parte del paquete de software para alineación de secuencias GCG (que puede ser obtenido con Accelrys, Inc., San Diego, CA). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de vacíos de 12, y una penalización por vacío de 4.

A menos que se establezca otra cosa, se utilizará GAP Versión 10, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3): 443-453, para determinar la identidad o similitud de secuencia utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando un GAP Weight de 50 y un Length Weight de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un GAP Weight de 8 y una Length Weight de 2, y el programa de puntuación BLOSUM62. Se pueden utilizar también programas equivalentes. Por “programa equivalente” se entiende cualquier programa de comparación de secuencia que, para dos secuencias cualesquiera bajo investigación, genera una alineación que tiene correspondencias idénticas de residuos de nucleótidos y un porcentaje idéntico de identidad de secuencia cuando se la compara con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

La invención también abarca variantes de moléculas de ácido nucleico. Las “variantes” de las secuencias de nucleótidos que codifican para la tolerancia al glifosato incluyen a aquellas secuencias que codifican a la proteína de tolerancia al glifosato divulgadas allí pero que difieren conservativamente debido a la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas como se discutió anteriormente (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, y 32 son variantes de la SEQ ID NO: 1). Las variantes alélicas de ocurrencia natural se pueden identificar con el uso de técnicas conocidas de biología molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se indica a continuación. Las variantes de secuencias de nucleótidos también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que han sido generadas, por ejemplo, por medio del uso de mutagénesis dirigida al sitio pero la cual aún codifica a las proteínas de tolerancia al glifosato divulgadas en la presente invención como se discute más adelante. Las variantes de proteínas abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir que ellas retienen la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, la actividad de tolerancia al herbicida. Por “retiene la actividad de tolerancia al glifosato” se entiende que la variante tundra aproximadamente al menos 30%, aproximadamente al menos 50%, aproximadamente al menos 70%, o aproximadamente al menos 80% de la actividad de tolerancia al glifosato de la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad de resistencia al herbicida son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4.535.060, y 5.188.642, cada una de las cuales está incorporada aquí como referencia en su totalidad.

La persona capacitada se dará cuenta además que se pueden introducir cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de la invención conduciendo así a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de tolerancia al glifosato, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. De este modo se pueden crear variantes de moléculas aisladas de ácido nucleico por medio de la introducción de una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos en la correspondiente secuencia de nucleótidos descrita aquí, de tal manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones por medio de técnicas estándar, tal como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Tales variantes de las secuencias de nucleótidos son también abarcadas por la presente invención.

Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos predichos de aminoácidos no esenciales. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo silvestre de la proteína de tolerancia al glifosato sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere de un residuo de aminoácido “esencial” para la actividad biológica. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la cual se reemplaza el residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el estado del arte. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en regiones no conservadas que retiene la función. En general, no se harían tales sustituciones para residuos conservados de aminoácidos, o para residuos de aminoácidos que residen dentro de un motivo conservado, donde tales residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Sin embargo, alguien capacitado en el arte entendería que las variantes funcionales pueden tener alteraciones menores conservadas o no conservadas en los residuos conservados.

Lys-22, Arg-124, Asp-313, Arg-344, Arg-386, y Lys-411, son residuos conservados de la EPSP sintasa de *E. coli* (Schönbrunn y colaboradores, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1376-1380). Los residuos conservados importantes para la actividad de la EPSP sintasa también incluyen Arg-100, Asp-242, y Asp-384 (Selvapandian y

ES 2 332 380 T3

colaboradores, (1995) FEBS Letters 374: 253-256). Arg-27 se enlaza a S3P (Shuttleworth y colaboradores, (1999) Biochemistry 38: 296-302).

Alternativamente, se pueden elaborar variantes de secuencias de nucleótidos por medio de la introducción aleatoria de mutaciones a lo largo de toda o de parte de la secuencia de codificación, por ejemplo por medio de mutagénesis por saturación, y se pueden seleccionar los mutantes resultantes por la habilidad para conferir actividad de tolerancia al glifosato para identificar mutantes que retienen actividad. Después de la mutagénesis, se puede expresar en forma recombinante la proteína codificada, y se puede determinar la actividad de la proteína utilizando técnicas estándar de ensayo.

Utilizando métodos tales como PCR, hibridación y similares se pueden identificar las correspondientes secuencias de tolerancia al glifosato, teniendo tales secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Ver, por ejemplo, Sambrook y Russell, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, y colaboradores, (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, St. Louis, MO).

En un método de hibridación, se puede utilizar todo o parte de la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato para seleccionar bibliotecas genómicas o de ADNc. Los métodos para la construcción de tales bibliotecas genómicas y de ADN son generalmente conocidos en el arte y están descritos en Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba). Las así llamadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y pueden ser marcados con un grupo detectable tal como ^{32}P , o cualquier otro marcador detectable, tal como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Se pueden elaborar sondas para hibridación marcando oligonucleótidos sintéticos con base en la(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) la resistencia al glifosato descrita(s) aquí. Pueden utilizarse adicionalmente los iniciadores degenerados diseñados con base en los nucleótidos conservados o en los residuos de aminoácidos en la secuencia de nucleótidos o en la secuencia codificada de aminoácidos. La sonda contiene típicamente una región de una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones estrictas al menos aproximadamente hasta 12, al menos aproximadamente hasta 25, al menos aproximadamente hasta 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, ó 1800 nucleótidos consecutivos de una secuencia(s) de nucleótidos de la invención o de un fragmento o una variante de los mismos que codifica(n) la resistencia al glifosato. Los métodos para la preparación de sondas para hibridación son generalmente conocidas en el arte y están descritas en Sambrook y Russell (2001) (ver más arriba), y Sambrook y colaboradores, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), ambos incorporados aquí como referencia.

Por ejemplo, se puede utilizar una secuencia entera de resistencia al glifosato descrita aquí, o una o más porciones de la misma, como sonda capaz de hibridar específicamente a las correspondientes secuencias de resistencia al herbicida y los ARN mensajeros. Para lograr una hibridación específica bajo una variedad de condiciones, tales sondas incluyen secuencias que son únicas y son aproximadamente de 10 nucleótidos de longitud, y aproximadamente al menos de 20 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar tales sondas para amplificar las correspondientes secuencias de tolerancia al glifosato de un organismo escogido por PCR. Se puede utilizar esta técnica para aislar secuencias adicionales de codificación de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias de codificación en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen selección por hibridación de bibliotecas de ADN sembradas en placa (ya sea placas o colonias; ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Se puede llevar a cabo la hibridación de tales secuencias bajo condiciones estrictas. Por “condiciones estrictas” o “condiciones estrictas de hibridación” se entiende condiciones bajo las cuales una sonda hibridará a su secuencia objetivo hasta un grado de detección mayor que para otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el fondo). Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o de lavado, se pueden identificar secuencias objetivo que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, se pueden ajustar las condiciones de rigurosidad para permitir alguna desalineación en las secuencias de tal manera que se detectan menores grados de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda es aproximadamente menor a 1000 nucleótidos de longitud, o aproximadamente menor a 500 nucleótidos de longitud.

Típicamente, condiciones estrictas serán aquellas en las cuales la concentración de sal es aproximadamente menor a 1,5 M de ion Na, típicamente una concentración aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de ion Na (o de otras sales) a pH 7,0-8,3 y la temperatura es aproximadamente al menos de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y aproximadamente al menos 60°C para sondas más largas (por ejemplo, superiores a 50 nucleótidos). Se pueden lograr también condiciones estrictas con la adición de agentes de desestabilización tales como formamida. Los ejemplos de condiciones de baja rigurosidad incluyen la hibridación con una solución amortiguadora de formamida al 30-35%, NaCl 1 M, SDS al 1% (dodecil sulfato de sodio) a 37°C, y un lavado 1X a 2X con SSC (20 veces con SSC = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a 50-55°C. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderadas incluyen hibridación en formamida al 40-45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C y lavado en 0,5X a 1X de SSC a 55-60°C. Los ejemplos de condiciones altamente rigurosas incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1X de SSC a 60-65°C. Opcionalmente, los amortiguadores de lavado pueden contener SDS aproximadamente al 0,1% hasta aproximadamente el 1%. La duración de la hibridación es generalmente aproximadamente menor a 24 horas, usualmente aproximadamente de 4 hasta aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente la función de lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución final de lavado. Para híbridos ADN-ADN, se puede aproximar la T_m a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de form.}) - 500/L$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % e GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % de form. es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la cual 50% de la secuencia objetivo complementaria hibrida a una sonda perfectamente alineada. T_m se reduce aproximadamente en 1°C por cada 1% de desalineación; de este modo, se pueden ajustar las condiciones de T_m , hibridación, y/o lavado para hibridar hasta secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con identidad $\geq 90\%$, se puede disminuir la T_m en 10°C . Generalmente se seleccionan las condiciones rigurosas para ser aproximadamente 5°C menores que el punto térmico de fusión T_m para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 1, 2, 3 ó 4°C por debajo del punto térmico de fusión (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C por debajo del punto térmico de fusión (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C por debajo del punto térmico de fusión (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones e hibridación y de lavado, y la T_m deseada, aquellos normalmente capacitados entenderán que están inherentemente descritas las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o de lavado. Si el grado deseado de desalineación resulta en una T_m de menos de 45°C (solución acuosa) ó 32°C (solución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de modo que se puede utilizar una mayor temperatura. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I. Chapter 2 (Elsevier, New York); y en Ausubely colaboradores, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Ver Sambrook y colaboradores, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Proteínas Aisladas y Variantes y Fragmentos de las Mismas

Las proteínas de tolerancia al glifosato están también comprendidas dentro de la presente invención. Por proteína de tolerancia al glifosato se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID Nos.: 2, 4 ó 6. También se suministran fragmentos, porciones biológicamente activas, y variantes de las mismas, y pueden ser utilizadas para practicar los métodos de la presente invención.

Los "fragmentos" o las "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos de polipéptidos que contienen una porción de una secuencia de aminoácidos que codifican una proteína de tolerancia al glifosato como la expuesta en las SEQ ID Nos.: 2, 4 ó 6 y que retiene la actividad de tolerancia al glifosato. Una porción biológicamente activa de proteína de tolerancia al glifosato puede ser un polipéptido que sea, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Tales porciones biológicamente activas pueden ser preparadas por medio de técnicas recombinantes y evaluadas por la actividad de tolerancia al glifosato. Los métodos para medir la actividad de resistencia al herbicida son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 4.535.060 y 5.188.642 las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Como se lo utiliza aquí, un fragmento contiene al menos 8 aminoácidos contiguos de las SEQ ID Nos.: 2, 4 ó 6. Sin embargo, la invención comprende otros fragmentos, tal como cualquier fragmento en la proteína aproximadamente superior a 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, ó 400 aminoácidos.

Por "variantes" se entiende proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60%, 65%, aproximadamente al menos 70%, 75%, aproximadamente al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 4, ó 6 (por ejemplo, las SEQ ID NO: 6, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, y 33 son variantes de la SEQ ID NO: 2). Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida a la molécula de ácido nucleico de las SEQ ID Nos.: 1, 3 ó 5, o un complemento de la misma, bajo condiciones estrictas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, que aún poseen la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, retienen la actividad de tolerancia al glifosato. Los métodos para medir la actividad de resistencia al herbicida son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos.: 4.535.060 y 5.188.642, las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Los genes bacterianos, tales como los genes *grg23* o *grg51* de esta invención, muy a menudo poseen múltiples codones de iniciación de metionina en la proximidad del inicio del marco de lectura abierta. A menudo, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones de inicio conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de inicio pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias tales como *Bacillus sp.* También reconocen al codón GTG como un codón de inicio, y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. Además, a menudo no se determina *a priori* cuál de estos codones son utilizados naturalmente en la bacteria. Por lo tanto, se entiende que el uso de uno de los codones alternos de metionina puede conducir a la generación de variantes de *grg23* o *grg51* que confieran tolerancia al glifosato. Estas proteínas de tolerancia al glifosato son abarcadas por la presente invención y pueden ser utilizadas en los métodos de la presente invención.

Anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención, o para variantes o fragmentos de los mismos, son también abarcados. Los métodos para la producción de anticuerpos son conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); la patente estadounidense No. 4.196.265).

5

Variantes Alteradas o Mejoradas

Se reconoce que la secuencia de ADN de *grg23* o *grg51* puede ser alterada por diferentes métodos, y que estas alteraciones pueden resultar en secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes que aquellas codificadas por *grg23* o *grg51*. Esta proteína puede ser alterada en diferentes formas incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína GRG23 o GRG51 por medio de mutaciones en el ADN. Esto se puede lograr también por medio de una de varias formas de mutagénesis y/o por medio de evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectará sustancialmente la función de la proteína. Tales variantes poseerán la actividad deseada de tolerancia al glifosato. Sin embargo, se entiende que la habilidad de GRG23 o GRG51 para conferir tolerancia al glifosato puede ser mejorada por medio del uso de tales técnicas en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, GRG23 o GRG51 se pueden expresar en células huésped que exhiben altas tasas de incorporación errada de bases durante la replicación del ADN, tal como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en tales cepas, se puede aislar el ADN de *grg23* o *grg51* (por ejemplo por medio de la preparación de ADN de plásmido, o por medio de amplificación por PCR y clonación del fragmento resultante por PCR en un vector) y cultivarlo en cepas no mutagénicas. Los clones que contienen mutaciones en *grg23* o *grg51* pueden ser identificados midiendo la resistencia mejorada a un herbicida tal como el glifosato, por ejemplo cultivando células en cantidades crecientes de glifosato y analizando los clones que confieran tolerancia a concentraciones crecientes de glifosato.

Alternativamente, se pueden hacer alteraciones a la secuencia de la proteína de muchas proteínas en el terminal amino o carboxilo sin afectar sustancialmente la actividad. Estas alteraciones pueden incluir inserciones, supresiones o alteraciones introducidas por medio de métodos moleculares modernos, tales como PCR, incluidas amplificaciones por PCR que alteran o extienden la secuencia de codificación de la proteína en virtud de la inclusión de secuencias que codifican aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteína añadidas pueden incluir secuencias enteras que codifican proteína, tal como aquellas utilizadas comúnmente en el arte para generar fusiones de proteína. Tales proteínas de fusión son utilizadas a menudo para (1) incrementar la expresión de una proteína de interés; (2) introducir un dominio de enlazamiento, actividad enzimática o un epítipo para facilitar o bien la purificación de proteína, la detección de proteína u otros usos experimentales conocidos en el arte; o, (3) secreción objetivo o traducción de una proteína a un organelo subcelular, tal como el espacio periplasmático de bacterias gram negativas, o el retículo endoplasmático de células eucariotas, el último de los cuales a menudo resulta en glicosilación de la proteína.

Las variantes de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de la presente invención también abarcan secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos tales como el arrastre de ADN. Con tal procedimiento, una o más regiones diferentes de proteínas que codifican proteína de tolerancia al glifosato pueden ser utilizadas para crear una nueva proteína de tolerancia al glifosato que posee las propiedades deseadas. En esta forma, se generan bibliotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencias relacionadas que contienen regiones de secuencia que tienen una identidad sustancial de secuencia y pueden ser recombinadas en forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, utilizando esta aproximación, se pueden arrastrar motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre el gen de tolerancia al glifosato de la invención y otros genes de resistencia al herbicida para obtener un nuevo gen que codifica para una proteína con una propiedad mejorada de interés, tal como una mayor actividad de resistencia al glifosato. Las estrategias para tal arrastre del ADN son conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Crameri y colaboradores, (1997) *Nature Biotech.* 15: 436-438; Moore y colaboradores, (1997) *J. Mol. Biol.* 272: 336-347; Zhang y colaboradores, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4504-4509; Crameri y colaboradores, (1998) *Nature* 391: 288-291; y las patentes estadounidenses Nos. 5.605.793 y 5.837.458.

55

Transformación de Células Bacterianas o de Plantas

Se proporcionan aquí nuevos genes aislados que confieren tolerancia al glifosato. También se proporcionan secuencias de aminoácidos de las proteínas GRG23 y GRG51. La proteína resultante de la traducción de este gen permite que las células funcionen en presencia de concentraciones de un herbicida que son por lo demás tóxicas para las células de plantas y células bacterianas. En un aspecto de la invención, el gen *grg23* o *grg51* es útil como marcador para evaluar la transformación de células bacterianas o de plantas.

Por medio de una modificación por ingeniería genética de *grg23* o *grg51* para que (1) se expresen a partir de un promotor bacteriano que se sabe que estimula la transcripción en el organismo que va a ser analizado, (2) sean adecuadamente traducidos para generar un péptido intacto GRG23 o GRG51, y (3) colocando las células en una concentración por lo demás tóxica de herbicida, se pueden identificar las células que han sido transformadas con ADN en virtud de su resistencia al herbicida. Por "promotor" se entiende una secuencia de ácido nucleico que sirve para

transcripción directa de una secuencia de codificación secuencia abajo. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de transcripción y de traducción (también llamadas “secuencias de control”), es necesario para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

5 La transformación de células bacterianas se logra por medio de una de varias técnicas conocidas en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, electroporación o transformación química (ver, por ejemplo, Ausubel (ed.) (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., Indianapolis, IN)). Los marcadores que confieren resistencia a sustancias tóxicas son útiles en la identificación de células transformadas (habiendo incorporado y expresado el ADN de prueba), de células no transformadas (aquellas que no contienen o no expresan el ADN de prueba). En un aspecto de la invención, el gen *grg23* o *grg51* es útil como marcador para evaluar la transformación de células bacterianas o de plantas.

15 La transformación de células de plantas se puede lograr en una forma similar. Por “planta” se entienden plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células de plantas, propágulos, embriones y progenie de los mismos. Las células de las plantas pueden ser diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callos, células en un cultivo en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíz, células de floema, polen). “Plantas transgénicas” o “plantas transformadas” o plantas “transformadas en forma estable”, células o tejidos se refieren a plantas que han incorporado o integrado secuencias exógenas de ácido nucleico o fragmentos de ADN en la célula de la planta. Por “transformación estable” se entiende que la construcción de nucleótido introducida en una planta se integra en el genoma de la planta y puede ser heredada por la progenie de la misma.

20 El gen *grg23* o *grg51* de la invención puede ser modificado para obtener una expresión mejorada en células de plantas. Las secuencias de tolerancia al glifosato de la invención pueden ser suministradas en casetes de expresión para expresión en la planta de interés. El “casete de expresión de la planta” incluye construcciones de ADN que pueden dar como resultado la expresión de una proteína de un marco de lectura abierto en una célula de una planta. El casete incluirá en la dirección 5’-3’ de transcripción, una región de iniciación de la transcripción (es decir, promotora) operativamente enlazada a una secuencia de ADN de la invención, y una región de terminación de la transcripción y de la traducción (es decir, una región de terminación) funcionales en las plantas. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional que va a ser transformado conjuntamente en el organismo, tal como un gen marcador seleccionable. Alternativamente, se puede(n) suministrar un gen(es) adicional(es) sobre múltiples casetes de expresión. Tal casete de expresión cuenta con una pluralidad de sitios de restricción para inserción de la secuencia de tolerancia al glifosato que está bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

35 El promotor puede ser nativo o análogo, o exterior o heterólogo, a la planta huésped y/o a la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Donde el promotor es “nativo” u “homólogo” a la planta huésped, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa dentro de la cual se introduce el promotor. Donde el promotor es “exterior” o “heterólogo” a la secuencia de ADN de la invención, se entiende que el promotor no es el promotor nativo o de ocurrencia natural para la secuencia de ADN operativamente enlazada de la invención. “Heterólogo” generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma nativo en el cual están presentes, y han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, o similares. Por “operativamente enlazado” se entiende un enlazamiento funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, operativamente enlazado significa que las secuencias de ácido nucleico que va a ser enlazadas son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones de codificación de proteína, en forma contigua y en el mismo marco de lectura.

45 A menudo, tales construcciones contendrán también regiones no traducidas 5’ y 3’. Tales construcciones pueden contener una “secuencia de señal” o “secuencia líder” para facilitar el transporte en forma conjunta con la traducción o posterior a la traducción del péptido de interés para ciertas estructuras intracelulares tales como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplasmático, o el aparato de Golgi, o son secretadas. Por ejemplo, se puede modificar por ingeniería genética el gen para contener un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. Por “secuencia de señal” se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que resulta en el transporte de un péptido en forma conjunta con la traducción o posterior a la traducción a través de la membrana de la célula. En eucariotas, este transporte involucra típicamente secreción dentro del aparato de Golgi, resultando en alguna glicosilación. Por “secuencia líder” se entiende cualquier secuencia que cuando es traducida, resulta en una secuencia de aminoácidos suficiente para activar el transporte en forma conjunta con la traducción de la cadena peptídica a un organelo subcelular. Por lo tanto, esto incluye secuencias líder que dirigen el transporte y/o la glicosilación por medio de un pasaje al retículo endoplasmático, a las vacuolas, plástidos incluidos cloroplastos, mitocondria y similares. Se puede modificar también por ingeniería genética el casete de expresión de la planta para contener un intrón, de tal manera que se requiere el procesamiento del ARNm del intrón para expresión.

65 Por “región 3’ no traducida” se entiende una secuencia de nucleótido localizada secuencia debajo de una secuencia de codificación. Las secuencias de la señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3’ del precursor de ARNm son regiones 3’ no traducidas. Por “región 5’ no traducida” se entiende una secuencia de nucleótidos localizada secuencia arriba de una secuencia de codificación.

Otros elementos no traducidos secuencia arriba o secuencia abajo incluyen reforzadores. Los reforzadores son secuencias de nucleótidos que actúan para incrementar la expresión de una región promotora. Los reforzadores son conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, la región reforzadora del SV40 y al elemento reforzador 35S.

5 La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de tolerancia al glifosato de la presente invención, o se puede derivar de otra fuente. Las regiones convenientes de terminación están disponibles a partir del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como las regiones de terminación de la octopina sintasa y la nopalina sintasa. Ver también, Guerineau y colaboradores, (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon y colaboradores, (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen y colaboradores, (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe y colaboradores, (1990) Gene 91: 151-158; Ballas y colaboradores, (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; y Joshi y colaboradores, (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

15 Cuando sea apropiado, se puede(n) optimizar el(los) gen(es) para una mayor expresión en la célula huésped transformada. Esto es, se pueden sintetizar los genes utilizando codones preferidos de la célula huésped para una expresión mejorada, o se los puede sintetizar utilizando codones con una frecuencia de uso del codón preferida para el huésped. Generalmente, se incrementará el contenido de GC del gen. Ver, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92: 1-11 para una discusión del uso del codón preferido para el huésped. Se conocen métodos en el estado del arte para sintetizar genes preferidos para el huésped. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 6.320.100; 6.075.185; 5.380.831; y 5.436.391, las solicitudes estadounidenses publicadas Nos. 20040005600 y 20010003849, y Murray y colaboradores, (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477-498, incorporados aquí como referencia.

25 En una modalidad, los ácidos nucleicos de interés están dirigidos al cloroplasto para expresión. En esta forma, cuando el ácido nucleico de interés no es insertado directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido de transito para dirigir al producto génico de interés a los cloroplastos. Tales péptidos de transito son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Von Heijne y colaboradores, (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clark y colaboradores, (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544-17550; Della-Cioppa y colaboradores, (1987) Plant Physiol. 84: 965-968; Romer y colaboradores, (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414-1421; y Shah y colaboradores, (1986) Science 233: 478-481.

30 Los ácidos nucleico de interés que son dirigidos al cloroplasto se pueden optimizar para expresión en el cloroplasto para explicar las diferencias en el uso del codón entre el núcleo de la planta y este organelo. En esta forma, se pueden sintetizar los ácidos nucleicos de interés utilizando codones preferidos para los cloroplastos. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.380.831, incorporada aquí como referencia.

35 Típicamente, se insertará este “casete de expresión de la planta” en un “vector de transformación de la planta”. Por “vector de transformación” se entiende una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente de una célula. Tal molécula puede consistir de uno o más casetes de expresión, y puede ser organizada en más de una molécula “vector” de ADN. Por ejemplo, los vectores binarios son vectores para transformación de una planta que utilizan dos vectores no contiguos de ADN para codificar todas las funciones requisito que actúan en forma cis y trans para transformación de células de plantas (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5: 446-451). “Vector” se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para transferencia entre diferentes células huésped. “Vector de expresión” se refiere a un vector que tiene la habilidad para incorporar, integrar y expresar secuencias heterólogas de ADN o fragmentos en una célula foránea.

45 Este vector para transformación de una planta puede contener uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica común en el arte utilizar vectores para transformación de una planta que contengan más de un segmento contiguo de ADN. Estos vectores a menudo son denominados en el arte como “vectores binarios”. Los vectores binarios así como los vectores con plásmidos auxiliares son más comúnmente utilizados para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr la transformación eficiente es muy grande, y es conveniente separar funciones en moléculas separadas de ADN. Los vectores binarios típicamente contienen un vector de plásmido que contiene las secuencias que actúan en forma cis necesarias para la transferencia de ADN-T (tales como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable que es modificado por ingeniería genética que sea capaz de expresión en la célula de una planta, y un “gen de interés” (un gen modificado por ingeniería genética para que sea capaz de expresión en una célula de una planta para la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes sobre este vector de plásmido las secuencias requeridas para replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en forma cis están dispuestas en una forma para permitir la transferencia eficiente en células de plantas y la expresión allí dentro. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen de interés se localizan entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo un segundo vector de plásmido contiene los factores que actúan en forma trans que median la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a células de plantas. Este plásmido contiene a menudo las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de células de planta por *Agrobacterium*, y la transferencia de ADN por escisión en las secuencias del borde y la transferencia de ADN mediada por vir, como se entiende en el arte (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5: 446-451). Se pueden utilizar diferentes tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación de una planta. El segundo vector de plásmido no es necesario para la transformación de las plantas por otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilén glicol, etc.

Transformación de una Planta

Los métodos de la invención involucran la introducción de una construcción de nucleótido dentro de una planta. Por “introducción” se entiende presentar a la planta la construcción de nucleótido de tal manera que la construcción tenga acceso al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren de la utilización de un método particular para la introducción de una construcción de nucleótido a una planta, únicamente que la construcción del nucleótido gane acceso al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducción de construcciones de nucleótido dentro de plantas son conocidos en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria, y métodos mediados por virus.

En general, los métodos para transformación de plantas involucran la transferencia de ADN heterólogo en células objetivo de plantas (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos no diferenciados, protoplastos, etc.) seguido por la aplicación de un nivel máximo de umbral de selección apropiada (dependiendo del gen marcador seleccionable y en este caso “glifosato”) para recuperar las células transformadas de las plantas de un grupo de una masa de células no transformadas. Típicamente se transfieren los explantes a un suministro fresco del mismo medio y se los cultiva en forma rutinaria. Posteriormente, se diferencian las células transformadas en brotes después de colocarlos sobre medio de regeneración suplementado con un nivel máximo de umbral de agente de selección (por ejemplo, “glifosato”). Se transfieren luego los brotes a un medio selectivo de enraizamiento para recuperar los brotes con raíces o plántulas. Las plántulas transgénicas crecen luego hasta plantas maduras y producen semillas maduras (por ejemplo, Hiei y colaboradores, (1994) *The Plant Journal* 6: 271-282; Ishida y colaboradores, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750). Típicamente se transfieren los explantes a un suministro fresco del mismo medio y se los cultiva en forma rutinaria. Una descripción general de las técnicas y métodos para la generación de plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120. Ya que el material transformado contiene muchas células, están presentes tanto células transformadas como no transformadas en cualquier pedazo de callo objetivo sometido o tejido o grupo de células. La habilidad para matar células no transformadas y permitir que proliferen las células transformadas resulta en cultivos de plantas transformadas. A menudo, la habilidad para remover células no transformadas es una limitación para una recuperación rápida de células de plantas transformadas y la generación exitosa de plantas transgénicas. Se pueden utilizar métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de plantas transgénicas.

La generación de plantas transgénicas se puede realizar por medio de uno de varios métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, la introducción de ADN heterólogo por medio de *Agrobacterium* en células de plantas (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células de plantas con ADN foráneo heterólogo adherido a partículas, y diferentes otros métodos no mediados directamente por partículas (por ejemplo, Hiei y colaboradores, (1994) *The Plant Journal* 6: 271-282; Ishida y colaboradores, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750; Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239; Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120) para transferir ADN.

Los métodos para transformación de cloroplastos son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Svab y colaboradores, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8526-8530; Svab y Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917; Svab y Maliga (1993) *EMBO J.* 12: 601-606. El método se basa en una pistola de partículas para el suministro de ADN que contiene un marcador seleccionable y dirigir el ADN al genoma del plástido a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, se puede lograr la transformación del plástido por medio de transactivación de un transgén silencioso soportado por el plástido por medio de expresión preferida por el tejido de una ARN polimerasa dirigida al plástido y codificada en el núcleo. Tal sistema ha sido reportado en McBride y colaboradores, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7301-7305.

Las células que han sido transformadas pueden ser cultivadas en plantas de acuerdo con medios convencionales. Ver, por ejemplo, McCormick y colaboradores, (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Se pueden cultivar luego estas plantas, y o bien polinizadas con la misma cepa transformada o con cepas diferentes, y el híbrido resultante que tiene expresión constitutiva de la característica fenotípica identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada sea mantenida y heredada en forma estable y luego se cosechan las semillas para garantizar que se ha logrado la expresión de las características fenotípicas deseadas. De esta forma, la presente invención proporciona semilla transformada (también denominada como “semilla transgénica”) que tiene una construcción de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado en forma estable en su genoma.

Medición de la actividad de EPSPS

En una modalidad de la presente invención, la enzima EPSPS de tolerancia al glifosato tiene una K_m para fosfoenolpiruvato (PEP) aproximadamente entre 1 y aproximadamente 150 μM , incluyendo aproximadamente 2 μM , aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 o aproximadamente 140 μM , y un K_i (glifosato)/ K_m (PEP) aproximadamente entre 500 y aproximadamente 1000, aproximadamente 550, aproximadamente 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o aproximadamente hasta 1000. Como se utiliza aquí, K_m y K_i se miden bajo condiciones en las cuales la enzima obedece la cinética de Michaelis-Menten, alrededor de pH 7. Una técnica de medición no limitante utiliza la enzima en forma purificada en cloruro de potasio amortiguador HEPES a pH 7 a temperatura ambiente y utiliza concentraciones de glifosato de 0 a 10 mM.

Se puede analizar la actividad cinética de EPSPS, por ejemplo, midiendo la liberación de fosfato que resulta durante la catálisis de un sustrato de EPSPS (por ejemplo, PEP y S3P) hasta su posterior producto de reacción (por ejemplo, ácido 5-enolpiruvil-3-fosfoshiquímico utilizando un ensayo fluorescente descrito por Vázquez y colaboradores, (2003) Anal. Biochem. 320(2): 292-298. Este ensayo se basa en la oxidación del compuesto no fluorescente N-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina (Amplex[®] Red, Invitrogen, Carlsbad, CA) hasta el compuesto fluorescente resorufina por medio de peróxido de hidrógeno (Zhou y Panchuk-Voloshina (1997) Anal. Biochem. 253: 169-174). La reacción se basa en la utilización de fosfato por la purina nucleósido fosforilasa (PNP), xantina oxidasa (XOD), y peroxidasa de rábano (HRP). La liberación de fosfato está enlazada con el nivel de fluorescencia que resulta de la conversión de Amplex[®] Red en resorufina. Se puede medir la fluorescencia, por ejemplo, utilizando un filtro fluorométrico, un lector de placas, un espectrofluorómetro, un espectrofotómetro, o similares, utilizando métodos bien conocidos en el arte. La fluorescencia generada por la reacción puede ser detectada utilizando un fluorómetro para excitación en el rango aproximadamente de 530 hasta aproximadamente 560 nm y una emisión aproximadamente de 590 nm. Se puede detectar la absorbancia (por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro un lector de placas) aproximadamente a 565 nm.

En una modalidad, la presente invención abarca una alteración de las condiciones de ensayo previamente reportadas para extender el rango dinámico del ensayo para acomodar un rango más amplio de concentraciones de sustrato. Las alteraciones incluyen una concentración de XOD de al menos 1 U/ml, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,25 U/ml, aproximadamente 1,25 hasta aproximadamente 1,5 U/ml, aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2 U/ml, o superior a 2 U/ml; una concentración de PNP superior a 0,1 U/ml, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 U/ml, aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1 U/ml, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,5 U/ml, aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2 U/ml, o superior a 2 U/ml; y una concentración de Amplex[®] Red superior a 100 μ M, aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 μ M, aproximadamente 200 hasta aproximadamente 300 μ M, aproximadamente 300 hasta aproximadamente 400 μ M, aproximadamente 400 hasta aproximadamente 500 μ M, aproximadamente 500 hasta aproximadamente 600 μ M, aproximadamente 700 hasta aproximadamente 800 μ M, aproximadamente 800 hasta aproximadamente 900 μ M, aproximadamente 900 hasta aproximadamente 1000 μ M, o aproximadamente superior a 1000 μ M. Esta modificación se puede aplicar a ensayos que miden la actividad cinética de cualquier enzima en los cuales se libera fosfato durante una reacción catalizada por la enzima.

30 Plantas

La presente invención puede ser utilizada para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo, pero sin limitarse a, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas de interés incluyen, pero no se limitan a, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, y colza oleaginosa, *Brassica sp.*, alfalfa, centeno, mijo, cártamo, maní, batata, yuca, café, coco, piña, árboles de cítricos, cacao, té, banano, aguacate, higo, guayaba, mango, oliva, papaya, marañón, macadamia, almendro, avena, vegetales, plantas ornamentales y coníferas.

Los vegetales incluyen, pero no se limitan a, tomates, lechuga, judías verdes, habas, guisantes, y los miembros del género *Curcumis* tales como pepino, melón cantalupo y melón almizcle. Las plantas ornamentales incluyen, pero no se limitan a, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, clavel, flor de pascua, y crisantemo. Preferentemente, las plantas de la presente invención son las plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, chile, papa, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa, etc.).

Esta invención es especialmente adecuada para cualquier miembro de la familia de las plantas monocotiledóneas, incluyendo pero sin limitarse a, maíz, arroz, cebada, avena, trigo, sorgo, centeno, caña de azúcar, piña, hilazas, cebolla, banano, coco, y dátiles.

50 Evaluación de la Transformación de la Planta

Después de la introducción de ADN foráneo heterólogo en células de plantas, se confirma la transformación o integración del gen heterólogo en el genoma de la planta por medio de diferentes métodos tales como el análisis de los ácidos nucleico, proteínas y metabolitos asociados con el gen integrado.

El análisis por PCR es un método rápido para seleccionar células transformadas, tejido o brotes por la presencia del gen incorporado en la etapa anterior antes de la trasplantación en el suelo (Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)). Se lleva a cabo la PCR utilizando iniciadores oligonucleótidos específicos para el gen de interés o el ambiente de un vector de *Agrobacterium*, etc.

Se puede confirmar la transformación de la planta por medio de un análisis de transferencias tipo Southern de ADN genómico (Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba)). En general, se extrae el ADN total del transformante, digerido con enzimas de restricción apropiadas, fraccionado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon o de nitrocelulosa. La membrana o "transferencia" puede ser sondeada luego, por ejemplo, con un fragmento de ADN objetivo marcado en forma radioactiva con ³²P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de acuerdo con técnicas estándar (Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba)).

ES 2 332 380 T3

En el análisis tipo Northern, se aísla ARN de tejidos específicos de transformante, fraccionado en un gel de agarosa de formaldehído, y se lo transfiere sobre un filtro de nylon de acuerdo con procedimientos estándar que son rutinariamente utilizados en el arte (Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba)). La expresión del ARN codificado por *grgr23* o *grg51* es luego analizada por medio de hibridación del filtro a una sonda radioactiva derivada de un GDC por medio de métodos conocidos en el arte (Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba)).

Se pueden llevar a cabo una transferencia tipo Western y ensayos bioquímicos y similares sobre las plantas transgénicas para determinar la presencia de proteína codificada por el gen de resistencia al herbicida por medio de procedimientos estándar (Sambrook y Russell (2001), (ver más arriba)) utilizando anticuerpos que se enlazan a uno o más epítomos presentes sobre la proteína de resistencia al herbicida.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a manera de ilustración y no como una limitación.

Experimental

Ejemplo 1

Aislamiento de ATX21308

Se aisló ATX21308 sembrando muestras de suelo en placa sobre Medio Mínimo Enriquecido 3 (EMM3) que contiene fosfatos y glifosato 50 mM. Ya que EMM3 contiene aminoácidos no aromáticos, una cepa debe ser resistente al glifosato con el propósito de crecer sobre este medio.

Se suspende aproximadamente un gramo de suelo en aproximadamente 10 ml de agua, y se mezcla en un agitador de vórtice durante 5 segundos. Se añaden 100 μ l de esta suspensión a 1 ml de EMM3 con fosfato pero sin glifosato. EMM3 contiene (por litro, pH 7,0): 10 g de sacarosa, 1 g de NH_4Cl , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,007 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 10 ml de solución de fosfato que contiene (por litro, pH 7,0) 210 g de Na_2HPO_4 y 90 g de NaH_2PO_4 . Se agita el cultivo sobre un tambor de rodillos para cultivo de tejidos a 21°C durante la noche y luego se siembra en placas sobre agar EMM3 que contiene glifosato 50 mM. Después de tres días, se siembra en placa lo aislado sobre agar Luria Bertani (LB) agar para confirmarla morfología única. Después de seis días, se siembra una sola colonia en agar EMM3 que contiene glifosato 50 mM. Lo aislado creció durante la noche sobre placas de glifosato 50 mM. Se seleccionó una cepa particular, denominada ATX21308, debido a su habilidad para crecer en presencia de altas concentraciones de glifosato. Se analiza esta cepa por su habilidad para crecer en presencia de glifosato en un cultivo líquido y es capaz de crecer aproximadamente hasta una concentración de glifosato de 300 mM bajo las condiciones analizadas.

Ejemplo 2

Preparación y Selección de Bibliotecas de Cósmidos

Se extrajo el ADN total de un cultivo de ATX21308 utilizando métodos comúnmente conocidos en el arte. Se digirió parcialmente el ADN con la enzima de restricción *Sau3A1* y se lo ligó con un fragmento del vector SuperCos (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se empaquetaron los productos de la ligación en partículas de fago utilizando el extracto de empaquetamiento GigaPack III XL (Stratagene), se transfectó en células de *E. coli*, y se sembró en placa sobre Agar LB que contiene 50 μ g/ml de kanamicina para seleccionar las colonias que contienen cósmidos.

Se recogieron las colonias individuales en placas de 384 pozos que contienen caldo LB y 50 μ g/ml de kanamicina, y cultivadas hasta saturación. Se diluyeron las células de estos cultivos 1:10, luego se las depositó sobre placas de agar M63 que contenían 50 μ g/ml de kanamicina, y o bien 0 mM, 10 mM, 20 mM, ó 50 mM de glifosato. [medio de agar M63, KH_2PO_4 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM, CaCl_2 50 μ M, FeSO_4 1 μ M, MgCl_2 50 μ M, glucosa 55 mM, 25 mg/litro de L-prolina, 10 mg/litro de clorhidrato de tiamina, suficiente NaOH para ajustar el pH en 7,0, y 15 g/litro de agar]. Se aislaron los transformantes que crecieron más rápidamente con las concentraciones más altas de glifosato y se las digirió con enzima de restricción *EcoRI* para identificar cósmidos con patrones de restricción compartidos. Se identificaron diferentes clones que crecieron en presencia de glifosato y que comparten patrones de restricción similares con *EcoRI*. Se seleccionó uno de estos clones cósmidos, pAX1924, para experimentos adicionales.

Ejemplo 3

*Identificación de *grg23* en el cósmido pAX1924*

Para identificar al gen(es) responsable(s) por la resistencia al glifosato mostrada por el cósmido pAX1924, se hace mutar al ADN de este clon con elementos transponibles. En este método, se identifican los clones que han sufrido inserciones de transposones y que han perdido la habilidad para conferir resistencia al glifosato. La ubicación de las inserciones de transposones identifica al marco de lectura abierta responsable por el fenotipo de resistencia al glifosato.

ES 2 332 380 T3

Se somete al cósmido pAX1924 a mutagénesis del transposón *in vitro* utilizando un Kit de Inserción EZ::TN (Epicentre, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este proceso inserta en forma aleatoria un fragmento de transposón dentro del ADN del cósmido y por lo tanto perturba aleatoriamente la función de los genes en el cósmido. Este transposón particular contiene un gen que codifica la resistencia al trimetoprim, de ese modo se pueden seleccionar los clones de inserción del transposón por medio de la habilidad para crecer en presencia de ese antibiótico. Las ubicaciones de las inserciones de transposón se pueden determinar por medio del mapeo del fragmento de restricción o por medio de la secuenciación con iniciadores que se aparean en el transposón. Los clones para inserción del transposón de pAX1924 se siembran en placa sobre medio M63 que contiene glifosato. Se identifican múltiples clones que contienen al transposón que han perdido la habilidad para crecer en presencia de glifosato, indicando que el transposón ha perturbado al gen responsable de la resistencia.

Se determina la secuencia de ADN para la región de pAX1924 que contiene las inserciones de transposón utilizando métodos de secuenciación conocidos en el arte. Utilizando esta información de la secuencia, se sintetizan iniciadores de ADN y se los utiliza para determinar la secuencia de ADN de pAX1924 en la región que abarca las inserciones de transposón. El análisis de la secuencia resultante de ADN muestra que esta región contiene un único gen. Este gen es denominado aquí como *grg23*. El análisis de *grg23* muestra que es capaz de producir dos posibles proteínas en células bacterianas debido a la presencia de sitios alternos potenciales de inicio de la traducción. El primer ORF (ORF1) inicia con un codón de inicio GTG en las posiciones 109-111 de la SEQ ID NO: 1, y termina en el codón de detención TAG en los nucleótidos 1417-1419 de la SEQ ID NO: 1. El segundo ORF (ORF2) inicia en un codón de inicio ATG en los nucleótidos 178-180 de la SEQ ID NO: 1, y termina en el codón de detención TAG en los nucleótidos 1417-1419 de la SEQ ID NO: 1. La traducción de ORF1 produce la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. La traducción de ORF2 produce la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

El análisis de la región de ADN que rodea a *grg23* sugiere que ORF2 está precedido por un sitio de enlazamiento del ribosoma, mientras que no existe un sitio obvio de enlazamiento del ribosoma precediendo el inicio de la traducción de ORF1. Además, la alineación de ambos marcos de lectura abierta con enzimas representativas EPSPS muestra que pocas enzimas EPSPS contienen esta extensión en el terminal N codificada dentro de ORF1. En consecuencia, el ORF funcional codificado por *grg23* en bacterias es ORF2. Por lo tanto, como se lo utiliza aquí, GRG23 se refiere a aquella que s codificada por ORF2 (nucleótidos 178-1419 de la SEQ ID NO: 1). Sin embargo, se sabe en el arte que las enzimas EPSPS son bastante tolerantes a aminoácidos adicionales en su terminal N. Por lo tanto, la expresión de ORF1 (nucleótidos 109-1419 de la SEQ ID NO: 1) debe producir también una EPSPS que confiera resistencia al glifosato.

Para analizar la habilidad de ORF2 para funcionar como una EPSPS y conferir resistencia al glifosato sobre las células, se puede subclonar este marco de lectura abierta y expresarlo en *E. coli*.

Ejemplo 4

Subclonación de *grg23* en vectores para expresión en *E. coli*

El gen que codifica al ORF2 de la GRG23 (iniciando con ATG (posiciones 178-180 de la SEQ ID NO: 1), que expresa una proteína de 413 aminoácidos) fue subclonado en pUC 18 y pRSF1b utilizando la misma estrategia de clonación esbozada anteriormente. Se sintetizó un iniciador para PCR [5' CAGGGATCCGGCATGGAACT GATCGACTAGTG 3'] que añade un sitio *Bam*HI seguido por GGC (5'-GGATCCGGC-3') inmediatamente 5' del sitio de inicio. Se sintetizó un 2do iniciador [5' ATTGGCGCGCCCTAGCCGGGGAGCGTAAG 3'] que añade un sitio *Asc*I inmediatamente 3' de la secuencia de detención (5'-GGCGCGCC-3'). Se amplifica la región de codificación de *grg23* por PCR utilizando la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene). Después de la amplificación por PCR de *grg23* utilizando estos iniciadores y de la digestión de restricción con *Bam*HI/*Asc*I, se ligó el producto de la PCR dentro de pUC 19 (digerido con *Bam*HI y *Asc*I) y pRSF1b (digerido con *Bam*HI y *Asc*I), y se obtuvieron colonias que contienen inserto. Se confirmó al clon pUC18-*grg23* (denominado aquí como pAX1927) por medio de digestión de restricción y por secuenciación del ADN.

En forma similar, se digirió el vector de expresión pAX1909 con *Bam*HI y *Asc*I, y se purificó por gel al vector que contiene al fragmento por medio de métodos conocidos en el arte. pAX1909 es un derivado de PRSF-1b (Novagen, San Diego, CA), modificado para contener un sitio *Bam*HI directamente 3' de la región que codifica a la histidina rica en "His-Tag". De este modo, las proteínas clonadas dentro de pAX1909 son fusiones en el marco que contienen los aminoácidos adicionales MAHHHHHHGSG. Se desarrollan típicamente vectores tales como pAX1909 para expresión y purificación de proteína, y estos métodos son conocidos en el arte.

Se ligó el producto PCR digerido que resultó más arriba dentro del vector digerido pAX1909, y se obtuvieron las colonias que contienen el inserto. Se confirmó el clon pAX1909-*grg23* (denominado aquí como pAX1926) por medio de digestión de restricción y por secuenciación de ADN. La forma de construcción de pAX1926 es tal que el producto predicho de la traducción GRG23 contiene una extensión del terminal amino que consta de. Esta extensión del terminal N contiene una "etiqueta de histidina" o una "etiqueta de seis residuos de His" que son útiles para facilitar la purificación de la proteína GRG23, como se sabe en el arte.

El plásmido pAX1926 que contiene el ORF2 de *grg23* ha sido depositado en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) el 18 de noviembre de 2005, y al que se le asignó el número de acceso NRRL B-30888.

Ejemplo 5

grg23 Confiere Resistencia a Altos Niveles de Glifosato

La construcción pUC18-Grg23 (pAX1927) fue transformada dentro de la cepa DH5 α de *E. coli* y sembrada sobre placas de agar LB suplementado con carbenicilina (0,1 mg/mL). Se seleccionaron dos colonias, se las resuspendió en agua estéril, y se las sembró sobre placas M63 que contenían glifosato ya sea 0 mM, 25 mM, 50 mM ó 100 mM. Se añadió también a las placas isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG; 0,1 mM). Como control, se transformaron células que contenían únicamente al vector pUC 18 y se las sembró sobre placas de glifosato. Después de dos días de desarrollo, se examinó el crecimiento en estas placas (Tabla 1).

TABLA 1

Construcción	glifosato 0 mM	glifosato 25 mM	glifosato 50 mM	glifosato 100 mM
pUC18	+	-	-	-
pUC18-Grg23 (pAX1927)	+	++	++	++

Este resultado confirma que la expresión de *grg23* para producir GRG23-ORF2 confiere resistencia al glifosato en *E. coli* al menos hasta 100 mM. Adicionalmente, el crecimiento de *E. coli* que contenía pAX1927 es más fuerte en presencia de glifosato que en ausencia de glifosato.

Ejemplo 6

Homología de GRG23 con Otras Proteínas

La secuencia deducida de aminoácidos de GRG23 tiene homología con las enzimas EPSPS, indicando que *grg23* codifica una EPSPS.

El examen de la secuencia deducida de aminoácidos de GRG-ORF2 (SEQ ID NO: 4) revela que no contiene los cuatro dominios típicos de las enzimas EPSPS Clase II. Por lo tanto es una nueva EPSPS resistente al glifosato que no es de Clase II.

La búsqueda en bases de datos públicamente disponibles de proteína, tales como SWISSPROT, revela que GRG23 tiene una similitud de aminoácidos con la amplia clase de enzimas EPSPS. Sin embargo, ninguna proteína en ninguna base de datos tiene más de un 50% de identidad con la secuencia de aminoácidos de GRG23. En la Figura 1 se muestra una alineación representativa de GRG23 con otras enzimas EPSPS.

Ejemplo 7

Purificación de GRG23

La construcción pRSF1b-*grg23* (pAX1926) fue expresada en *E. coli* después de la inducción con IPTG, y purificada en una sola etapa utilizando una columna cromatográfica de cobalto como se conoce en el arte. Después de la elución de la columna, se dializó la GRG23 purificada contra HEPES 50 mM/KCl 100 mM, pH 7,0. La proteína era más de un 95% pura según lo evaluado por PAGE. Se cuantificó la cantidad de GRG23 utilizando el método de Bradford, como se conoce en el arte (Bradford (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254).

Ejemplo 8

Análisis Cinéticos de la Actividad de GRG23

Se analizaron las muestras de proteínas purificadas por la actividad de EPSPS utilizando un análisis cinético que involucra la incubación de PEP (Sigma, St. Louis, MO) y S3P en un amortiguador que contiene cloruro de potasio y HEPES a pH 7,0. Se detectó la liberación de fosfato utilizando un ensayo acoplado para la detección fluorescente de fosfato con base en la generación de Amplex Red, como se conoce en el arte (Vázquez y colaboradores (2003) Anal. Biochem. 320: 292-298).

Las condiciones publicadas del ensayo pueden conducir a saturación del ensayo en experimentos en donde se libera fosfato muy rápidamente. Esta saturación limita un poco el rango dinámico del ensayo, y requiere de un rango definido de concentraciones de enzima. Se determinó que la limitación cinética del ensayo de fosfato fluorescente

ES 2 332 380 T3

es aparentemente debida a una combinación de factores, incluida una limitación de inosina y PNP. En la presente invención, se han desarrollado condiciones del ensayo que producen un rango dinámico sustancialmente mejorado y permiten el uso de un rango más amplio de concentraciones de enzima y de sustrato. Las condiciones del ensayo que han sido significativamente cambiadas incluyen las concentraciones de la purina nucleósido fosfatasa (PNP), xantina oxidasa (XOD), AMPLEX® Red, e inosina, cada una de las cuales se incrementó en concentración en el ensayo para acomodar mayores tasas de renovación de fosfato. Se adaptó este ensayo para usarlo para medir la actividad de EPSPS en un formato de 96 pozos con las siguientes mejoras:

TABLA 2

Un ensayo fluorescente mejorado

	Ensayo mejorado	Vazquez y colaboradores, 2003	Unidades
XOD	1	0,4	IU/ml
PNP	2	0,02	IU/ml
Inosina	2,25	1,5	mM
HRP	1	1	IU/ml
Amp Red	1.100	50	uM
Hepes	26,25	-	mM
KCl	26,25	-	mM
pH	7	7,4	
Tris	-	50	mM

Los ensayos enzimáticos fueron llevados a cabo en placas de 96 pozos en un volumen total de 50 uL. Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente a pH 7,0. Se combinaron todos los componentes del ensayo excepto PEP, EPSPS, y S3P en un Master Mix y se colocaron alícuotas en una placa de 96 pozos utilizando un pipeteador de múltiples canales. Se añadieron luego concentraciones apropiadas de PEP a cada pozo. Se prepararon diluciones frescas de EPSPS y fueron añadidas a los pozos respectivos. Se inició cada ensayo por medio de la adición de S3P.

Se graficaron los datos de velocidad y se determinaron los parámetros cinéticos K_m y K_{cat} por medio del uso de la aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando un programa no lineal de ajuste de la curva (KALEIDAGRAPH®, Synergy Software). Se determinaron los datos de K_i por medio de la medición de la $K_m(app)$ con múltiples concentraciones de glifosato, y graficando $K_m(app)$ como función de la concentración del inhibidor.

TABLA 3

Efecto del Glifosato sobre la $K_m(app)$ de GRG23

Concentración de Glifosato (uM)	$K_m(app)$
0	10,95
3000	18,89
5000	20,67
1000	25,23

Graficando la $K_m(app)$ como función de la concentración de glifosato, se puede obtener una representación lineal de la resistencia al glifosato de GRG23. El intercepto X de la línea resultante representa la $-K_i$. Graficando esta línea con los datos mostrados en la tabla 3 produce los siguientes datos:

ES 2 332 380 T3

TABLA 4

Valores cinéticos para GRG23

Enzima	K_m (μ M)	K_i (μ M)	K_{cat} (s^{-1})	Proporción de K_i/K_m
GRG23	10,95	9.525	8,2	869

GRG23 es muy resistente al glifosato, con una K_i por encima de 9 mM, y una proporción de K_i/K_m por encima de 800.

Ejemplo 9

Aislamiento de ATX21313

Para la cepa ATX 21313, se suspendió aproximadamente un gramo de suelo en 10 ml de agua, y se utilizaron 100 μ l para inocular 1 ml de cultivo de medio A de sales minerales (MSMA) y sin glifosato. MSMA contiene (por litro, pH 7,0) 1 g de NH_4Cl , 10 g de sacarosa, 0,2 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,007 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ suplementado con fosfatos. Después de incubación durante la noche, se sembró el cultivo en placas sobre un medio sólido que contiene MSMA y glifosato 50 mM, se incubó durante unos pocos días, y se inoculó sobre placas de agar Luria Bertani para confirmar un tipo único de colonia. Se reconfirmó el crecimiento en presencia de glifosato 50 mM cultivando nuevamente sobre MSMA, placas de agar 50 mM. Este método de aislamiento produjo la cepa ATX21313, que fue capaz de crecer bien bajo estas condiciones.

Ejemplo 10

Clonación de EPSP Sintetas resistentes al glifosato

Se extrajo ADN genómico de la cepa ATX21313 y el ADN resultante fue parcialmente digerido con la enzima de restricción *Sau*3A 1 para producir fragmentos de ADN de aproximadamente 5 kilobases de tamaño. Estas moléculas de ADN fueron seleccionadas por tamaño sobre geles de agarosa, purificadas, y ligadas dentro de las ramas del vector LAMBDA ZAP[®] predigeridas con *Bam*HI. Las ramas ligadas fueron empacadas luego en partículas de fago, y se determinaron los títulos del fago como se conoce en el arte. Las bibliotecas resultantes fueron amplificadas por medio de métodos conocidos en el arte para generar un título de biblioteca entre 3×10^7 y 3×10^8 PFU/mL. Para cada biblioteca independiente se cotransfectó luego *E. coli* (XL1 Blue MRF') con el fago de una biblioteca amplificada así como dentro del fago auxiliar M13 para permitir la extirpación de la masa de la biblioteca en la forma de un ADNss circular infeccioso como se conoce en el arte (Short y colaboradores, (1988) Nucleic Acids Research 16: 7583-7600). Después de la centrifugación de las células coinfectadas, se calentó el sobrenadante que contiene al fago a 65-70°C durante 15-20 minutos para incapacitar cualquiera de las partículas residuales el fago lambda. Las diluciones de la biblioteca resultante del plásmido de ADNss fueron transfectadas en un cultivo fresco de células competentes XL1 Blue MRF' de *E. coli* y también células XL-Blue MRF' (Δ aroA) (XL1 Blue MRF'). Se sembraron en placa las células transfectadas resultantes sobre placas M63 que contenían Kanamicina, IPTG 0,1 mM y glifosato ya sea 0 mM, 20 mM ó 50 mM. Este método de selección permite la identificación de clones que contienen EPSP sintetas tolerantes al glifosato, así como clones que portan la tolerancia al glifosato. Se recolectaron las colonias que crecen sobre glifosato 20 mM ó 50 mM en la cepa Δ aroA o XL-Blue MRF' y se analizaron sus plásmidos por medio de digestión de restricción para identificar plásmidos con patrones de restricción compartidos. Se secuenciaron los plásmidos individuales por medio de métodos conocidos en el arte, dando preferencia a los plásmidos que confieren resistencia a glifosato 50 mM.

Utilizando este enfoque, algunas veces modificado para cada biblioteca como se conoce y se aprecia en el arte, se identificaron clones de biblioteca que contienen genes para la EPSP sintasa.

Se determinaron las secuencias de las regiones de los clones resultantes en la región de la EPSP sintasa.

Ejemplo 11

Secuencias de proteína y de ADN de las EPSP sintetas

Se determinó la secuencia d ADN de la EPSP sintasa resistente al glifosato para pAX1967 por medio de métodos conocidos en el arte. Se proporciona aquí la secuencia de ADN de *grg51* como la SEQ ID NO: 5. Se proporciona aquí el producto predicho de la traducción de *grg51* (GRG51) como la SEQ ID NO: 6. GRG51 muestra 97% de identidad de aminoácidos con GRG23 (SEQ ID NO: 2).

ES 2 332 380 T3

El plásmido pAX1967 que contiene *grg51* ha sido depositado en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) el 26 de junio de 2006, y se le asignó el número de acceso NRRL B-30949.

La Tabla 5 resume la homología de GRG23 y GRG51 con otras enzimas EPSP sintasa.

TABLA 5

Identidad de aminoácidos de GRG23-ORF1 y GRG51 para enzimas representativas EPSPS

EPSPS	% de Identidad con GRG23	% de Identidad con GRG51
GRG23	-	92%
GRG51	92%	-
<i>B_Clausii</i>	36%	35%
<i>R_xylanophilus</i>	39%	38%
<i>E_coli</i>	32%	32%
CP4	20%	21%
<i>Zea_maize</i>	32%	32%

Ejemplo 12

Clonación de nuevas EPSP sintasas resistentes al Glifosato en un vector de Expresión de E. coli

Se subclonó el gen *grg51* contenido en pAX1967 en el vector de expresión pRSF1b de *E. coli* (Invitrogen). Se confirmaron los clones resultantes por medio de la secuenciación de ADN, y se los utilizó para inducir la expresión de *grg51* en *E. coli*. La proteína expresada etiquetada con His fue luego purificada como se conoce en el arte.

Ejemplo 13

Resistencia al glifosato de las EPSP sintasas

Se sembraron en placa células que contenían pAX1967 sobre placas de M63+ que contenían antibiótico y glifosato ya sea 0 mM ó 20 mM. Se anotó el crecimiento después de dos días de crecimiento a 37°C. Se observó que GRG51 confiere resistencia a glifosato 20 mM en células de *E. coli* (Tabla 6).

EPSP	Clon de Plásmido	Crecimiento sobre glifosato 20 mM
Vector	-	-
GRG51	pAX1967	++

Ejemplo 14

Diseño y expresión de syng23

Se diseñó y sintetizó una nueva secuencia génica que codifica la proteína GRG23 (SEQ ID NO: 2; solicitud de patente estadounidense No. 60/741.166 presentada el 1 de diciembre de 2005). Esta secuencia es suministrada como la SEQ ID NO: 12. Este marco de lectura abierto, denominado aquí "*syng23*", fue clonado en el vector de expresión pRFS1b (Invitrogen), por medio de métodos conocidos en el arte.

El gen *syng23* que codifica a GRG23 fue clonado en un vector pUC 19 para crear pAX748. Se utilizaron iniciadores para PCR que flanquean a *syng23* en este vector para amplificar a *syng23* a partir de pAX748 utilizando el sistema MUTAZYME® II (Stratagene) para introducir mutaciones aleatorias dentro de la región de codificación de *syng23*. Se diluyó el molde 1:50 en la reacción PCR propensa a error, y se llevó a cabo la amplificación durante 30 ciclos. Se digirió el producto PCR resultante con las enzimas de restricción *BamHI* y *SgsI*, purificado por gel, y ligado dentro del vector pRSF1b para crear una biblioteca mutagenizada de *syng23*.

Se transformaron las bibliotecas mutagenizadas de *syng23* dentro de la cepa BL21*DE3 estrella de *E. coli* (Invitrogen). Después de la transformación, se sembraron en placa colonias individuales sobre medio 1x M63 que contiene glifosato 150 mM para seleccionar los clones que tenían actividad enzimática retenida y tolerancia al crecimiento.

ES 2 332 380 T3

Ejemplo 15

Selección para la resistencia al glifosato sobre placas

Se transformaron ligaciones de bibliotecas dentro de células de *E. coli* competentes con BL21*DE3 (Invitrogen). Se llevaron a cabo las transformaciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Después de incubar durante 1 hora a 37°C en medio SOC, se sedimentaron las células por centrifugación (5 minutos, 1000 x g, 4°C). Se lavaron las células con 1 ml de M63+, se centrifugó nuevamente, y se decantó el sobrenadante. Se lavaron las células una segunda vez con 1 ml de M63+ y se las resuspendió en 20 µl de M63+.

Para la selección de enzimas GRG23 mutantes que confieren resistencia al glifosato en *E. coli*, se sembraron las células sobre placas con medio agar M63+ que contenía glifosato 150 mM, IPTG 0,05 mM (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), y 50 µg/ml de kanamicina. El medio M63+ contiene KH₂PO₄ 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, CaCl₂ 50 µM, FeSO₄ 1 µM, MgCl₂ 50 µM, glucosa 55 mM, 25 mg/litro de L-prolina, 10 mg/litro de clorhidrato de tiamina, suficiente NaOH para ajustar el pH en 7,0, y 15 g/litro de agar. Se incubaron las placas durante 36 horas a 37°C.

Se recogieron colonias individuales y se las colocó en placas de 384 pozos. Se crearon de esta forma placas de 384 pozos. Se recogió una tercera placa de 384 clones a partir de las colonias que crecieron sobre placas que carecían de glifosato.

Ejemplo 16

Aislamiento y análisis de variantes de GRG23 resistentes al glifosato

Se identificaron las células BL21*DE3 transformadas con *syngrg23* mutagenizado y/o variantes de *grg23* por medio del crecimiento sobre placas de glifosato. Se prepararon extractos de *syngrg23* mutagenizado y variantes de *grg23* y se analizó la actividad enzimática mejorada. Las colonias identificadas sobre placas de glifosato fueron colocadas en bloques de 96 pozos que contenían medio LB y crecieron hasta un O. D. aproximadamente de 0,6. Se añadió luego IPTG (0,5 mM) y se incubaron los bloques durante la noche a 20°C para inducir la expresión de la proteína. Se prepararon extractos de proteína a partir de los precipitados celulares utilizando un reactivo de cultivo POP (Novagen) y Lysonase (Novagen), y se midió la actividad enzimática en los lisados crudos después de calentar los extractos durante 30 min a 37°C. Se seleccionaron los extractos con actividad superior a dos desviaciones estándar por encima del promedio de un conjunto de extractos que contienen la proteína apropiada de control (por ejemplo GRG23) para otros análisis.

Los clones que muestran mayor actividad después de la incubación como extractos crudos fueron cultivados en cultivos de 250 mL de LB, y expresión de proteína inducida con IPTG. Después de la inducción, se purificó proteína mutante GRG23 de cada cultivo por medio de cromatografía de afinidad utilizando una resina de cobalto (Novagen). Se analizaron luego las proteínas purificadas para actividad enzimática después de calentamiento durante 0, 2, 4, y aproximadamente 16 horas a 37°C.

Ejemplo 17

Variantes GRG23 mejoradas

A partir de una biblioteca de ADN de *syngrg23* mutagenizada, se identificaron diferentes clones con actividad mejorada. Se determinaron las secuencias de ADN de los clones correspondientes a estos extractos. La Tabla 7 muestra los cambios de aminoácidos identificados en seis variantes de GRG23 que retuvieron la resistencia al glifosato: *grg23* (L3P1.B20) (SEQ ID NO: 26) que codifica la secuencia de aminoácidos de GRG23 (L3P1.B20) (SEQ ID NO: 27); *grg23* (L3P1.B23) (SEQ ID NO: 28) que codifica la secuencia de aminoácidos de GRG23 (L3P1.B3) (SEQ ID NO: 29); *grg23* (L3P1.F18) (SEQ ID NO: 30) que codifica la secuencia de aminoácidos de GRG23 (L3P1.F18) (SEQ ID NO: 31); y *grg23* (L3P1.O23) (SEQ ID NO: 31), que codifica la secuencia de aminoácidos de GRG23 (L3P1.O23) (SEQ ID NO:32).

TABLA 7

Mutaciones identificadas en variantes de GRG23 resistentes al glifosato

Clon	Aminoácidos (AA) en GRG23
L3P1B20	V206→I
L3P1B3	D75→H, E217→K
L3P1F18	T274→I
L3P1O23	R5→H

ES 2 332 380 T3

Se cultivaron los clones en 250 mL de cultivos LB, y la expresión de la proteína inducida y aislada como se describió anteriormente. Se analizó luego la actividad enzimática de las proteínas purificadas después del calentamiento durante 0, 2, 4, y aproximadamente 16 horas a 37°C. Se encontró que uno de estos clones, llamado "M5", retiene una mayor proporción de su actividad enzimática después de una incubación prolongada a 37°C (Tabla 8). Se determinó la secuencia de ADN de este clon, y el gen denominado aquí como *grg23 (ace1)* (SEQ ID NO: 14). La proteína expresada a partir de *grg23 (ace1)* es denominada GRG23 (ACE1) (SEQ ID NO: 15).

TABLA 8

Vida media de GRG23 (ACE1) versus GRG23 a temperatura elevada

Proteína	Vida media a 37°C (horas)
GRG23	7
GRG23 (ACE1)	15,5

GRG23 (ACE1) contiene 2 sustituciones de aminoácidos con relación a la proteína GRG23 de tipo silvestre: A49→T y S276→T. El vector pRSF1b que contiene este gen es denominado pAX3801. La Figura 1 muestra la estabilidad relativa de GRG23 (ACE1) versus GRG23 a temperaturas elevadas.

Ejemplo 18

Determinación de la actividad de EPSPS de las variantes de GRG-23

Se analizó la actividad de la EPSP sintasa de los extractos que contienen proteínas variantes de GRG23 como se describe en la solicitud de patente estadounidense No. 60/741.166, presentada el 1 de diciembre de 2005, incorporada aquí como referencia en su totalidad. Se llevaron a cabo los ensayos en un volumen final de 50 µl que contiene shikimato-3-fosfato 0,5 mM, fosfoenolpiruvato 200 uM (PEP), 1 U/ml de xantina oxidasa, 2 U/ml de nucleósido fosforilasa, inosina 2,25 mM, 1 U/ml de peroxidasa de rábano, glifosato 0-2 mM, HEPES/KOH 50 mM, pH 7,0, KCl 100 mM, y AMPLEX® Red (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron los extractos con todos los componentes del ensayo excepto shikimato-3-fosfato durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se iniciaron los ensayos por medio de la adición de shikimato-3-fosfato. Se midió la actividad de la EPSP sintasa utilizando un espectrómetro de fluorescencia Spectramax Gemini XPS (Molecular Dynamics, excitación: 555 nm; emisión: 590 nm).

Después se llevó a cabo la plena determinación de los parámetros cinéticos sobre proteína purificada como se describió anteriormente (solicitud de patente estadounidense número 60/ 741.166 presentada el 1 de diciembre de 2005), ajustando la cantidad de proteína determinada por medio del ensayo de Bradford como se conoce en el arte. Para cualquier concentración de glifosato, se midió la actividad de la EPSP sintasa como función de un amplio rango de concentraciones de PEP. Se ajustaron los datos a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando el software KALEIDAGRAPH® (Synergy Software) y se la usó para determinar la K_m (K_m aparente) de la EPSP sintasa con esa concentración de glifosato. Se determinaron los valores de K_m aparente con concentraciones de glifosato no menores a 4, y se calcularon los K_i de la EPSPS para glifosato a partir de la gráfica de K_m aparente versus la concentración de glifosato, utilizando la ecuación ($m1 \cdot x / (m2 + x)$); $m1 = 1$; $m2 = 1$) como se conoce en el arte.

TABLA 9

Cinéticas de GRG23 (ACE1) versus GRG23

	K_m (uM)	K_i (uM)	$V_{m\acute{a}x.}$ (nmol/min/ug)
GRG23	12,2	13.800	14,77
GRG23 (ACE1)	9,7	14.620	13,73

Ejemplo 19

*Identificación de *grg23 (ace2)**

GRG23 (ACE1) contiene dos cambios de aminoácidos con relación a GRG23. Para determinar si sustituciones adicionales en estas posiciones podrían mejorar más la actividad, se generó una biblioteca de ADN que resultó en clones que expresan proteínas que fueron sustancialmente mutadas y ambas posiciones 49 y 276 de GRG23. Se seleccionaron los clones que confieren resistencia al glifosato por medio del crecimiento sobre placas de glifosato, y se los cultivó y analizaron las propiedades cinéticas como se describió.

ES 2 332 380 T3

Sorprendentemente, se identificó un clon, denominado aquí como *grg23 (ace2)* (SEQ ID NO: 16) que codifica a la proteína GRG23 (ACE2) (SEQ ID NO: 17) por tener mejor estabilidad térmica. La secuencia de ADN de *grg23 (ace2)* muestra que GRG23 (ACE2) contiene un solo cambio de aminoácidos (residuo 276 de GRG23 por arginina).

Ejemplo 20

Comparación de GRG23 y GRG51, y mutagénesis de diferentes residuos

Se generaron dos bibliotecas para evaluar las permutaciones de las posibles secuencias de aminoácidos a partir de la comparación de las secuencias de aminoácidos de GRG23 y GRG51. La primera biblioteca introdujo una variación de la secuencia de aminoácidos de GRG51 dentro de una región de codificación de *grg23 (ace2)*. La segunda biblioteca introdujo la variación de la secuencia de aminoácidos de GRG (ACE2) dentro de la región de codificación de *grg51*.

Se evaluaron los clones de las bibliotecas resultantes por (1) la habilidad para conferir resistencia al glifosato en una célula, y (2) la actividad después de incubación prolongada a 37°C. Se secuenciaron un total de diez clones y se los analizó con más detalle. Un clon particular, denominado aquí *grg51.4* (SEQ ID NO: 18), que codifica la proteína GRG51.4 (SEQ ID NO: 19), contiene varios cambios de aminoácidos con relación tanto a GRG23 (ACE2) como a GRG51. Se introdujeron posteriormente los cambios de aminoácidos presentes en GRG51.4 con relación a GRG23 (ACE2) dentro del gen *grg23 (ace2)*, para producir *grg23 (ace3)* (SEQ ID NO: 20), que codifica a la proteína GRG23 (ACE3) (SEQ ID NO: 21). GRG23 (ACE3) exhibe una actividad y estabilidad térmica superiores con relación a GRG23, y GRG23 (ACE2).

Se mutagenizó GRG23 (*ace1*), y se analizaron los clones para identificar a aquellos que expresan variantes con mayor estabilidad térmica y/o actividad. Se identificó un clon, *grg23 (L5P2.J2)* (SEQ ID NO: 22), que codifica GRG23 (L5P2.J2) (SEQ ID NO: 23), en virtud de sus propiedades cinéticas mejoradas. GRG23 (L5P2.J2) contiene tres cambios de aminoácidos con relación a GRG23 (ACE1), como se muestra en la Tabla 10 siguiente.

TABLA 10

Cambios de aminoácidos en GRG23 (L5P2.J2)

Aminoácidos (AA) en GRG23 (L5P2.J2) con relación a GRG23 (ACE1)
V101 → F
A213 → S
D284 → N

Se utilizó mutagénesis de oligonucleótidos para crear clones que contienen cada uno de los cambios de aminoácidos identificados en GRG23 (L5P2.J2) dentro de la región de codificación de *grg23 (ace3)*. Se identificó un clon como codificando una proteína que tiene propiedades cinéticas mejoradas sobre GRG23 (ACE3), y denominado *grg23 (ace4)* (SEQ ID NO: 24). La proteína codificada por *grg23 (ace4)* es denominada como GRG23 (ACE4) (SEQ ID NO: 25) que contiene un solo cambio de aminoácidos con relación a GRG23 (ACE3) (Valina 101 por fenilalanina). Con base en este resultado, se llevó a cabo una mutagénesis separada de oligonucleótidos para analizar las cinéticas de cada una de las posibles sustituciones de aminoácidos en la posición 101. Ninguno de los cambios de aminoácidos resultó en una mejora adicional en las propiedades cinéticas comparado con GRG23 (ACE4).

TABLA 11

Cinéticas de variantes mejoradas

	Km (uM)	Ki (uM)	V _{máx.} (nmol/min/ug)
GRG23	14	10.800	13
GRG51	15	21.048	13
GRG23 (ACE1)	10	14.620	14
GRG23 (ACE2)	11	18.104	15
GRG51.4	19	26.610	17
GRG23 (ACE3)	15	20.000	17
GRG23 (L5P2.J2)	15	2.500	23
GRG23 (ACE4)	14	5.010	24

Ejemplo 21

Modificación por ingeniería genética de grg23 y grg51 para Transformación de Plantas

5 Se amplifica el marco de lectura abierta (ORF) de *grg23* y *grg51* por medio de PCR a partir de un molde de ADNc de longitud completa. Se añaden sitios de restricción *HindIII* a cada extremo del ORF durante la PCR. Adicionalmente, se añade la secuencia de nucleótidos ACC inmediatamente 5' al codón de inicio del gen para incrementar la eficacia de la traducción (Kozak (1987) *Nucleic Acids Research* 15: 8125-8148; Joshi (1987) *Nucleic Acids Research* 15: 6643-6653). Se clona el producto PCR y se lo secuenciar utilizando técnicas conocidas en el arte para garantizar que no se introducen mutaciones durante la PCR.

10 Se digiere al plásmido que contiene al producto PCR de *grg23* o *grg51* con *HindIII* y se aísla el fragmento que contiene al ORF intacto. Se clona este fragmento dentro del sitio *HindIII* del plásmido pAX200, un vector de expresión de la planta que contiene al promotor de la actina del arroz (McElroy y colaboradores, (1991) *Molec. Gen. Genet.* 231: 150-160) y al terminador PinII (An y colaboradores, (1989) *The Plant Cell* 1: 115-122). El fragmento promotor-gen-terminador de este plásmido intermedio se subclona dentro del plásmido pSB 11 (Japan Tobacco, Inc.) para formar un plásmido final, por ejemplo, pSB 11 GRG23. Se organiza pSB11GRG23 de tal manera que el fragmento de ADN de 3,91 kb que contiene la construcción promotor-*grg23*-terminador pueda ser cortado por medio de digestión doble con *KpnI* y *PmeI* y utilizado para la transformación dentro de plantas por medio de una inyección de un haz de aerosol. Se verifica la estructura de pSB11GRG23 por medio de digestión de restricción y electroforesis en gel, y por medio de secuenciación a través de las diferentes uniones de la clonación.

15 Se inmoviliza el plásmido dentro de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que también hospeda al plásmido pSB 1 (Japan Tobacco, Inc.), utilizando procedimientos de apareamiento triparental conocidos en el arte, y sembrando en placa sobre un medio que contiene estreptomycin. El plásmido pSB11GRG23 porta la resistencia a la estreptomycin pero es un plásmido de rango estrecho de huéspedes y no se puede replicar en *Agrobacterium*. Las colonias resistentes a la Estreptomycin surgen cuando pSB11GRG23 se integra dentro del plásmido pSB 1 de rango más amplio de huéspedes a través de recombinación homóloga. Se verifica el producto integrado conjuntamente por pSB 1 y pSB11GRG23 por medio de hibridación tipo Southern. Se utiliza la cepa de *Agrobacterium* que hospeda al producto integrado conjuntamente para transformar maíz por medio del método de PureIntro (Japan Tobacco).

Ejemplo 22

35 *Transformación de grg23 o grg51 en Células de Plantas*

Se recolectan espigas de maíz 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas, y se utilizan aquellos embriones de 0,8-1,5 mm de tamaño para la transformación. Se siembran en placa los embriones con el escutelo hacia arriba sobre un medio de incubación adecuado, tal como el medio DN62A5S (3,98 g/L de Sales N6; 1 mL/L (de Patrón 1000x) de Vitaminas N6; 800 mg/L de L-Asparagina; 100 mg/L de Myo-inositol; 1,4 g/L de L-Prolina; 100 mg/L de ácidos Casamino; 50 g/L de sacarosa; 1 mL/L (de Patrón de 1 mg/mL) de 2,4-D).

Se transfieren los explantes resultantes a cuadrados de malla (30-40 por placa), luego se los transfiere sobre medio osmótico durante 30-45 minutos, luego se los transfiere sobre una placa radiante (ver, por ejemplo, la publicación PCT No. WO/0138514 y la patente estadounidense No. 5.240.842).

Se aceleran las construcciones de ADN diseñadas para expresar GRG23 en células de plantas dentro del tejido de la planta utilizando un acelerador de un haz de aerosol, usando condiciones esencialmente como las descritas en la publicación PCT No. WO/0138514. Después de la radiación, se incuban los embriones durante 30 min sobre medio osmótico, y se colocan sobre medio de incubación durante la noche a 25°C en la oscuridad. Para evitar dañar en forma indebida los explantes radiados, se los incuban al menos durante 24 horas antes de transferirlos a un medio de recuperación. Se esparcen luego los embriones sobre medios para el período de recuperación durante 5 días a 25°C en la oscuridad, luego se los transfiere a un medio de selección. Se incuban los explantes en medio de selección hasta por ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y de las características de la selección particular utilizada. Después del período de selección, se transfiere el callo resultante a un medio para maduración de embriones hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Se colocan luego los embriones somáticos maduros resultantes bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración por medio de métodos conocidos en el arte. Se le permite a los brotes resultantes la formación de raíces sobre medio de enraizamiento, y se transfieren las plantas resultantes a macetas vivero y se propagan como plantas transgénicas.

<u>Materiales</u>		
Medio DN62A5S		
Componentes	por litro	Fuente
Mezcla de Sal basal N6 de Chu (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Phytotechnology Labs
Solución de Vitamina N6 de Chu (Prod. No. C 149)	1 ml/L (de Patrón 1000x)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/L	Phytotechnology Labs
Myo-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Phytotechnology Labs
Ácidos Casamino	100 mg/L	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/L	Phytotechnology Labs
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 ml/L (de Patrón de 1 mg/mL)	Sigma

Ajustar el pH de la solución hasta pH 5,8 con KOH 1 N/KCl 1 N, añadir Gelrita (Sigma) hasta 3 g/L, y autoclavar. Después de enfriar hasta 50°C, añadir 2 ml/L de una solución patrón d 5 mg/ml de Nitrato de Plata (Phytotechnology Labs). La receta produce aproximadamente 20 placas.

Ejemplo 23

Transformación de grg23 o grg51 en Células de Plantas de Maíz por Medio de una Transformación Mediada por Agrobacterium

Se recolectan las espigas 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas, y se utilizan aquellos embriones para transformación. Se colocan los embriones con el escutelo hacia arriba sobre un medio de incubación adecuado, y se incuba durante la noche a 25°C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario de por sí incubar los embriones durante la noche. Se ponen en contacto los embriones con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante 5-10 min, y luego se los siembra en placa sobre un medio para cultivo conjunto durante 3 días (25°C en la oscuridad). Después del cultivo conjunto, se transfieren los explantes al medio para el período de recuperación durante 5 días (a 25°C en la oscuridad). Se incuban los explantes en medio de selección hasta por ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y de las características de la selección particular utilizada. Después del período de selección, se transfiere el callo resultante al medio para maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Se colocan luego los embriones somáticos maduros resultantes bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración por medio de métodos conocidos en el arte. Se le permite a los brotes resultantes la formación de raíces sobre medio de enraizamiento, y se transfieren las plantas resultantes a macetas vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la descripción son indicativas del nivel de destreza de aquellos capacitados en el arte a los cuales les atañe esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente son incorporadas aquí como referencia en la misma medida como si cada publicación individual o solicitud de patente estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada como referencia.

Aunque la invención anterior ha sido descrita con algún detalle a manera de ilustración y de ejemplo para propósitos de claridad en su comprensión, será obvio que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4535060 A [0004] [0027] [0033] [0045] [0046]
- US 4769061 A [0004]
- US 5094945 A [0004]
- US 5436391 B [0062]
- US 20040005600 A [0062]
- US 20010003849 A [0062]

ES 2 332 380 T3

- US 5188642 A [0027] [0033] [0045] [0046]
- US 4196265 A [0048]
- US 5605793 A [0051]
- US 5837458 A [0051]
- US 6320100 B [0062]
- US 6075185 B [0062]
- US 5380831 B [0062]
- US 5380831 A [0064]
- US 74116605 P [0116] [0127] [0128]
- WO 0138514 A [0139] [0140]
- US 5240842 A [0139]
- US 60741166 B [0145]
- US 60817799 B [0145]

15 Literatura citada en la descripción que no es de patente:

- **Vázquez y colaboradores**, *Analytical Biochemistry*, 2003, vol. 320, 292-298 [0005]
- **Karlin; Altschul**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 2264-2268 [0031]
- **Karlin; Altschul**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0031]
- **Altschul y colaboradores**, *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0031]
- **Altschul y colaboradores**, *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0031]
- **Higgins y colaboradores**, *Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, 4673-4680 [0031]
- **Myers; Miller**. *CABIOS*, 1988, vol. 4, 11-17 [0031]
- **Needleman; Wunsch**. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48 (3), 443-453 [0032]
- **Schönbrunn y colaboradores**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 1376-1380 [0036]
- **Selvapandiyam y colaboradores**, *FEBS Letters*, 1995, vol. 374, 253-256 [0036]
- **Shuttleworth y colaboradores**, *Biochemistry*, 1999, vol. 38, 296-302 [0036]
- **Sambrook**; Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0038] [0079]
- **Innis y colaboradores**, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, 1990 [0038]
- **Sambrook y colaboradores**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0039] [0040] [0043]
- **Meinkoth; Wahl**. *Anal. Biochem.*, 1984, vol. 138, 267-284 [0043]
- **Tijssen**. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, 1993 [0043]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1995 [0043]
- **Harlow; Lane**. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0048]
- **Stemmer**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 10747-10751 [0051]
- **Stemmer**. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-391 [0051]
- **Cramer y colaboradores**, *Nature Biotech.*, 1997, vol. 15, 436-438 [0051]
- **Moore y colaboradores**, *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 272, 336-347 [0051]
- **Zhang y colaboradores**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 4504-4509 [0051]
- **Cramer y colaboradores**, *Nature*, 1998, vol. 391, 288-291 [0051]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc, 1994 [0054]

ES 2 332 380 T3

- **Guerineau** y colaboradores, *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 262, 141-144 [0061]
- **Proudfoot**. *Cell*, 1991, vol. 64, 671-674 [0061]
- 5 • **Sanfacon** y colaboradores, *Genes Dev.*, 1991, vol. 5, 141-149 [0061]
- **Mogen** y colaboradores, *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 1261-1272 [0061]
- **Munroe** y colaboradores, *Gene*, 1990, vol. 91, 151-158 [0061]
- 10 • **Ballas** y colaboradores, *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 7891-7903 [0061]
- **Joshi** y colaboradores, *Nucleic Acid Res*, 1987, vol. 15, 9627-9639 [0061]
- 15 • **Campbell; Gowri**. *Plant Physiol.*, 1990, vol. 92, 1-11 [0062]
- **Murray** y colaboradores, *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 477-498 [0062]
- Von **Heijne** y colaboradores, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1991, vol. 9, 104-126 [0063]
- 20 • **Clark** y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 17544-17550 [0063]
- **Della-Cioppa** y colaboradores, *Plant Physiol.*, 1987, vol. 84, 965-968 [0063]
- 25 • **Romer** y colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 196, 1414-1421 [0063]
- **Shah** y colaboradores, *Science*, 1986, vol. 233, 478-481 [0063]
- **Hellens; Mullineaux**. *Trends in Plant Science*, 2000, vol. 5, 446-451 [0065] [0066]
- 30 • **Hiei** y colaboradores, *The Plant Journal*, 1994, vol. 6, 271-282 [0068] [0069]
- **Ishida** y colaboradores, *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 745-750 [0068] [0069]
- 35 • **Ayres; Park**. *Critical Reviews in Plant Science*, 1994, vol. 13, 219-239 [0068] [0069]
- **Bommineni; Jauhar**. *Maydica*, 1997, vol. 42, 107-120 [0068] [0069]
- **Svab** y colaboradores, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1990, vol. 87, 8526-8530 [0070]
- 40 • **Svab; Maliga**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 913-917 [0070]
- **Svab; Maliga**. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 601-606 [0070]
- 45 • **McBride** y colaboradores, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1994, vol. 91, 7301-7305 [0070]
- **McCormick** y colaboradores, *Plant Cell Reports*, 1986, vol. 5, 81-84 [0071]
- **Vázquez** y colaboradores, *Anal. Biochem.*, 2003, vol. 320 (2), 292-298 [0073]
- 50 • **Zhou; Panchuk-Voloshina**. *Anal. Biochem.*, 1997, vol. 253, 169-174 [0073]
- **Bradford**. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, 248-254 [0101]
- 55 • **Vázquez** y colaboradores, *Anal. Biochem.*, 2003, vol. 320, 292-298 [0102]
- **Short** y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 1988, vol. 16, 7583-7600 [0108]
- **Kozak**. *Nucleic Acids Research*, 1987, vol. 15, 8125-8148 [0135]
- 60 • **Joshi**. *Nucleic Acids Research*, 1987, vol. 15, 6643-6653 [0135]
- **McElroy** y colaboradores, *Molec. Gen. Genet.*, 1991, vol. 231, 150-160 [0136]
- 65 • **An** y colaboradores, *The Plant Cell*, 1989, vol. 1, 115-122 [0136]

REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico seleccionada entre:

- a) una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, o un complemento de la misma;
- b) una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, que codifica a una EPSPS de tolerancia al glifosato, o un complemento de la misma;
- c) la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o B-30949, o un complemento de la misma;
- d) una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6; y
- e) una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato.

2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia sintética que ha sido diseñada para expresión en una planta.

3. Un vector que comprende a la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; dicho vector comprendiendo opcionalmente adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

4. Una célula huésped que contiene al vector de la reivindicación 3.

5. Una célula huésped de la reivindicación 4 que es una célula huésped bacteriana o una célula de una planta.

6. Una planta transgénica que comprende a la célula huésped de la planta de la reivindicación 5, o una semilla transformada de dicha planta.

7. Un polipéptido aislado seleccionado entre:

- a) un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;
- b) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;
- c) un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato;
- d) un polipéptido que es codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y
- e) un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos para tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRR B-30949;

dicho polipéptido comprende opcionalmente además una secuencia heteróloga de aminoácidos.

8. Un método para la producción de un polipéptido con actividad de tolerancia al glifosato, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 4 bajo condiciones en las cuales se expresa una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido, siendo dicho polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:

- a) un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;
- b) un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;
- c) un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato;

ES 2 332 380 T3

- d) un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y

5 e) un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos para tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRR B-30949.

10 9. Un método para conferir tolerancia al glifosato en una planta, dicho método comprendiendo la transformación de dicha planta con una construcción de ADN, dicha construcción comprendiendo un promotor que dirige la expresión en una célula de una planta operativamente enlazada con una secuencia de nucleótidos al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos.: 1, 3 ó 5 que codifican una EPSPS de tolerancia al glifosato y que regeneran una planta transformada.

15 10. Una planta o célula de una planta que tiene incorporada en forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad de tolerancia al glifosato, en donde dicha secuencia de nucleótidos es seleccionada de:

20 a) una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5;

b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos de las SEQ ID Nos: 1, 3 ó 5, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad de tolerancia al glifosato;

25 c) una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6;

30 d) una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 2, 4 ó 6, en donde dicho polipéptido tiene actividad de tolerancia al glifosato; y

35 e) la secuencia de nucleótidos de tolerancia al glifosato del inserto de ADN del plásmido depositado como el Acceso No. NRRL B-30888 o NRRL B-30949; en donde dicha secuencia de nucleótidos está operativamente enlazada a un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación en una célula de una planta.

40 11. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a una enzima EPSPS de tolerancia al glifosato, en donde dicha enzima EPSPS de tolerancia al glifosato tiene una K_m para el fosfoenolpiruvato (PEP) entre 1 y 150 μM y una K_i (glifosato)/ K_m (PEP) entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000.

45 12. Una planta que tiene incorporada en forma estable en su genoma una construcción de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica a un polipéptido EPSPS, teniendo dicho polipéptido EPSPS una K_m para PEP entre 1 y 150 μM y una K_i (glifosato)/ K_m (PEP) entre 500 y 1000, exhibiendo dicha planta tolerancia al herbicida glifosato.

13. La planta de la reivindicación 12, donde dicha planta es una planta de soja o una planta de maíz.

50 14. La planta de la reivindicación 6 u 11, en donde dicha planta es una planta de maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, o colza oleaginosa.

55

60

65

GRG23	EA-SGLAGGEYEIEAHQSSQFASGLINAAFYARQGLRVIPN-PVSQPYLTMTLRMRDF	216
GRG51	EA-SGLAGGEYEIEAHQSSQFASGLINAAFYARQGLRVIPN-PVSQPYLTMTLRMRDF	193
B_Clausii	SG-EGLNGGKVMNSGQLSSQFISGCLLAAPLAKNPVSITVKDGIQQAYVRITIDLMAAF	225
R_xylophilus	RG-GARGGEISVSGERSQFLSGLLISAPCLPGGLTVRPRGALVSRPYVDITVRVMSF	232
E_coli	Q--GGFTGGNVDDGSSVSSQFLTALLMTAPLAPEDTVIRIKGDLVSKPYIDITLNLKTF	211
CP4	RG--PKTPTPTITRVPMASQVKSALLAGLNTPGITTVIEPIMTRDHTKMLQGFANL	214
zea_maize	NGIGGLPGGKVLSGSISSQYLSALLMAAPLALGDVEIEIIDKLISIPYVEMTLRMRF	220
	: * . . . : * . . . : *	
GRG23	GLET--STDGATVSVPPGR-YTAR-RYEIEPDASTASYFAAASAVSGRSFEFQGLGTDI	272
GRG51	GIET--STDGATVSVPPGR-YTAR-RYEIEPDASTASYFAAASAVSGRRFEFQGLGTDI	249
B_Clausii	GVEVKAAPDWSLLEVNPP-YVAN-DIAIEADASTACYFLAALATAGKIRIRHFSKTS	283
R_xylophilus	GASVEEESGAAFRVAPGA-YRAT-AKRVEPDASAASYFLAALATAGRVVPIGLGRSSL	290
E_coli	GVEIEN-QHYQQFVVKGGQSYQSPGYLVVEGDASSASYFLAALATAGRVVPIGLGRSSL	270
CP4	TVETDADGVRTIRLEGRGK--LTGQVIDVPGDPSSTAFPLVAALLVPG-SDVTILNVLMN	271
zea_maize	GVKAEHSDSWDRFYIKGGQKSPKNAYVEGDASSASYFLAALATAGRVVPIGLGRSSL	280
	. . . : * . . . : *	
GRG23	QGDTSFFNVLGRGAEVHWAPNSVTISGP-----ERLNGDIEVDMG---EISDTFMTL	322
GRG51	QGDTSFFNVLGRGAEVHWASNSVTISGP-----ERLTGDI EVDMG---EISDTFMTL	299
B_Clausii	QPDILFVSIILKRMGCNFEIGPSFVEGEGP-----TLRGGFTVNMN---ELSDQALTL	333
R_xylophilus	QGDVAFAGILRRMGCNFEIGPSFVEGEGP-----PRLRG-VEADMN---AISDTMMTL	339
E_coli	QGDIFADVLEKMGATICWGDDYISCT-----RGELNAIDMDMN---HIPDAAMTI	318
CP4	PTRTGLILTLQEMGADIEVINPRLAGGEDVADLRVRSSTLKGTVVPEDRAPSMIDEPIL	331
zea_maize	QGDVKFAEVLMMGAKVTWTETSVTVTGPPREP-FGRKHLKAIDVNMN---KMPDVAMTL	336
	: * : * . . . : * . . . : *	

FIG. 1B

GRG23	AAIAPLADGPITITNIGHARLKESDRISAMETNLRTLGVQTDVGHDMRIYP-----S	375
GRG51	AAIAPLADGPITITNIGHARLKESDRISAMESNLRMLGVQTDVGHDMRIYP-----S	352
B_Clausii	AAISPFADGPPIAIEGVGHIRHHECDRIRAICTELSRLGIRVEERHDGLTVYP-----G	386
R_xylanophilus	AAIAPFASPTLIKNVAHTRLOETDRLAAVAAELSRLGVRVHETPDSLRIP-----G	392
E_coli	ATAALFAKGTTRLRNIYNWRVKETDRLFAMATELRKVGAEVEEGHDYIRITPP-----E	372
CP4	AVAAAFAGATVMNGLEELRVKESDRLSAVANGLKLVGDCDEGETSLVVRGRPDGKGLG	391
Zea_maize	AVVALFADGPTAIRDVASWRVKETERMVAIRTELTKLGASVEEGPDYCIITPP-----E	390
	.: :... :.: * : * :* : * : * : *	
GRG23	TPHGGRVNVCHRDHRIAMAFSILGLR-VDGITLDDPQCVGKTFPGFFDYLGRLFPEKALT	434
GRG51	TPHGGRVNVCHRDHRIAMAFSILGLR-VDGITLDDPQCVGKTFPGFFDYLGRLFPEKALT	411
B_Clausii	QPKPTVNTYDDHRMAMALALIGAK-VDGIELDDPGCVAKTCPSYPSMLAQTGIGVKAVS	445
R_xylanophilus	KVRPAAIRTYGDRMAMAFSLVGLR-VRGVRILDPGCVTKTLPGYFRLLGLELRGG----	447
E_coli	KLNF AEIATYNDHRMAMCFSLVALS-DTPVTILDPKCTAKTFFPDYFEQLARISQAA----	427
CP4	NASGAAVA THLDHRIAMSFVLMGLVSENPTVDDATMIATSFPEFMDLMAGLGAKIELSD	451
Zea_maize	KLNVTAIDTYDDHRMAMAFSLAACA-EVPVTIRDPGCTRKTFPDYFDVLSTFVKN----	444
	: : :*... :.: : : * : * : * : *	
GRG23	PG--	436
GRG51	PG--	413
B_Clausii	P---	446
R_xylanophilus	----	
E_coli	----	
CP4	TKAA	455
Zea_maize	----	

FIG. 1C

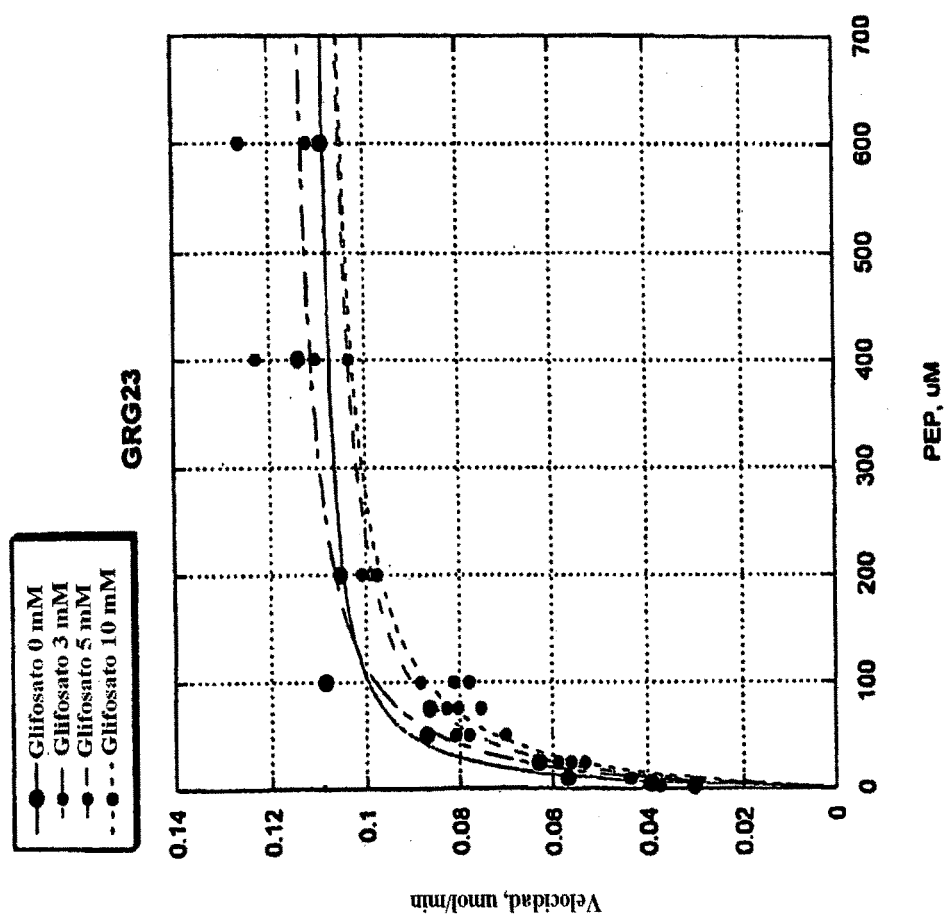


FIG. 2

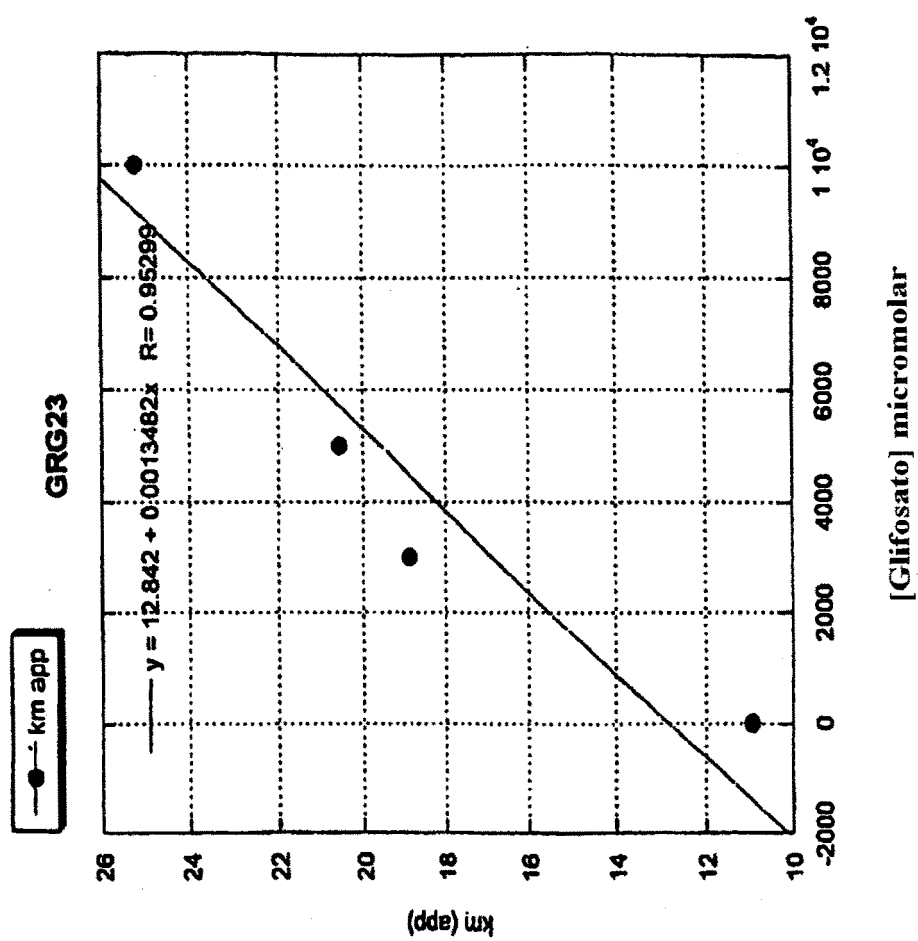


FIG. 3

ES 2 332 380 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cheryl Peters
 Jill Burdette
 5 Philip E. Hammer
 Brian Vande Berg
 Laura Cooper Schouten
 Brian Carr
 <120> Genes Grg23 y Grg51 que Confieren Resistencia a los Herbicidas
 10 <130> 45600/320129
 <150> 60/741.166
 <151> 2005-12-01
 15 <150> 60/817.799
 <151> 2006-06-30
 <160> 33
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 20 <210> 1
 <211> 1892
 <212> ADN
 25 <213> *Arthrobacter globiformis*
 <220>
 <221> características diversas
 <222> (0)...(0)
 30 <223> Cepa ATX21308
 <221> CDS
 <222> (109)...(1419)
 35 <221> características diversas
 <222> 1801
 <223> n = A,T,C o G
 <221> características diversas
 40 <222> 1801
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 1
 45
 . gggaccacat gctgctcctg atttcagggc tgctgccggt atggaccagg gtttagagag 60
 ggacggcacg catccgggcc cttatcggac caacgccaac agcggtcg gtg gcc ttg 117
 Met Ala Leu
 1
 50
 gag cgg ggc cag cac ggc cga tca cgt aga ctc ttt gga gct tcg ctc 165
 Glu Arg Gly Gln His Gly Arg Ser Arg Arg Leu Phe Gly Ala Ser Leu
 5 10 15
 55
 gaa agg atc acc atg gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa 213
 Glu Arg Ile Thr Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys
 20 25 30 35
 60
 65

ES 2 332 380 T3

	agc acc acc aac cgg gcc ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg	261
	Ser Ile Thr Asn Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr	
	40 45 50	
5	tcg gtc ctg gtg aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa	309
	Ser Val Leu Val Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys	
	55 60 65	
10	act gca att cag gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat	357
	Thr Ala Ile Gln Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn	
	70 75 80	
15	tgg gtc gtt gaa ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc	405
	Trp Val Val Glu Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile	
	85 90 95	
20	tgg tgc gag gat gca ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc	453
	Trp Cys Glu Asp Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val	
	100 105 110 115	
25	gcc gca gga cag ggg aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg	501
	Ala Ala Gly Gln Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg	
	120 125 130	
30	cgg cgc ccg ctt cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc	549
	Arg Arg Pro Leu Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala	
	135 140 145	
35	cgc gtc tcc tcc gag cag ctg ccc cta aca att gaa gcg agc ggg ctg	597
	Arg Val Ser Ser Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu	
	150 155 160	
40	gca ggc ggg gag tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc	645
	Ala Gly Gly Glu Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala	
	165 170 175	
45	tcc ggc ctg atc atg gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtg	693
	Ser Gly Leu Ile Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val	
	180 185 190 195	
50	cgg ata cca aat ccc gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg	741
	Arg Ile Pro Asn Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg	
	200 205 210	
55	atg atg agg gac ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc	789
	Met Met Arg Asp Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val	
	215 220 225	
60	agc gtc cct ccc ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa att gaa ccg	837
	Ser Val Pro Pro Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro	
	230 235 240	
65	gac gcg tca act gcg tog tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc	885
	Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly	
	245 250 255	
70	cga agc ttc gaa ttc cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac	933
	Arg Ser Phe Glu Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp	
	260 265 270 275	
75	acg tca ttc ttc aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gca gag gtc cac tgg	981

ES 2 332 380 T3

	Thr	Ser	Phe	Phe	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	
					280					285					290		
5	gca	ccc	aac	tcg	gtc	acc	ata	tcc	gga	ccg	gaa	agg	ctg	aac	ggc	gac	1029
	Ala	Pro	Asn	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asp	
				295				300					305				
10	att	gaa	gtg	gat	atg	ggc	gag	ata	tcg	gac	acc	ttc	atg	aca	ctc	gcg	1077
	Ile	Glu	Val	Asp	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	
			310				315					320					
15	gcg	att	gcc	cct	cta	gcc	gat	gga	ccc	atc	acg	ata	acc	aac	att	ggc	1125
	Ala	Ile	Ala	Pro	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	
			325				330					335					
20	cat	gca	cgg	ttg	aag	gaa	tcc	gac	cgc	atc	tcg	gcg	atg	gaa	acc	aac	1173
	His	Ala	Arg	Leu	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	
	340					345					350				355		
25	ctg	cga	acg	ctc	ggt	gta	caa	acc	gac	gtc	gga	cac	gac	tgg	atg	cga	1221
	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	
				360						365					370		
30	atc	tac	ccc	tct	acc	ccg	cac	ggc	ggc	aga	gtc	aat	tgc	cac	cgg	gac	1269
	Ile	Tyr	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	
				375					380					385			
35	cac	agg	atc	gcc	atg	gcg	ttt	tca	atc	ctg	gga	ctg	cga	gtg	gac	ggg	1317
	His	Arg	Ile	Ala	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	
			390					395					400				
40	att	acc	ctc	gac	gac	cct	caa	tgt	gtc	ggg	aag	acc	ttt	cct	ggc	ttc	1365
	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	
		405					410					415					
45	ttc	gac	tac	ctt	gga	cgc	ctt	ttc	ccc	gaa	aag	gcg	ctt	acg	ctc	ccc	1413
	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	
		420				425					430				435		
50	ggc	tag	tgacttcctc	tccggcggac	gctaggcatc	ggaaaacgaa	tcctgacatg										1469
	Gly	*															
55	accgacctcc	tcgcgtcacg	gcgtgtotgc	cggtacccaa	gcattctgce	ttagccgctt											1529
	ccgcggccccc	ttatgctttc	tggttgtecca	gatttttcac	cgggatggtg	cctgaccttg											1589
	agcagggcaa	tcagctgttc	agcactgtca	atggtgtggg	ccctgaaggc	ggcttcgatg											1649
	gctgccacgt	cgggcgctct	catcgctgtc	acgacacgca	gatgcgcttc	ataggcacgt											1709
	tcaggatccg	ccctcgctgc	ctgatcctga	gccaaaggcaa	tagttagatg	tgctccggt											1769
	ggcggccaga	gccgaagcaa	taaggagttt	tncgaggcca	cccagattcc	ccgggtggaa											1829
	ggcgatatgg	gcttcatgct	gaactatggg	gtccggatgg	aagtgacttt	tcaactctgc											1889
	cca																1892

<210> 2

55 <211> 436

<212> PRT

<213> *Arthrobacter globiformis*

60 <400> 2

Met Ala Leu Glu Arg Gly Gln His Gly Arg Ser Arg Arg Leu Phe Gly
1 5 10 15
65 Ala Ser Leu Glu Arg Ile Thr Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro

ES 2 332 380 T3

			20				25			30				
	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala
			35				40					45		
5	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp
		50					55					60		
	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser
	65					70					75			80
10	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His
					85					90				95
	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe
			100						105					110
	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly
15			115					120					125	
	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile
	130						135					140		
	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile
	145				150						155			160
20	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser
					165				170					175
	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg
			180						185					190
25	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu
		195					200					205		
	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr
	210					215						220		
	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg
30		225				230					235			240
	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala
				245					250					255
	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp
			260					265						270
35	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly
		275					280					285		
	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu
		290				295					300			
40	Asn	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr
		305				310					315			320
	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr
				325					330					335
	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser
			340					345						350
45	Glu	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly
		355					360					365		
	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val
		370				375					380			
50	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly
		385				390				395				400
	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys
				405					410					415
55	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys
			420					425					430	
	Thr	Leu	Pro	Gly										
			435											

- 60 <210> 3
- <211> 1892
- <212> ADN
- <213> *Arthrobacter globiformis*
- 65 <220>
- <221> CDS

ES 2 332 380 T3

<222> (178)...(1419)

<221> características diversas

<222> 1801

5 <223> n = A,T,C o G

<400> 3

```

10      gggaccacat gctgctcctg atttcagggc tgctgccggt atggaccagg gtttagagag 60
      ggacggcacg catccgggcc cttatcggac caacgccaac agcggtcggt ggccttggag 120
      cggggccagc acggccgatc acgtagactc tttggagctt cgctcgaaag gatcacc atg 180
                                          Met
                                          1

15      gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac cgg 228
      Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn Arg
              5              10              15

20      gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg aga 276
      Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val Arg
              20              25              30

25      cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag gcc 324
      Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln Ala
              35              40              45

30      ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa ggc 372
      Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu Gly
              50              55              60              65

35      ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat gca 420
      Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp Ala
              70              75              80

40      ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag ggg 468
      Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln Gly
              85              90              95

45      aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt cgg 516
      Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu Arg
              100              105              110

50      ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc gag 564
      Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser Glu
              115              120              125

55      cag ctg ccc cta aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag tac 612
      Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu Tyr
              130              135              140              145

60      gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc atg 660
      Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile Met
              150              155              160

65      gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat ccc 708
      Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn Pro
              165              170              175

      gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac ttc 756
      Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp Phe
              180              185              190

```

ES 2 332 380 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct ccc ggg 804
 Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro Gly
 195 200 205

cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa att gaa ccg gac gcg tca act gcg 852
 Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr Ala
 210 215 220 225

tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc cga agc ttc gaa ttc 900
 Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu Phe
 230 235 240

cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc aat 948
 Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe Asn
 245 250 255

gta ctt ggg cgg ctc ggt gca gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg gtc 996
 Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser Val
 260 265 270

acc ata tcc gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat atg 1044
 Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp Met
 275 280 285

ggc gag ata tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct cta 1092
 Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro Leu
 290 295 300 305

gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggc cat gca cgg ttg aag 1140
 Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu Lys
 310 315 320

gaa tcc gac cgc atc tcg gcg atg gaa acc aac ctg cga acg ctc ggt 1188
 Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu Gly
 325 330 335

gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg cga atc tac ccc tct acc 1236
 Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser Thr
 340 345 350

ccg cac ggc ggc aga gtc aat tgc cac cgg gac cac agg atc gcc atg 1284
 Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala Met
 355 360 365

gcg ttt tca atc ctg gga ctg cga gtg gac ggg att acc ctc gac gac 1332
 Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp Asp
 370 375 380 385

cct caa tgt gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt gga 1380
 Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu Gly
 390 395 400

cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag tgacttcctc 1429
 Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
 405 410

tccggcggac gctaggcatc ggaaaacgaa tcctgacatg accgacctcc tcgcgtcacg 1489
 gcgtgtctgc cggtaaccaa gcattctgcc ttagccgctt ccgcggccccc ttatgctttc 1549
 tgggtgtcca gattttcatc cgggatgttg cctgaccttg agcagggcaa tcagctgttc 1609
 agcactgtca atggtgtggg cctgaaggc ggcttcgatg gctgccacgt cggcggctct 1669

catcgtgtc acgacacgca gatgcgcttc ataggcacgt tcaggatccg ccctcgtcgc 1729
 ctgacacctga gccaaaggca tagttagatg tgctccggtt ggccggccaga gccgaagcaa 1789
 taaggagttt tncgaggcca cccagattcc ccgggtggaa ggcatatgg gcttcatgct 1849
 gaactatggg gtccggatgg aagtgacttt tcaactctgc cca 1892

ES 2 332 380 T3

<210> 4

<211> 413

<212> PRT

5 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 4

10	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn	
	1				5					10				15			
	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val	
				20					25					30			
15	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln	
			35					40					45				
	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu	
		50					55					60					
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp	
20	65					70					75					80	
	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln	
					85					90					95		
	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu	
				100					105					110			
25	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser	
			115					120					125				
	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu	
		130					135				140						
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	
30	145					150					155					160	
	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn	
					165					170					175		
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp	
				180					185					190			
35	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro	
			195					200					205				
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr	
		210					215					220					
40	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu	
	225					230					235					240	
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	
					245					250					255		
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser	
45			260						265					270			
	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	
			275					280					285				
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	
		290					295					300					
50	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu	
	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu	
					325					330					335		
55	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser	
				340					345					350			
	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala	
			355					360					365				
	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	
60		370					375					380					
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu	
	385					390					395					400	
65																	
	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly				
					405						410						

ES 2 332 380 T3

	<210> 5	
	<211> 1242	
	<212> ADN	
5	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> Aislado a partir de la muestra de suelo	
10	<221> CDS	
	<222> (1)...(1242)	
	<400> 5	
15	atg gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48	
	Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn	
	1 5 10 15	
20	cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc gcg tcg gtc ctg gtg 96	
	Arg Ala Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Ala Ser Val Leu Val	
	20 25 30	
25	aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag 144	
	Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln	
	35 40 45	
30	gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcg gac ggt gat gat tgg gtc gtt gaa 192	
	Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Trp Val Val Glu	
	50 55 60	
35	ggc ctg ggc cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat 240	
	Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp	
	65 70 75 80	
40	gcc ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag 288	
	Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln	
	85 90 95	
45	ggg aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336	
	Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu	
	100 105 110	
50	cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384	
	Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser	
	115 120 125	
55	gag cag ctg ccc cta acg att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432	
	Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu	
	130 135 140	
60	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggt ctg atc 480	
	Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
	145 150 155 160	
65	atg gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtt cgg ata cca aat 528	
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
70	ccc gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576	

ES 2 332 380 T3

	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp	
				180					185					190			
5	ttc	ggc	att	gag	acc	agc	acc	gac	gga	gcg	acc	gtc	agc	gtt	cct	ccc	624
	Phe	Gly	Ile	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro	
			195					200					205				
10	ggg	cgc	tac	aca	gcg	cgg	cgg	tat	gag	att	gaa	ccg	gac	gcg	tca	act	672
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr	
			210				215					220					
15	gcg	tcg	tac	ttc	gcc	gcc	gct	tcc	gcc	gtc	tct	ggc	cgg	cgc	ttc	gaa	720
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Arg	Phe	Glu	
	225					230					235					240	
20	ttc	cag	ggc	ctt	ggc	aca	gac	agc	atc	caa	ggc	gac	acg	tca	ttc	ttc	768
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	
				245						250					255		
25	aat	gta	ctt	ggg	cgg	ctc	ggc	gca	gag	gtc	cac	tgg	gca	tcc	aac	tcg	816
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Ser	Asn	Ser	
			260						265					270			
30	gtc	acc	ata	tcc	gga	ccg	gaa	agg	ctg	acc	ggc	gac	att	gaa	gtg	gat	864
	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	
			275					280					285				
35	atg	ggc	gag	ata	tcg	gac	acc	ttc	atg	aca	ctg	gcg	gcg	att	gcc	cct	912
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	
		290					295					300					
40	cta	gcc	gat	gga	ccc	atc	acg	ata	aca	aac	att	ggc	cat	gca	cgg	ttg	960
	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu	
	305					310					315					320	
45	aag	gaa	tcc	gac	cgc	atc	tcg	gcg	atg	gaa	agc	aac	ctt	cga	atg	ctc	1008
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Ser	Asn	Leu	Arg	Met	Leu	
					325					330					335		
50	ggg	gta	caa	acc	gac	gtc	gga	cac	gac	tgg	atg	cga	atc	tac	ccc	tct	1056
	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser	
				340					345					350			
55	acc	ccg	cac	ggc	ggc	aga	gtc	aat	tgc	cac	cgg	gac	cac	agg	atc	gcc	1104
	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala	
			355					360					365				
60	atg	gcg	ttt	tca	atc	ctg	gga	ctg	cga	gtg	gac	ggg	att	acc	ctc	gac	1152
	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp	
		370					375					380					
65	gac	cct	caa	tgt	gtc	ggg	aag	acc	ttt	cct	ggc	ttc	ttc	gac	tac	ctt	1200
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu	
						390					395					400	
70	gga	cgc	ctt	ttc	ccg	gaa	aag	gcg	ctt	acg	ctc	ccc	ggc	tag			1242
	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly	*			
					405					410							

ES 2 332 380 T3

<210> 6
 <211> 413
 <212> PRT
 5 <213> Desconocido
 <220>
 <223> aislado de la muestra de suelo
 10 <400> 6

	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10					15	
15	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Val
				20					25					30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35				40						45			
20	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asp	Trp	Val	Val	Glu
		50				55						60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65				70						75				80	
	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
25				85					90						95	
	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
	Arg	Pro	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
			115				120						125			
30	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
		130				135						140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
	145				150						155				160	
35	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
				165						170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180				185					190			
	Phe	Gly	Ile	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro
40			195				200					205				
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
		210				215					220					
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Arg	Phe	Glu	
	225				230					235				240		
45	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
				245						250				255		
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Ser	Asn	Ser
			260				265						270			
50	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp
		275				280						285				
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
		290				295					300					
	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
	305				310					315				320		
55	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Ser	Asn	Leu	Arg	Met	Leu
				325						330				335		
	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser
			340				345						350			
60	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala
		355				360						365				
	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp
		370				375					380					
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu
65		385			390						395				400	
	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly			
				405						410						

ES 2 332 380 T3

<210> 7

<211> 446

<212> PRT

5 <213> *Bacillus clausii*

<400> 7

```

10      Met Val Gln Phe Asp Ser Gln Ala Arg Ser Pro Trp Thr Pro Leu Ala
        1          5          10          15
      Gly Val Glu Arg Leu Arg Leu Thr Pro Ser Gln Lys Arg Ile Asn Ala
        20          25          30
15      Thr Leu Glu Val Pro Gly Ser Lys Ser Ala Thr Asn Arg Ala Leu Leu
        35          40          45
      Leu Ala Ala Val Ala Ser Gly Thr Ser Thr Leu Arg Asn Ala Leu Lys
        50          55          60
      Ser Asp Asp Thr Tyr Trp Cys Ile Glu Ala Leu Lys Lys Thr Gly Val
        65          70          75          80
      Glu Ile Ala Val Asp Gly Ser Asn Val Thr Val Tyr Gly Arg Gly Gly
        85          90          95
      Val Phe His Ser Gly Ser Leu Tyr Ile Gly Ser Ala Gly Thr Ala Gly
        100          105          110
25      Arg Phe Leu Pro Gly Met Leu Ala Ala Thr Gly Asn Trp His Val
        115          120          125
      Glu Ala Ser His Ser Met Asn Lys Arg Pro Ile Ala Pro Leu Val Lys
        130          135          140
      Thr Leu Gln Ala Leu Gly Ala Asn Ile Gln Tyr Gly Ser Arg Arg Gly
        145          150          155          160
30      His Tyr Pro Leu Ser Ile Ser Gly Glu Gly Leu Asn Gly Gly Lys Val
        165          170          175
      Asn Met Ser Gly Gln Leu Ser Ser Gln Phe Ile Ser Gly Cys Leu Leu
        180          185          190
35      Ala Ala Pro Leu Ala Lys Asn Pro Val Ser Ile Thr Val Lys Asp Gly
        195          200          205
      Ile Val Gln Gln Ala Tyr Val Arg Ile Thr Ile Asp Leu Met Ala Ala
        210          215          220
      Phe Gly Val Glu Val Lys Ala Ala Pro Asp Trp Ser Leu Leu Glu Val
        225          230          235          240
40      Asn Pro Ser Pro Tyr Val Ala Asn Asp Ile Ala Ile Glu Ala Asp Ala
        245          250          255
      Ser Thr Ala Cys Tyr Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ile Thr Ala Gly Lys
        260          265          270
45      Ile Arg Ile Arg His Phe Ser Thr Lys Thr Ser Gln Pro Asp Ile Leu
        275          280          285
      Phe Val Ser Ile Leu Lys Arg Met Gly Cys Asn Phe Glu Ile Gly Pro
        290          295          300
50      Ser Phe Val Glu Gly Glu Gly Pro Thr Arg Leu Arg Gly Gly Phe Thr
        305          310          315          320
      Val Asn Met Asn Glu Leu Ser Asp Gln Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ile
        325          330          335
      Ser Pro Phe Ala Asp Gly Pro Ile Ala Ile Glu Gly Val Gly His Ile
        340          345          350
55      Arg His His Glu Cys Asp Arg Ile Arg Ala Ile Cys Thr Glu Leu Ser
        355          360          365
      Arg Leu Gly Ile Arg Val Glu Glu Arg His Asp Gly Leu Thr Val Tyr
        370          375          380
60      Pro Gly Gln Pro Lys Pro Thr Val Val Asn Thr Tyr Asp Asp His Arg
        385          390          395          400
      Met Ala Met Ala Leu Ala Leu Ile Gly Ala Lys Val Asp Gly Ile Glu
        405          410          415
      Leu Asp Asp Pro Gly Cys Val Ala Lys Thr Cys Pro Ser Tyr Phe Ser
        420          425          430
65      Met Leu Ala Gln Thr Gly Ile Gly Val Lys Ala Val Ser Pro
        435          440          445

```

ES 2 332 380 T3

<210> 8

<211> 447

<212> PRT

5 <213> *Rubrobacter xylanophilus*

<400> 8

10	Met	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Asp	Phe	Gly	Ile	Glu	Glu
	1				5					10				15		
	Val	Arg	Gly	Ser	Phe	Pro	Glu	Glu	Met	Glu	Val	Ala	Pro	Leu	Glu	Arg
				20					25					30		
	Pro	Pro	Asp	Ala	Thr	Val	Arg	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
15			35					40					45			
	Arg	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Ile	Glu
		50					55					60				
	Asn	Pro	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Pro	Phe	Trp	Leu	Met	Asn	Ala	Leu	Val
	65					70					75				80	
20	Gly	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Arg	Val	Gly	Glu	Gly	Ala	Val	Glu	Val	
					85					90					95	
	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Asp	Val	Phe	Val
				100					105					110		
	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu
25			115					120					125			
	Gly	Ser	Gly	Pro	Tyr	Arg	Val	Asp	Gly	Thr	Pro	Arg	Met	Arg	Glu	Arg
		130					135					140				
	Pro	Val	Ala	Glu	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Arg	Val
	145					150					155					160
30	Glu	Cys	Glu	Glu	Arg	Glu	Gly	His	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Arg	Gly	Gly
					165					170					175	
	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Glu	Ile	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Gln
				180				185						190		
35	Phe	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Pro	Cys	Leu	Pro	Gly	Gly	Leu
		195						200					205			
	Thr	Val	Arg	Pro	Arg	Gly	Ala	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Tyr	Val	Asp	Ile
		210					215						220			
	Thr	Val	Arg	Val	Met	Arg	Ser	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Glu	Pro
40	225					230					235					240
	Ser	Gly	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Tyr	Arg	Ala	Thr	Ala
					245					250					255	
	Tyr	Arg	Val	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Ala	Ala	Ser	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala
				260				265						270		
45	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Arg	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser
			275					280					285			
	Ser	Leu	Gln	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Arg	Met	Gly
		290					295					300				
	Cys	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Glu	Asp	Arg	Ile	Glu	Leu	Ala	Gly	Pro	Pro
50	305					310					315					320
	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Glu	Ala	Asp	Met	Asn	Ala	Ile	Ser	Asp	Thr	Met
					325					330					335	
	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro	Phe	Ala	Ser	Ser	Pro	Thr	Leu	Ile
				340				345						350		
55	Lys	Asn	Val	Ala	His	Thr	Arg	Leu	Gln	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Ala	Ala
		355						360					365			
	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Gly	Val	Arg	Val	His	Glu	Thr	Pro
		370					375					380				
60	Asp	Ser	Leu	Arg	Ile	Ile	Pro	Gly	Lys	Val	Arg	Pro	Ala	Ala	Ile	Arg
	385					390					395					400
	Thr	Tyr	Gly	Asp	His	Arg	Met	Ala	Met	Ala	Phe	Ser	Leu	Val	Gly	Leu
					405					410					415	
	Arg	Val	Arg	Gly	Val	Arg	Ile	Leu	Asp	Pro	Gly	Cys	Val	Thr	Lys	Thr
				420					425					430		
65	Leu	Pro	Gly	Tyr	Phe	Arg	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	
				435				440					445			

ES 2 332 380 T3

<210> 9

<211> 444

<212> PRT

5 <213> *Zea mays*

<400> 9

```

10      Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
        1          5          10          15
      Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
        20          25          30
15      Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
        35          40          45
      Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
        50          55          60
      Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
        65          70          75          80
20      Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
        85          90          95
      Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
        100          105          110
25      Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
        115          120          125
      Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
        130          135          140
      Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
        145          150          155          160
30      Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
        165          170          175
      Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
        180          185          190
35      Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
        195          200          205
      Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
        210          215          220
40      Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
        225          230          235          240
      Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
        245          250          255
      Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
        260          265          270
45      Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
        275          280          285
      Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
        290          295          300
50      Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
        305          310          315          320
      Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
        325          330          335
      Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
        340          345          350
55      Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
        355          360          365
      Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
        370          375          380
60      Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
        385          390          395          400
      Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
        405          410          415
      Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
        420          425          430
65      Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
        435          440

```

ES 2 332 380 T3

<210> 10

<211> 455

<212> PRT

5 <213> *Agrobacterium* sp.

<400> 10

```

10      Met Ser His Gly Ala Ser Ser Arg Pro Ala Thr Ala Arg Lys Ser Ser
      1          5          10          15
      Gly Leu Ser Gly Thr Val Arg Ile Pro Gly Asp Lys Ser Ile Ser His
      20          25          30
      Arg Ser Phe Met Phe Gly Gly Leu Ala Ser Gly Glu Thr Arg Ile Thr
      35          40          45
15      Gly Leu Leu Glu Gly Glu Asp Val Ile Asn Thr Gly Lys Ala Met Gln
      50          55          60
      Ala Met Gly Ala Arg Ile Arg Lys Glu Gly Asp Thr Trp Ile Ile Asp
      65          70          75          80
20      Gly Val Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ala Pro Glu Ala Pro Leu Asp Phe
      85          90          95
      Gly Asn Ala Ala Thr Gly Cys Arg Leu Thr Met Gly Leu Val Gly Val
      100          105          110
      Tyr Asp Phe Asp Ser Thr Phe Ile Gly Asp Ala Ser Leu Thr Lys Arg
      115          120          125
25      Pro Met Gly Arg Val Leu Asn Pro Leu Arg Glu Met Gly Val Gln Val
      130          135          140
      Lys Ser Glu Asp Gly Asp Arg Leu Pro Val Thr Leu Arg Gly Pro Lys
      145          150          155          160
30      Thr Pro Thr Pro Ile Thr Tyr Arg Val Pro Met Ala Ser Ala Gln Val
      165          170          175
      Lys Ser Ala Val Leu Leu Ala Gly Leu Asn Thr Pro Gly Ile Thr Thr
      180          185          190
      Val Ile Glu Pro Ile Met Thr Arg Asp His Thr Glu Lys Met Leu Gln
      195          200          205
35      Gly Phe Gly Ala Asn Leu Thr Val Glu Thr Asp Ala Asp Gly Val Arg
      210          215          220
      Thr Ile Arg Leu Glu Gly Arg Gly Lys Leu Thr Gly Gln Val Ile Asp
      225          230          235          240
40      Val Pro Gly Asp Pro Ser Ser Thr Ala Phe Pro Leu Val Ala Ala Leu
      245          250          255
      Leu Val Pro Gly Ser Asp Val Thr Ile Leu Asn Val Leu Met Asn Pro
      260          265          270
      Thr Arg Thr Gly Leu Ile Leu Thr Leu Gln Glu Met Gly Ala Asp Ile
      275          280          285
45      Glu Val Ile Asn Pro Arg Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Asp Leu
      290          295          300
      Arg Val Arg Ser Ser Thr Leu Lys Gly Val Thr Val Pro Glu Asp Arg
      305          310          315          320
      Ala Pro Ser Met Ile Asp Glu Tyr Pro Ile Leu Ala Val Ala Ala Ala
      325          330          335
50      Phe Ala Glu Gly Ala Thr Val Met Asn Gly Leu Glu Glu Leu Arg Val
      340          345          350
      Lys Glu Ser Asp Arg Leu Ser Ala Val Ala Asn Gly Leu Lys Leu Asn
      355          360          365
55      Gly Val Asp Cys Asp Glu Gly Thr Ser Leu Val Val Arg Gly Arg
      370          375          380
      Pro Asp Gly Lys Gly Leu Gly Asn Ala Ser Gly Ala Ala Val Ala Thr
      385          390          395          400
60      His Leu Asp His Arg Ile Ala Met Ser Phe Leu Val Met Gly Leu Val
      405          410          415
      Ser Glu Asn Pro Val Thr Val Asp Asp Ala Thr Met Ile Ala Thr Ser
      420          425          430
      Phe Pro Glu Phe Met Asp Leu Met Ala Gly Leu Gly Ala Lys Ile Glu
      435          440          445
65      Leu Ser Asp Thr Lys Ala Ala
      450          455

```

ES 2 332 380 T3

<210> 11

<211> 427

<212> PRT

5 <213> *E. coli*

<400> 11

```

10      Met Glu Ser Leu Thr Leu Gln Pro Ile Ala Arg Val Asp Gly Thr Ile
        1          5          10          15
      Asn Leu Pro Gly Ser Lys Thr Val Ser Asn Arg Ala Leu Leu Ala
        20          25          30
15      Ala Leu Ala His Gly Lys Thr Val Leu Thr Asn Leu Leu Asp Ser Asp
        35          40          45
      Asp Val Arg His Met Leu Asn Ala Leu Thr Ala Leu Gly Val Ser Tyr
        50          55          60
      Thr Leu Ser Ala Asp Arg Thr Arg Cys Glu Ile Ile Gly Asn Gly Gly
        65          70          75          80
      Pro Leu His Ala Glu Gly Ala Leu Glu Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
        85          90          95
      Thr Ala Met Arg Pro Leu Ala Ala Ala Leu Cys Leu Gly Ser Asn Asp
        100          105          110
25      Ile Val Leu Thr Gly Glu Pro Arg Met Lys Glu Arg Pro Ile Gly His
        115          120          125
      Leu Val Asp Ala Leu Arg Leu Gly Gly Ala Lys Ile Thr Tyr Leu Glu
        130          135          140
30      Gln Glu Asn Tyr Pro Pro Leu Arg Leu Gln Gly Gly Phe Thr Gly Gly
        145          150          155          160
      Asn Val Asp Val Asp Gly Ser Val Ser Ser Gln Phe Leu Thr Ala Leu
        165          170          175
      Leu Met Thr Ala Pro Leu Ala Pro Glu Asp Thr Val Ile Arg Ile Lys
        180          185          190
35      Gly Asp Leu Val Ser Lys Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Leu Asn Leu Met
        195          200          205
      Lys Thr Phe Gly Val Glu Ile Glu Asn Gln His Tyr Gln Gln Phe Val
        210          215          220
40      Val Lys Gly Gly Gln Ser Tyr Gln Ser Pro Gly Thr Tyr Leu Val Glu
        225          230          235          240
      Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Ala Ala Ile Lys
        245          250          255
45      Gly Gly Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Gly Arg Asn Ser Met Gln Gly
        260          265          270
      Asp Ile Arg Phe Ala Asp Val Leu Glu Lys Met Gly Ala Thr Ile Cys
        275          280          285
      Trp Gly Asp Asp Tyr Ile Ser Cys Thr Arg Gly Glu Leu Asn Ala Ile
        290          295          300
50      Asp Met Asp Met Asn His Ile Pro Asp Ala Ala Met Thr Ile Ala Thr
        305          310          315          320
      Ala Ala Leu Phe Ala Lys Gly Thr Thr Arg Leu Arg Asn Ile Tyr Asn
        325          330          335
55      Trp Arg Val Lys Glu Thr Asp Arg Leu Phe Ala Met Ala Thr Glu Leu
        340          345          350
      Arg Lys Val Gly Ala Glu Val Glu Glu Gly His Asp Tyr Ile Arg Ile
        355          360          365
60      Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Phe Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Asn Asp
        370          375          380
      His Arg Met Ala Met Cys Phe Ser Leu Val Ala Leu Ser Asp Thr Pro
        385          390          395          400
      Val Thr Ile Leu Asp Pro Lys Cys Thr Ala Lys Thr Phe Pro Asp Tyr
        405          410          415
65      Phe Glu Gln Leu Ala Arg Ile Ser Gln Ala Ala
        420          425

```

ES 2 332 380 T3

<210> 12
 <211> 1242
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> grg23 sintético
 <221> CDS
 10 <222> (1)...(1242)

 <400> 12

15
 atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15
 20
 cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30
 25
 aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45
 30
 gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
 50 55 60
 35
 ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 40
 gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95
 45
 ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
 100 105 110
 50
 55
 60
 65
 cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
 Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125

ES 2 332 380 T3

		gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag	432
		Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu	
		130 135 140	
5		tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc	480
		Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
		145 150 155 160	
10		atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
		Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
		165 170 175	
15		ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
		Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
		180 185 190	
20		ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca	624
		Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	
		195 200 205	
25		ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act	672
		Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	
		210 215 220	
30		gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa	720
		Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu	
		225 230 235 240	
35		ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc	768
		Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	
		245 250 255	
40		aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg	816
		Asn Val Leu Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser	
		260 265 270	
45		gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat	864
		Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp	
		275 280 285	
50		atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct	912
		Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	
		290 295 300	
55		ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg	960
		Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	
		305 310 315 320	
60		aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc	1008
		Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu	
		325 330 335	
65		ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct	1056
		Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	
		340 345 350	
70		acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct	1104
		Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	
		355 360 365	
75		atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac	1152

ES 2 332 380 T3

5 Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
 370 375 380
 gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
 385 390 395 400
 gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
 10 Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
 405 410

<210> 13
 <211> 413
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> grg23 sintético
 <400> 13

25 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15
 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30
 30 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45
 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
 50 55 60
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 35 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95
 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
 100 105 110
 40 Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125
 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
 130 135 140
 Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
 145 150 155 160
 45 Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
 165 170 175
 Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
 180 185 190
 50 Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
 195 200 205
 Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
 210 215 220
 Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
 225 230 235 240
 55 Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
 245 250 255
 Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
 260 265 270
 60 Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
 275 280 285
 Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
 290 295 300
 65 Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu

ES 2 332 380 T3

305 310 315 320
 Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
 325 330 335
 Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
 5 340 345 350
 Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
 355 360 365
 Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
 10 370 375 380
 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
 385 390 395 400
 Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
 405 410

15 <210> 14
 <211> 1242
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> grg23 (ace1)
 <221> CDS
 25 <222> (1)...(1242)

 <400> 14

30 atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tgc aaa agc atc acc aac 48
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15

 35 cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tgc gtc ctg gtg 96
 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30

 40 aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45

 45 acc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
 Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
 50 55 60

 50 ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80

 55 gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95

 60 ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
 100 105 110

 65 cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
 Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125

 gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu

ES 2 332 380 T3

	130	135	140	
5	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile 145 150 155 160	480		
10	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn 165 170 175	528		
15	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp 180 185 190	576		
20	ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro 195 200 205	624		
25	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr 210 215 220	672		
30	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu 225 230 235 240	720		
35	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe 245 250 255	768		
40	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser 260 265 270	816		
45	gtc acc ata act gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp 275 280 285	864		
50	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro 290 295 300	912		
55	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu 305 310 315 320	960		
60	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu 325 330 335	1008		
65	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser 340 345 350	1056		
70	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala 355 360 365	1104		
75	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp 370 375 380	1152		
80	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu 385 390 395 400	1200		
85	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *	1242		
	405 410			

ES 2 332 380 T3

<210> 15

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (ace1)

10 <400> 15

```

Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1      5      10      15
15 Arg Ala Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
   20      25      30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
   35      40      45
20 Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
   50      55      60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65      70      75      80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
   85      90      95
25 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
   100      105      110
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
   115      120      125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
30      130      135      140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145      150      155      160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
   165      170      175
35 Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
   180      185      190
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
   195      200      205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
40      210      215      220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225      230      235      240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
   245      250      255
45 Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
   260      265      270
Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
   275      280      285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290      295      300
50 Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305      310      315      320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
   325      330      335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
55      340      345      350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
   355      360      365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370      375      380
60 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385      390      395      400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
   405      410

```

65

ES 2 332 380 T3

<210> 16
 <211> 1242
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> grg23 (ace2)
 10 <221> CDS
 <222> (1)...(1242)

 <400> 16

 15 atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15

 20 cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30

 25 aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45

 30 gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
 50 55 60

 35 ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80

 40 gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95

 45 ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
 100 105 110

 50 cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
 Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125

 55 gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
 130 135 140

 60

 65

ES 2 332 380 T3

	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc	480
	Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
	145 150 155 160	
5	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
10	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
	180 185 190	
15	ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca	624
	Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	
	195 200 205	
20	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act	672
	Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	
	210 215 220	
25	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa	720
	Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu	
	225 230 235 240	
30	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc	768
	Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	
	245 250 255	
35	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg	816
	Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser	
	260 265 270	
40	gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat	864
	Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp	
	275 280 285	
45	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct	912
	Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	
	290 295 300	
50	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg	960
	Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	
	305 310 315 320	
55	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc	1008
	Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu	
	325 330 335	
60	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct	1056
	Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	
	340 345 350	
65	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct	1104
	Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	
	355 360 365	
70	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac	1152
	Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	
	370 375 380	
75	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt	1200

ES 2 332 380 T3

Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

<210> 17
<211> 413
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> grg23 (ace2)
<400> 17

Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser

ES 2 332 380 T3

5 Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
 340 345 350
 355 360 365
 Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
 370 375 380
 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
 385 390 395 400
 Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
 405 410

<210> 18
 <211> 1242.
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> grg51.4
 <221> CDS
 <222> (1)...(1242)
 25 <400> 18

atg gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15
 30 cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30
 35 aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag 144
 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45
 40 gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcg gac ggt gat gat tgg gtc gtt gaa 192
 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
 50 55 60
 45 ggc ctg ggc cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat 240
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 gcc ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag 288
 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95
 50 ggg aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
 100 105 110
 55 cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
 Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125
 60 gag cag ctg ccc cta acg att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
 130 135 140
 tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggt ctg atc 480
 Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile

ES 2 332 380 T3

	145	150	155	160	
5	atg gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtt cgg ata cca aat Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	165	170	175	528
10	ccc gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	180	185	190	576
15	ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcg acc gtc agc gtt cct ccc Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	195	200	205	624
20	ggg cgc tac aca gcg cgg cgg tat gag att gaa ccg gac gcg tca act Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	210	215	220	672
25	gcg tgc tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc cgg cgc ttc gaa Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu	225	230	235	720
30	ttc cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	245	250	255	768
35	aat gta ctt ggg cgg ctc ggc gca gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser	260	265	270	816
40	gtc acc ata cgc gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp	275	280	285	864
45	atg ggc gag ata tcg gac acc ttc atg aca ctg gcg gcg att gcc cct Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	290	295	300	912
50	cta gcc gat gga ccc atc acg ata aca aac att ggc cat gca cgg ttg Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	305	310	315	960
55	aag gaa tcc gac cgc atc tcg gcg atg gaa agc aac ctt cga acg ctc Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu	325	330	335	1008
60	ggg gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg cga atc tac ccc tct Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	340	345	350	1056
65	acc ccg cac ggc ggc aga gtc aat tgc cac cgg gac cac agg atc gcc Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	355	360	365	1104
70	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg cga gtg gac ggg att acc ctc gac Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	370	375	380	1152
75	gac cct caa tgt gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu	385	390	395	1200
80	gga cgc ctt ttc ccg gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *	405	410		1242

ES 2 332 380 T3

<210> 19

<211> 413

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg51.4

10 <400> 19

```

Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1          5          10          15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
15          20          25          30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
          35          40          45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
20          50          55          60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65          70          75          80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
          85          90          95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
25          100          105          110
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
          115          120          125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
30          130          135          140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145          150          155          160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
          165          170          175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
35          180          185          190
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
          195          200          205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
40          210          215          220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225          230          235          240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
          245          250          255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
45          260          265          270
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
          275          280          285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
50          290          295          300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305          310          315          320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
          325          330          335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
55          340          345          350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala

355          360          365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
          370          375          380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
65          385          390          395          400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
          405          410

```

ES 2 332 380 T3

<210> 20
 <211> 1242
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> grg23 (ace3)
 <221> CDS
 10 <222> (1)...(1242)
 <400> 20

```

15      atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tgc aaa agc atc acc aac      48
      Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
        1              5              10              15

20      cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tgc gtc ctg gtg      96
      Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
              20              25              30

25      aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag      144
      Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
              35              40              45

30      gcc ctg ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa      192
      Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
              50              55              60

35      ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctg gac gcc gac atc tgg tgc gag gac      240
      Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
              65              70              75              80

40      gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctg cct cca ttc gta gcc gca ggt cag      288
      Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
              85              90              95

45      ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt      336
      Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
              100              105              110

50      cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc      384
      Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
              115              120              125

55      gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag      432
      Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
              130              135              140

60      tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc      480
      Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
      145              150              155              160
  
```

ES 2 332 380 T3

	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
5	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
	180 185 190	
10	ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca	624
	Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	
	195 200 205	
15	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act	672
	Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	
	210 215 220	
	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa	720
	Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu	
	225 230 235 240	
20	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc	768
	Phe Gln Gly Leu Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	
	245 250 255	
25	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg	816
	Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser	
	260 265 270	
30	gtc acc ata cgt gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat	864
	Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp	
	275 280 285	
	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct	912
	Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	
	290 295 300	
35	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg	960
	Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	
	305 310 315 320	
40	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc	1008
	Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu	
	325 330 335	
45	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct	1056
	Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	
	340 345 350	
	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct	1104
	Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	
	355 360 365	
50	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac	1152
	Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	
	370 375 380	
55	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt	1200
	Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu	
	385 390 395 400	
	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag	1242
60	Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly	
	405 410	

<210> 21

65 <211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 332 380 T3

<220>

<223> grg23 (ace3)

5 <400> 21

```

Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1          5          10          15
10 Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
    20          25          30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35          40          45
15 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
 50          55          60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65          70          75          80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
    85          90          95
20 Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
    100          105          110
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
    115          120          125
25 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130          135          140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145          150          155          160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
30          165          170          175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
    180          185          190
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
    195          200          205
35 Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
    210          215          220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225          230          235          240
40 Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
    245          250          255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
    260          265          270
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
45          275          280          285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290          295          300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305          310          315          320
50 Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
    325          330          335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
    340          345          350
55 Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
    355          360          365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp

          370          375          380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385          390          395          400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
          405          410

```

ES 2 332 380 T3

<210> 22

<211> 1242

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (L5P2.J2)

10 <221> CDS

<222> (1)...(1242)

<400> 22

15

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
```

20

```
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
```

25

```
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
```

30

```
acc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
```

35

```
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
```

```
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
```

40

```
ggg aag ttc acc ttc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
```

45

```
cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
```

50

```
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agt ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
```

55

```
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
```

60

```
atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
```

65

ES 2 332 380 T3

	165	170	175	
5	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	576		
	180	185	190	
10	ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	624		
	195	200	205	
15	ggg cgc tac aca tcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act Gly Arg Tyr Thr Ser Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	672		
	210	215	220	
20	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu	720		
	225	230	235	240
25	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	768		
	245	250	255	
30	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser	816		
	260	265	270	
35	gtc acc ata act gga ccg gaa agg ctg aac ggc aac att gaa gtg gat Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asn Ile Glu Val Asp	864		
	275	280	285	
40	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	912		
	290	295	300	
45	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	960		
	305	310	315	320
50	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu	1008		
	325	330	335	
55	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	1056		
	340	345	350	
60	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	1104		
	355	360	365	
65	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	1152		
	370	375	380	
70	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu	1200		
	385	390	395	400
75	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *	1242		
	405	410		

<210> 23

<211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 332 380 T3

 $\langle 220 \rangle$

<223> grg23 (L5P2.J2)

5 $\langle 400 \rangle$ 23

	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10					15	
10	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val
			20						25					30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35					40					45			
15	Thr	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu
		50					55					60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65					70					75					80
	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
				85						90					95	
20	Gly	Lys	Phe	Thr	Phe	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
				115				120					125			
25	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
		130					135					140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
	145					150					155					160
30	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
				165						170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180					185					190		
35	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ser	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
		210					215					220				
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu
	225					230					235					240
40	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
				245						250					255	
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser
				260					265					270		
45	Val	Thr	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asn	Ile	Glu	Val	Asp
		275						280					285			
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
		290					295					300				
50	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
	305					310					315					320
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser									

ES 2 332 380 T3

<210> 24
 <211> 1242
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> grg23 (ace4)
 10 <221> CDS
 <222> (1)...(1242)

 <400> 24

 15
 atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tgc aaa agc atc acc aac 48
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1 5 10 15
 20
 cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tgc gtc ctg gtg 96
 Arg Ala Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
 20 25 30
 25
 aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
 Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
 35 40 45
 30
 gcc ctg ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa 192
 Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
 50 55 60
 35
 ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctg gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
 Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 40
 gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctg cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
 Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
 85 90 95
 45
 ggg aag ttc acc ttc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
 Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Pro Leu
 100 105 110
 50
 cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
 Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
 115 120 125
 55
 gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
 Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
 130 135 140
 60
 tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
 Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
 145 150 155 160
 65
 atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
 Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
 165 170 175

ES 2 332 380 T3

	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
	180 185 190	
5	ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca	624
	Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	
	195 200 205	
10	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act	672
	Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	
	210 215 220	
15	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa	720
	Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu	
	225 230 235 240	
20	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc	768
	Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	
	245 250 255	
25	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg	816
	Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser	
	260 265 270	
30	gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat	864
	Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp	
	275 280 285	
35	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct	912
	Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	
	290 295 300	
40	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg	960
	Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	
	305 310 315 320	
45	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc	1008
	Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu	
	325 330 335	
50	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct	1056
	Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	
	340 345 350	
55	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct	1104
	Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	
	355 360 365	
60	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac	1152
	Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	
	370 375 380	
65	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt	1200
	Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu	
	385 390 395 400	
70	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag	1242
	Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *	
	405 410	
75	<210> 25	
	<211> 413	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
80	<220>	
	<223> grg23 (ace4)	

ES 2 332 380 T3

<400> 25

5	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10					15	
	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val
				20					25					30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35					40					45			
10	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asp	Trp	Val	Val	Glu
		50					55					60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65					70					75					80
	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
15					85					90					95	
	Gly	Lys	Phe	Thr	Phe	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
	Arg	Pro	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
20			115					120					125			
	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
		130					135					140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
	145					150					155					160
25	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
				165						170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180					185					190		
	Phe	Gly	Ile	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro
30			195					200					205			
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
		210					215					220				
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Arg	Phe	Glu
35		225				230					235					240
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
				245						250					255	
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Ser	Asn	Ser
			260						265					270		
40	Val	Thr	Ile	Arg	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp
		275						280					285			
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
		290					295					300				
	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
45		305				310					315					320
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Ser	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu
				325						330					335	
	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser
			340					345					350			
50	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala
			355					360					365			
	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp
		370					375					380				
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu
55		385				390					395					400
	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly			

405

410

60

<210> 26

<211> 1244

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 332 380 T3

<223> grg23 (L3P1.B20)

<221> CDS

<222> (1)...(1242)

5

<400> 26

10	atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac	48
	Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn	
	1 5 10 15	
15	cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg	96
	Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val	
	20 25 30	
20	aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag	144
	Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln	
	35 40 45	
25	gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa	192
	Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu	
	50 55 60	
30	ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac	240
	Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp	
	65 70 75 80	
35	gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag	288
	Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln	
	85 90 95	
40	ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ttg cgg cgg cgc ccg ctt	336
	Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu	
	100 105 110	
45	cgg ccc ctg gtt gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc	384
	Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser	
	115 120 125	
50	gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag	432
	Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu	
	130 135 140	
55	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc	480
	Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
	145 150 155 160	
60	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
65	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	

ES 2 332 380 T3

	180	185	190	
5	ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc atc cct cca Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Ile Pro Pro	624		
	195	200	205	
10	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr	672		
	210	215	220	
15	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu	720		
	225	230	235	240
20	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe	768		
	245	250	255	
25	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser	816		
	260	265	270	
30	gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp	864		
	275	280	285	
35	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro	912		
	290	295	300	
40	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu	960		
	305	310	315	320
45	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu	1008		
	325	330	335	
50	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser	1056		
	340	345	350	
55	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala	1104		
	355	360	365	
60	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp	1152		
	370	375	380	
65	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu	1200		
	385	390	395	400
70	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *	1242		
	405	410		
75	gg			1244

<210> 27

<211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (L3P1.B20)

ES 2 332 380 T3

<400> 27

5	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10					15	
	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val
			20						25					30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35					40					45			
10	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu
		50					55					60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65				70						75					80
15	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
					85					90					95	
	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
20	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
			115					120					125			
	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
		130					135					140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
25		145				150					155					160
	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
					165					170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180					185					190		
30	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Ile	Pro	Pro
			195					200					205			
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
		210					215					220				
35	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu
					230						235					240
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
					245					250					255	
40	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser
			260						265					270		
	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp
			275					280					285			
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
		290					295					300				
45	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
					310						315					320
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu
					325					330					335	
50	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser
				340					345					350		
	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala
			355					360					365			
55	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp
		370					375					380				
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu
					390						395					400
60	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly			
					405					410						

<210> 28

<211> 1244

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 332 380 T3

<220>

<223> grg23 (L3P1.B3)

<221> CDS

5 <222> (1)...(1242)

<400> 28

10	atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac	48
	Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn	
	1 5 10 15	
15	cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg	96
	Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val	
	20 25 30	
20	aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag	144
	Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln	
	35 40 45	
25	gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa	192
	Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu	
	50 55 60	
30	ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc cac atc tgg tgc gag gac	240
	Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala His Ile Trp Cys Glu Asp	
	65 70 75 80	
35	gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag	288
	Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln	
	85 90 95	
40	ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt	336
	Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu	
	100 105 110	
45	cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc	384
	Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser	
	115 120 125	
50	gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag	432
	Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu	
	130 135 140	
55	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc	480
	Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
	145 150 155 160	
60	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
65	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
	180 185 190	

ES 2 332 380 T3

5	ttc ggc ctc gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624 Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro 195 200 205
10	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat aaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672 Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Lys Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr 210 215 220
15	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720 Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu 225 230 235 240
20	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768 Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe 245 250 255
25	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816 Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser 260 265 270
30	gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864 Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp 275 280 285
35	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912 Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro 290 295 300
40	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960 Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu 305 310 315 320
45	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008 Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu 325 330 335
50	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056 Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser 340 345 350
55	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cga gac cac agg atc gct 1104 Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala 355 360 365
60	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152 Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp 370 375 380
65	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu 385 390 395 400
	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242 Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly * 405 410
	gg 1244

<210> 29

<211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (L3P1.B3)

ES 2 332 380 T3

<400> 29

5	Met	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10				15		
	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val
				20					25					30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35					40					45			
10	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu
		50					55					60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His	Leu	Asp	Ala	His	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65					70					75					80
15	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
					85					90					95	
	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
20	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
			115					120					125			
	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
			130				135					140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
25	145					150					155					160
	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
					165					170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180					185					190		
30	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Lys	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
			210				215					220				
35	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu
	225					230					235					240
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
					245					250					255	
40	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser
				260					265					270		
	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp
			275					280					285			
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
45			290				295					300				
	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
	305					310					315					320
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu
					325					330					335	
50	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser
				340					345					350		
	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala
				355				360					365			
55	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp
							375					380				
	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu
	385					390					395					400
60	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly			
					405					410						

ES 2 332 380 T3

<210> 30

<211> 1244

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (L3P1.F18)

<221> CDS

10 <222> (1)...(1242)

<400> 30

15

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
```

20

```
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
```

25

```
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
```

30

```
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
```

35

```
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
```

40

```
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
```

45

```
ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
```

50

```
cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
```

55

```
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
```

60

```
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
```

65

```
atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
```

```
ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
```

```
ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
```

ES 2 332 380 T3

	195	200	205	
5	ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr 210 215 220	672		
10	gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu 225 230 235 240	720		
15	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe 245 250 255	768		
20	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser 260 265 270	816		
25	gtc atc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat Val Ile Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp 275 280 285	864		
30	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro 290 295 300	912		
35	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu 305 310 315 320	960		
40	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu 325 330 335	1008		
45	ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser 340 345 350	1056		
50	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala 355 360 365	1104		
55	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp 370 375 380	1152		
60	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu 385 390 395 400	1200		
65	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly * 405 410	1242		
	gg	1244		
55	<210> 31			
	<211> 413			
	<212> PRT			
60	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
	<223> grg23 (L3P1.F18)			

ES 2 332 380 T3

<400> 31

```

5      Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
      1          5          10          15
      Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
      20          25          30
      Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
      35          40          45
10     Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
      50          55          60
      Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
      65          70          75          80
      Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
      85          90          95
15     Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
      100          105          110
      Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
      115          120          125
20     Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
      130          135          140
      Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
      145          150          155          160
25     Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
      165          170          175
      Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
      180          185          190
      Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
      195          200          205
30     Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
      210          215          220
      Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
      225          230          235          240
35     Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
      245          250          255
      Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
      260          265          270
      Val Ile Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
      275          280          285
40     Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
      290          295          300
      Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
      305          310          315          320
45     Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
      325          330          335
      Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
      340          345          350
      Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
      355          360          365
50     Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
      370          375          380
      Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
      385          390          395          400
55     Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
      405          410

```

<210> 32

<211> 1244

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> grg23 (L3P1.023)

<221> CDS

<222> (1)...(1242)

ES 2 332 380 T3

<400> 32

5	atg gaa act gat cac ctt gtg atc cca gga tgc aaa agc atc acc aac	48
	Met Glu Thr Asp His Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn	
	1 5 10 15	
10	cgg gcg ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tgc gtc ctg gtg	96
	Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val	
	20 25 30	
15	aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag	144
	Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln	
	35 40 45	
20	gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa	192
	Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu	
	50 55 60	
25	ggc ttg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac	240
	Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp	
	65 70 75 80	
30	gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag	288
	Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln	
	85 90 95	
35	ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt	336
	Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu	
	100 105 110	
40	cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc	384
	Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser	
	115 120 125	
45	gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca gcc ggg gag	432
	Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu	
	130 135 140	
50	tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc	480
	Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile	
	145 150 155 160	
55	atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat	528
	Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn	
	165 170 175	
60	ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac	576
	Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp	
	180 185 190	
65	ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca	624
	Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro	
	195 200 205	

ES 2 332 380 T3

	ggg cgc tac acà gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672 Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr 210 215 220
5	gcg tgc tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720 Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu 225 230 235 240
10	ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttt ttc 768 Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe 245 250 255
15	aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816 Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser 260 265 270
	gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864 Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp 275 280 285
20	atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912 Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro 290 295 300
25	ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960 Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu 305 310 315 320
30	aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008 Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu 325 330 335
35	ggg gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056 Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser 340 345 350
40	acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104 Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala 355 360 365
45	atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152 Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp 370 375 380
50	gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200 Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu 385 390 395 400
55	gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctt ccc ggc tag 1242 Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly * 405 410
60	gg 1244
65	<210> 33 <211> 413 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> grg23 (L3P1.023)

ES 2 332 380 T3

<400> 33

5	Met	Glu	Thr	Asp	His	Leu	Val	Ile	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asn
	1				5					10				15		
	Arg	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Val
			20					25						30		
	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Ile	Gln
			35					40					45			
10	Ala	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Asn	Trp	Val	Val	Glu
		50					55					60				
	Gly	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Asp	Ile	Trp	Cys	Glu	Asp
	65					70					75					80
15	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Pro	Pro	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln
					85					90					95	
	Gly	Lys	Phe	Thr	Val	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Leu
				100					105					110		
	Arg	Pro	Leu	Val	Asp	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Arg	Val	Ser	Ser
20			115					120					125			
	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Glu
		130					135					140				
	Tyr	Glu	Ile	Glu	Ala	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile
25		145				150					155					160
	Met	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Asn
					165					170					175	
	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Tyr	Leu	Thr	Met	Thr	Leu	Arg	Met	Met	Arg	Asp
				180					185					190		
30	Phe	Gly	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ala	Arg	Arg	Tyr	Glu	Ile	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Thr
		210					215					220				
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Glu
35		225				230					235					240
	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Ser	Ile	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe
				245						250					255	
	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	His	Trp	Ala	Pro	Asn	Ser
40			260						265					270		
	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Glu	Arg	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Glu	Val	Asp
			275					280					285			
	Met	Gly	Glu	Ile	Ser	Asp	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Ile	Ala	Pro
		290					295					300				
45	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Arg	Leu
		305				310					315					320
	Lys	Glu	Ser	Asp	Arg	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Arg	Thr	Leu
					325					330					335	
	Gly	Val	Gln	Thr	Asp	Val	Gly	His	Asp	Trp	Met	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser
50			340						345					350		
	Thr	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Cys	His	Arg	Asp	His	Arg	Ile	Ala
			355					360					365			
	Met	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Ile	Thr	Leu	Asp
		370					375					380				
55	Asp	Pro	Gln	Cys	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Pro	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Leu
		385				390					395					400
	Gly	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Gly			
					405					410						