



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 207**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A01H 5/00** (2006.01)

**A01H 5/10** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00980762 .9**

86 Fecha de presentación : **22.11.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1242595**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54

Título: **Promotor e intrón del factor despolimerizador de la actina del maíz.**

30

Prioridad: **23.11.1999 US 167111 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2007**

73

Titular/es: **Dow AgroSciences L.L.C.**  
**9330 Zionsville Road**  
**Indianapolis, Indiana 46268, US**

72

Inventor/es: **Rubin-Wilson, Beth y**  
**Smith, Kelley, A.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 269 207 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**

Promotor e intrón del factor despolimerizador de la actina del maíz.

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a ingeniería genética de plantas. La invención proporciona secuencias y construcciones de ADN que son útiles para controlar la expresión de genes recombinantes en plantas. Más particularmente, la invención proporciona secuencias regulatorias novedosas derivadas del factor despolimerizador de la actina (ADF) del maíz.

**10 Antecedentes de la invención**

Los proyectos de ingeniería genética en las plantas requieren el acceso a diversos elementos genéticos que se usan para regular la expresión transgénica. Dos ejemplos de tales elementos genéticos son los promotores y los intrones.

15 La iniciación de la transcripción es regulada por un promotor. Un proyecto dado requiere típicamente el uso de varios promotores diferentes. Se usará un promotor para manejar el gen de interés, y se usará uno diferente, por ejemplo, para manejar el marcador seleccionable.

20 Un gen eucariótico está interrumpido usualmente por secuencias no codificantes llamadas intrones. El producto inicial de transcripción de un gen eucariótico es el pre-ARNm, que incluye secuencias correspondientes a los intrones. Los intrones son retirados durante el proceso de post-transcripción para proporcionar el ARNm que es traducido para producir una proteína. Los estudios que caracterizan el papel de los intrones en la regulación de la expresión de genes han mostrado que el primer intrón del gen de la alcohol deshidrogenasa (*Adh-1*) del maíz tiene la capacidad de incrementar la expresión bajo anaerobiosis. Callis J., M. Fromm, y V. Walbot. (1987), *Gene Dev.* 1:1183-1200. El intrón también estimula la expresión (en menor grado) en ausencia de anaerobiosis. Se piensa que este aumento es un resultado de una estabilización del pre-ARNm en el núcleo. Mascarenhas *et al.* reportaron un aumento de 12 veces y 20 veces de la expresión de CAT por el uso del intrón del *Adh-1*. Mascarenhas *et al.*, "Intron-Mediated Enhancement of Heterologous Gene Expression in Maize," *Plant Molecular Biology*, 15:913-920, 1990. Se han identificado varios otros intrones en el maíz y otras plantas monocotiledóneas que incrementan la expresión de genes. Vain, P. *et al.* (1996), *Plant Cell Reports* 15:489-494. Véase también la solicitud de patente internacional WO98/5921.

35 La secuencia de ADNc para el ADF del maíz es conocida (nº de acceso en GenBank X97726), pero la secuencia genómica del ADF no ha sido publicada. En particular, la secuencia para el promotor del ADF no ha sido publicada hasta ahora, ni ha sido identificado ningún intrón del ADF.

**Breve descripción de las secuencias**

40 La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN para el producto de PCR AP2/BC294, que incluye la secuencia para el promotor del ADF y el intrón 1 del ADF.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ADN para el pDAB305.

**Sumario de la invención**

45 La invención proporciona una construcción de ácido nucleico o una molécula aislada de ácido nucleico que comprende las bases 1 a 734 de la SEQ. ID No: 1 y un intrón adecuado para potenciar la expresión, o que comprende un promotor adecuado para el uso en plantas, y las bases 882 a 2161 de la SEQ. ID No: 1.

50 En otro de sus aspectos, la invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende, enlazado operativamente en la dirección 5' a 3',

- a) un promotor del ADF del maíz que comprende las bases 1 a 734 de la SEQ ID No: 1;
- b) una secuencia líder no traducida;
- 55 c) un intrón adecuado para potenciar la expresión;
- d) un gen de interés; y
- e) una UTR 3'.

60 En una realización preferida, el intrón se selecciona del grupo que consiste en intrón 1 del *Adh1* e intrón 1 del ADF (pb 882-2161 de la SEQ ID NO 1).

En otro de sus aspectos, la invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende, en la dirección 5' a 3',

- 65 a) un promotor funcional en plantas;
- b) una secuencia líder no traducida;
- c) el intrón 1 del ADF que comprende las bases 882-2161 de la SEQ ID No: 1;

## ES 2 269 207 T3

- d) un sitio de clonación;
- e) una UTR 3'.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona un plásmido que comprende un promotor del ADF del maíz que comprende los pb 1-678 de la SEQ ID NO 1 y un intrón adecuado para potenciar la expresión, o los pb 882-2161 de la secuencia del intrón 1 del ADF del maíz de la SEQ ID NO: 1 y un promotor adecuado para el uso en plantas.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona una planta transformada que comprende al menos una célula vegetal que contiene una construcción de ácido nucleico de la invención. La planta puede ser monocotiledónea o dicotiledónea. Las plantas preferidas son el maíz, arroz, algodón y tabaco.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona una semilla o grano que contiene una construcción de ácido nucleico de la invención.

### 15 Descripción detallada de la invención

El promotor del ADF se usa en construcciones que tienen un intrón adecuado para potenciar la expresión y que está incorporado preferiblemente en el líder no traducido 5' del gen de interés y 3' del promotor. Los intrones adecuados incluyen el intrón 1 del ADF, el intrón 1 del Adh1, el intrón 1 de la Ubiquitina, y el intrón 1 del Bronce 2.

La secuencia líder no traducida usada en las construcciones de la invención puede derivar de cualquier fuente adecuada, y puede ser modificada específicamente para incrementar la traducción del ARNm. La región no traducida 5' se puede obtener a partir de la secuencia líder nativa del promotor, la secuencia líder nativa del gen o región codificante a ser expresada, ARNs virales, genes eucarióticos adecuados, o puede ser una secuencia sintética.

El gen de interés usado en las construcciones de la invención puede ser cualquier gen que se desee expresar en plantas. Son genes particularmente útiles los que confieren tolerancia a herbicidas, insectos o virus, y genes que proporcionan un valor nutricional mejorado o características de procesamiento de la planta mejoradas. Los ejemplos de genes agrónomicamente útiles y adecuados incluyen el gen insecticida del *Bacillus thuringiensis* para conferir resistencia a los insectos, y el gen de la 5'-enolpiruvil-3'-fosfoshikimato sintasa (EPSPS) y cualquier variante suya para conferir tolerancia a los herbicidas de glifosato. Como entienden fácilmente los expertos en la técnica, se puede usar cualquier gen agrónomicamente importante que confiera un rasgo deseado.

La UTR 3', o región no traducida 3', que se emplea en las construcciones de la invención es una que confiere un procesamiento eficaz del ARNm, que mantiene la estabilidad del mensaje y que dirige la adición de ribonucleótidos de adenosina al extremo 3' de la secuencia de ARNm transcrita. La UTR 3' puede ser nativa con la región promotora, nativa con el gen estructural, o puede derivar de otra fuente. Está disponible una amplia variedad de regiones de terminación que se pueden obtener a partir de genes con capacidad de expresión en huéspedes vegetales, p.ej., genes bacterianos, de opinas, virales y vegetales. Las UTRs 3' adecuadas incluyen, pero no están limitadas a: la UTR 3' de *per5* (solicitud de patente internacional WO98/56921), la UTR 3' del gen de la nopalina sintasa (*nos*), *tmL 3'*, o *acp 3'*, por ejemplo.

La presente invención es aplicable, de manera general, a la expresión de genes estructurales tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Esta invención es particularmente adecuada para cualquier miembro de la familia vegetal de las monocotiledóneas (monocot) que incluyen, pero no están limitados a, maíz, arroz, cebada, avena, trigo, sorgo, centeno, caña de azúcar, piña, batatas, cebolla, plátano, coco y dátiles. Una aplicación preferida de la invención es en la producción de plantas de maíz transgénicas. La invención es particularmente aplicable a la familia *Graminaceae*, en particular al maíz, trigo, arroz, avena, cebada y sorgo. Las especies dicotiledóneas incluyen tabaco, tomate, girasol, algodón, remolacha azucarera, patata, lechuga, melón, soja y canola (semilla de colza).

El intrón 1 del ADF se puede usar con promotores distintos al promotor del ADF para potenciar la expresión. El promotor usado con el intrón 1 del ADF puede ser cualquier promotor adecuado para el uso en plantas. El promotor seleccionado debe ser capaz de causar suficiente expresión de la proteína deseada por sí solo, pero especialmente cuando se usa con el intrón 1 del ADF, para dar como resultado la producción de una cantidad eficaz de la proteína deseada para provocar que las células vegetales y las plantas regeneradas a partir de ella exhiban las propiedades que estén causadas fenotípicamente por la proteína expresada. Los promotores adecuados se pueden obtener de diversas fuentes, tales como plantas o virus de ADN de plantas. Los promotores preferidos son el promotor del ADF, el promotor del *per5*, el promotor del 35T (descrito en adelante en los Ejemplos 20 y 23), y el promotor de la ubiquitina. Los promotores útiles incluyen los aislados del grupo caulimovirus, tales como los promotores de transcripción del virus del mosaico de la coliflor 19S y 35S (CaMV19S y CaMV35S). Otros promotores útiles incluyen el promotor del CaMV35S potenciado (eCaMV35S) descrito por Kat *et al.* (1987) Science 236:1299-1302 y la pequeña subunidad promotora de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO). Los ejemplos de otros promotores adecuados son el promotor de la actina del arroz; promotor de la ciclofilina; promotor de la ubiquitina; promotor del ADH1, Callis *et al.*, arriba.; promotor de la patatina de Clase I, Bevan *et al.* (1986) Nucleic Acids Res. 14 (11), 4675-4638; promotor de la ADP glucosa pirofosforilasa; promotor de la .beta.-conglucina, Tiemey *et al.* (1987) Planta 172: 356-363; promotor de E8, Deikman *et al.* (1988) Embo J. 7 (11) 3315-3320; promotor del 2AII, Pear *et al.* (1989) Plant Mol. Biol. 13: 639-651; promotor de la chitinasa ácida, Samac *et al.* (1990) Plant Physiol. 93:907-914;

## ES 2 269 207 T3

La construcción de un casete génico utilizando el promotor del ADF o el intrón 1 del ADF se consigue fácilmente utilizando métodos bien conocidos, tales como los descritos en Sambrook *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring; y Ausubel *et al.* (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, NY. El ADN que codifica el promotor del ADF se puede preparar a partir de ADN cromosómico o ADN de origen sintético usando técnicas bien conocidas. El ADN genómico se puede aislar por técnicas estándar. Sambrook *et al.* (1989); Mullis *et al.* (1987), *Meth. Enz.*, 155:335. Horton *et al.* (1989), *Gene*, 77:61.; Erlich (ed.) (1989)). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. También es posible preparar secuencias sintéticas por síntesis de oligonucleótidos. Véase Caruthers (1983) en: *Methodology of DNA and RNA*, (ed.) Weissman, y Beaucage *et al.* (1981), *Tetrahedron Letters*, 22: 1859-1962).

Las tecnologías convencionales para introducir material biológico en células huésped incluyen electroporación (véase Shigekawa y Dower (1988), *Biotechniques*, 6:742; Miller, *et al.* (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:856-860; y Powell, *et al.* (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:655-660); mecanismos de absorción directa de ADN (véase Mandel e Higa (1972), *J. Mol. Biol.*, 53:159-162; Dityatkin, *et al.* (1972), *Biochimica et Biophysica Acta*, 281:319-323; Wigler, *et al.* (1979), *Cell*, 16:77; y Uchimiya, *et al.* (1982), en: *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, A. Fujiwara (ed.), Jap. Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo, págs. 507-508); mecanismos de fusión (véase Uchidaz, *et al.* (1980), en: *Introduction of Macromolecules Into Viable Mammalian Cells*, Baserga *et al.* (eds.) *Wistar Symposium Series*, 1:169-185); agentes infecciosos (véase Fraley, *et al.* (1986), *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 4:1-46); y Anderson (1984), *Science*, 226:401-409); mecanismos de microinyección (véase Crossway, *et al.* (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202:179-185); y mecanismos de proyectiles de alta velocidad (véase la solicitud de patente europea EPO 0 405 696, de Miller, Schuchardt, Skokut y Gould, (The Dow Chemical Company)).

El procedimiento apropiado para transformar una célula huésped seleccionada se puede elegir de acuerdo con la célula huésped usada. Basándose en la experiencia hasta la fecha, parece haber poca diferencia en la expresión de genes, una vez insertados en las células, atribuible al propio método de transformación. Una vez introducido en el tejido vegetal, la expresión del gen estructural puede ser ensayada en un sistema de expresión transiente, o puede ser determinada después de la selección por la integración estable dentro del genoma de la planta.

Se conocen técnicas para el cultivo *in vitro* de tejido vegetal, y en varios casos, para la regeneración a plantas enteras. El procedimiento apropiado para producir plantas transgénicas maduras se puede elegir de acuerdo con la especie de planta usada. La regeneración varía de especie a especie de plantas. Una regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo y de la historia del cultivo. Una vez que se han obtenido plantas enteras, pueden ser reproducidas sexualmente o clónicamente de una manera tal que al menos una copia de la secuencia esté presente en las células de la progenie de la reproducción. Se puede recoger una semilla de las plantas regeneradas para un uso futuro, y las plantas crecidas de esta semilla. Los procedimientos para transferir el gen introducido de la planta transformada originalmente a cultivos comercialmente útiles son conocidos por los expertos en la técnica.

En los siguientes ejemplos todas las manipulaciones de biología molecular se hicieron según los procedimientos descritos en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Cold Spring Harbor Laboratory).

### Ejemplo 1

#### Secuencia flanqueante en 5' del ADF

Se aislaron secuencias flanqueantes en 5' del gen del factor de despolimerización de la actina (Zmbap3) a partir de ADN genómico de maíz, var. OQ414 (línea registrada de Dow AgroSciences). La secuenciación del ADN se llevó a cabo usando el kit de secuenciación de ADN ABI Prism con polimerasa AmpliTaq® Polymerase FS como describe el fabricante (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Las reacciones de secuenciación se ejecutaron en un secuenciador de ADN Applied Biosystem 373A (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division).

La secuencia flanqueante en 5' del ADF se comparó con la secuencia de ADNc publicada y se encontró que divergía debido a la presencia de un intrón inmediatamente 3' respecto al codón de inicio ATG.

La siguiente tabla enumera las características del producto de PCR AP2/BC294 (SEQ ID NO: 1):

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO DE PCR AP2/BC294	
pb de la SEQ ID NO:1	Característica
1-734	promotor del ADF.
735-878	líder no traducido 5' (concuerta con la secuencia de ADNc publicada)
879-881	sitio de inicio ATG
882-2161	intrón del ADF
2162-2273	comienzo de la secuencia codificante del ADF, (concuerta con la secuencia de ADNc publicada))

## ES 2 269 207 T3

Las dos primeras y las dos últimas bases del intrón son secuencias consenso de sitios de empalme, internas al intrón. Las secuencias justo fuera del intrón son también casi consenso.

En los siguientes ejemplos, el promotor del ADF y el intrón del ADF fueron evaluados usando vectores de expresión basados en el plásmido pDAB305. El pDAB305 es un plásmido de 5796 pb que alberga un promotor que contiene una copia tándem del potenciador 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S), una versión deletada del intrón 1 del *Adh1*, y el líder no traducido de la proteína de la envoltura del virus del mosaico del rayado del maíz fusionado con el gen *uidA*, que es seguido después por la UTR 3' del *nos*. La secuencia para el pDAB305 se da en la SEQ ID NO: 2. Las características de la secuencia se describen en la siguiente tabla:

Características del pDAB 305	
pb de la SEQ ID NO:2	Descripción de la característica
1-401	corresponde a los pb 1-401 del pUC19
404-656	complemento inverso del UTR 3' del nos
657-675	conector que incluye sitio de restricción Scal
676-2536	complemento inverso de los pb 26-1889 de número de acceso en Genbank U02456, incluyendo el complemento inverso (pb 728-2536) del gen <i>uidA</i> codificante GUS
2534-2573	complemento inverso de las bases 278-317 del genoma del virus del rayado del maíz. (MSV, número de acceso en Genbank X01633 K02026) dado en Mullineaux, P. M., J. Donson, S. A. M. Morris-Krsinich, M. I. Boulton, y J. W. Davies (1984) <i>The nucleotide sequence of Maize Streak Virus DNA</i> . EMBO J. 3:3063-3068.
2584-2701	complemento inverso de las bases 1657-1774 del intrón 1 del <i>Adh1S</i> del maíz, depositado como GenBank MZEADH1.S, número de acceso X00581, [Dennis, E. S., W. L. Gerlach, A. J. Pryor, J. L. Bennetzen, A. Inglis, D. Llewellyn, M. M. Sachs, R. J. Ferl, y W. J. Peacock (1984) <i>Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (Adh1) gene of maize</i> . Nucl. Acids Res. 12:3983-4000].
2702-2793	complemento inverso de los nucleótidos 1222-1312 del intrón 1 del <i>Adh1S</i> de número de acceso en GenBank X00581, [bases 119 a 209 de Dennis <i>et al.</i> , (ibid.)].
2795-2904	complemento inverso de los nucleótidos 167 a 277 del genoma del virus del rayado del maíz [número de acceso en Genbank X01633 K02026, y Mullineaux <i>et al.</i> (ibid.)], excepto que la secuencia de tipo silvestre tiene una T adicional insertada entre las bases 2884 y 2885 del pDAB305.
2905-2924	conector que incluye sitios de restricción BamHI y XbaI
2925-3271	complemento inverso de los nucleótidos 7093 a 7439 del promotor 35S del genoma del virus del mosaico de la coliflor (cepa CabbBS, número de acceso en GenBank V00141 J02048).
3272-3279	conector que incluye el sitio ClaI
3280-3531	complemento inverso de los nucleótidos 7093 a 7344 de número de acceso en GenBank V00141 J02048
3532-3544	conector
3545-5796	corresponde a las bases 435-2686 del pUC19

## Ejemplo 2

*Construcción del pDAB620*

5 El plásmido pDAB620 es esencialmente el pDAB305, pero con el promotor del ADF reemplazando al promotor doblemente potenciado del CaMV 35S y el intrón del ADH/líder del intrón del MSV. Para clonar el promotor del ADF sin un intrón detrás de la región codificante GUS, el promotor del ADF fue amplificado con cebadores diseñados para añadir un sitio 5' Hind III y un sitio 3' Nco I. Las amplificaciones por PCR se realizaron usando 70 ng de ADN plantilla (SEQ ID NO: 1 clonada en el vector PCR<sup>®</sup>2.1-Topo), tampón de PCR GeneAmp<sup>®</sup> 10 x (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division), 50 picomoles de cada cebador, y 5 unidades de polimerasa AmpliTaq Gold<sup>™</sup> (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division) en un volumen total de 100 ul. Las amplificaciones se realizaron usando el GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9600 (PE/ABI), usando las siguientes condiciones de ciclo: 96°C 10 minutos, 94°C, 1 minuto, 55°C 2 minutos, 72°C 3 minutos, 20 ciclos, seguido de una extensión a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR resultante de 906 pb fue clonado en el PCR<sup>®</sup>2.1-Topo (Invitrogen). Se seleccionaron colonias individuales para la extracción y secuenciación de ADN como se describe anteriormente. Para clonar el promotor del ADF en pDAB305, el fragmento del promotor del ADF fue aislado de los clones recombinantes PCR<sup>®</sup>2.1-Topo (Invitrogen) como fragmento Hind III y Nco I por digestión con enzimas de restricción Nco I y Hind III (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). El fragmento ADF fue purificado en un gel preparativo de agarosa y el ADN se extrajo usando columnas rotatorias de agarosa GenElute (Supelco, Inc., Bellefonte, PA). El plásmido pDAB305 fue preparado por digestión con Hind III y Nco I (New England Biolabs) para excluir el promotor e intrón existentes. El plásmido digerido se hizo correr en un gel preparativo de agarosa (FMC), se cortó el fragmento del gel, y se extrajo el ADN de la agarosa usando columnas rotatorias de agarosa GenElute (Supelco, Inc.). El fragmento promotor ADF Hind III/Nco I fue combinado con el vector deleciónado pDAB305, y fue ligado usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics, antiguamente Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) según las instrucciones del fabricante. Células competentes para subclonación Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) fueron transformadas con la mezcla de ligación según el protocolo incluido con las células, y cultivadas en placas en medio LB que contenía 75 ug/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C. Se seleccionaron colonias individuales para la extracción del ADN y la secuenciación del ADN descritas. Aquellos plásmidos que contenían el fragmento promotor del ADF que reemplazaba al fragmento promotor del CaMV/intrón I del ADH/líder del MSV fueron llamados pDAB620.

30

Características del pDAB 620	
pb del pDAB 620	Descripción de la característica
1-2538	corresponden a los pb 1-2538 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)
2539-2682	complemento inverso de la secuencia del líder no traducido (pb 735-878 de la SEQ ID NO:1)
2683-3416	complemento inverso del promotor del ADF (pb 1-734 de la SEQ ID NO:1)
3417-5656	corresponden a 3557-5796 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)

35

40

## Ejemplo 3

*Construcción del pDAB621*

50 El plásmido pDAB621 difiere del pDAB620 del Ejemplo 2 en que contiene el intrón/líder ADH/MSV inmediatamente 3' respecto al promotor del ADF. Para clonar el promotor del ADF delante del intrón 1 del ADH/líder del MSV modificado, se diseñaron cebadores para incorporar un sitio Hind III y un sitio BamH I sobre el extremo 5' y 3' del promotor del ADF, respectivamente, usando amplificación por PCR. La amplificación por PCR del promotor del ADF se realizó usando un ciclador Robocycler<sup>®</sup> Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene) usando las condiciones siguientes: 70 ng de ADN (SEQ ID NO: 1) clonado en PCR<sup>®</sup>2.1-Topo vector), 15 ul de tampón 3,3x XL Buffer II del kit de PCR GeneAmp<sup>®</sup> XL (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division), 50 picomoles de cada cebador, acetato de magnesio 1 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 ul de ADN polimerasa rTth (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division). El producto fue clonado en el PCR<sup>®</sup> 2.1 Topo (Invitrogen). Se seleccionaron colonias individuales y se extrajo el ADN usando un método de lisis alcalina. El fragmento ADF fue purificado en un gel preparativo de agarosa y el ADN se extrajo usando columnas giratorias de agarosa GenElute (Supelco, Inc.). Para clonar el promotor del ADF en pDAB305, el promotor del ADF se aisló de los clones PCR<sup>®</sup> 2.1-Topo (Invitrogen) recombinantes como fragmento Hind III y BamHI. El plásmido pDAB305 se preparó por digestión con Hind III y BamHI (NEB) para excluir el promotor existente. El fragmento promotor de ADF Hind III/Nco I fue combinado con el vector deleciónado pDAB305 y fue ligado usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics, antiguamente Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Se transformaron células competentes para subclonación Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> (Gibco/BRL) con la mezcla de ligación y las células se cultivaron en placas en medio LB que contenían 75 ug/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C. Se seleccionaron colonias individuales para la extracción del ADN y la secuenciación del ADN descritas. Aquellos plásmidos que contenían el fragmento del promotor del ADF que reemplazaba al promotor CaMV fueron llamados pDAB621.

65

## ES 2 269 207 T3

Características del pDAB 621	
pb del pDAB 621	Descripción de la característica
1-2912	corresponden a los pb 1-2912 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)
2913-3056	complemento inverso de la secuencia del líder no traducido (pb 735-878 de la SEQ ID NO:1)
3057-3790	complemento inverso del promotor del ADF (pb 1-734 de la SEQ ID NO:1)
3791-6030	corresponden a 3557-5796 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)

### 15 Ejemplo 4

#### *Construcción del pDAB625*

20 El plásmido pDAB625 difiere del plásmido pDAB620 esencialmente en que el intrón 1 del ADF está clonado inmediatamente en 3' respecto al promotor de ADF. Para crear el vector promotor del ADF/intrón del ADF, se fusionaron las secuencias del promotor e intrón usando una estrategia de extensión de solapamiento por empalme con PCR (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis, M.; Gelfand, D.; Sninsky, J.; White, T., 1990, Academic Press). El promotor del ADF y el intrón del ADF fueron amplificados en reacciones separadas usando cebadores adecuados. Las condiciones de reacción fueron como sigue: 10 ng de ADN plantilla (SEQ ID NO: 1 clonada en el vector PCR<sup>®</sup> 2.1-Topo vector), 10 ul de tampón de PCR GeneAmp<sup>®</sup> 10x (PE/ABI), 100 pmoles de cada cebador, 5 unidades de polimerasa AmpliTaq Gold<sup>™</sup> (PE/ABI) en un volumen de 100 ul. La ciclación se hizo en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9600 programado con el siguiente perfil: 95°C 10 minutos, (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min) durante 15 ciclos, 72°C durante 5 minutos. El fragmento del promotor y el producto del intrón fueron fusionados en una reacción PCR que contenía los siguientes componentes: 50 ng de cada producto de PCR, 30 ul de tampón 3.3x XL (PE/ABI), 4 ul de acetato de magnesio 25 mM, 10 ul de dNTPs 2 mM, 100 pmoles de cada cebador, 6 unidades de ADN polimerasa rTth (PE/ABI) en un volumen final de 50 ul. Las reacciones se realizaron en un ciclador RoboCycler<sup>®</sup> Gradient 96 Temperature Cycler (Stratagene) usando el siguiente perfil de ciclación: 94°C 1 minuto, [94°C 30 s, 70°C 4 minutos]x 20 ciclos, 72°C 10 minutos. El producto de PCR resultante, de 2184 pb, se hizo correr en un gel preparativo de agarosa (FMC). Se cortó el fragmento y se extrajo el ADN usando columnas rotatorias de agarosa GenElute (Supelco, Inc.). El fragmento de 2184 pb fue aumentado en otra reacción PCR, y el producto de esta reacción fue clonado en PCR<sup>®</sup> 2.1-Topo (Invitrogen). Se seleccionaron colonias individuales para la extracción y secuenciación del ADN como se describe anteriormente. Para clonar la fusión del promotor del ADF/intrón del ADF en el pDAB305, el producto de fusión fue aislado de los clones recombinantes PCR<sup>®</sup>2.1-Topo (Invitrogen) como fragmento Hind III y Nco I por digestión con enzimas de restricción Hind III y Nco I (New England Biolabs, Inc.). El plásmido pDAB305 se preparó por digestión con Hind III y NcoI (NEB) para excluir el promotor e intrón/líder existentes. El fragmento promotor de ADF/intrón de ADF Hind III/Nco I fue combinado con el pDAB305 delecionado de Hind III/NCo I y fue ligado usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics, antiguamente Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Se transformaron células competentes para subclonación Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>™</sup> (Gibco/BRL) con la mezcla de ligación, y las células se cultivaron en placas en medio LB que contenían 75 ug/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C. Se seleccionaron colonias individuales para la extracción del ADN y la secuenciación del ADN descritas. Aquellos plásmidos que contenían el fragmento promotor del AD/intrón del ADF que reemplazaba al promotor del CaMV/intrón del ADH fueron llamados pDAB625.

Características del pDAB 625	
pb del pDAB 625	Descripción de la característica
1-2538	corresponden a los pb 1-2538 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)
2539-3818	complemento inverso del intrón del ADF (pb 882-2161 de la SEQ ID NO:1)
3819-3962	complemento inverso de la secuencia del líder de ADF (pb 735-878 de la SEQ ID NO:1)
3963-4694	complemento inverso del promotor del ADF (pb 1-734 de la SEQ ID NO:1) excepto para las siguientes modificaciones que resultan del procedimiento PCR: G delecionada entre las pb 4059 y 4060, G delecionada entre las pb 4131 y 4132, G sustituida por A en 4195, y A sustituida por G en 4508.
4695-6934	corresponden a 3557-5796 del pDAB 305 (SEQ ID NO:2)

## Ejemplo 5

*Ensayo transiente de construcciones ADF-GUS*

5 Se iniciaron cultivos de callo de tipo II a partir de embriones zigóticos inmaduros del genotipo “Hi-II” (Armstrong *et al.* (1991) *Maize Genet. Coop. News Lett.* 65:92-93). Los embriones fueron aislados de espigas crecidas en invernadero a partir de cruces entre padre Hi-II A y padre Hi-II B, ó embriones F<sub>2</sub> derivados de una auto- o sib-polinización de una planta Hi-II. Se cultivaron los embriones inmaduros (1,5 a 3,5 mm) en medio de iniciación de callo 15Ag10, que consiste en sales N6 y vitaminas (Chu *et al.*, (1978) *The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops*. Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Peking Press, 43-56), 1,0 mg/l de 2,4-D, L-prolina 25 0mM, 100 mg/l de hidrolizado de caseína, 10 mg/l de AgNO<sub>3</sub>, 2,5 g/l de GELRITE (Schweizerhall, South Plainfield, NJ), y 20 g/l de sacarosa, con un pH de 5,8. Después de cuatro a seis semanas, el callo fue subcultivado en medio de mantenimiento (medio de iniciación en el que se omitió el AgNO<sub>3</sub> y la L-prolina se redujo a 6 mM). La selección para el callo de Tipo II tuvo lugar durante aproximadamente 12-16 semanas.

15 Cada una de las construcciones GUS de ensayo fue co-precipitada sobre partículas de oro con pDeLux (que contenía un promotor modificado del 35S que regula la luciferasa con el UTR 3' del Nos) según el siguiente protocolo. Se usaron cantidades molares iguales de los plásmidos GUS. Un total de 70 µg de ADN, 35 µg de pDeLux más 35 µg de ADN de ensayo y ADN Bluescript™ (Stratagene, La Jolla, CA) cuando fue necesario, se diluyó en agua estéril hasta un volumen de 150 µl. Se añadió el ADN y el agua a 30 mg de partículas de oro esféricas de 1,0 µm, de superficie esterilizada (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La mezcla fue agitada brevemente en un vórtex (aproximadamente 15 segundos) antes de añadir 37 µl de cloruro cálcico 2,5 M y 15 µl de espermidina 0,1 M (base libre). Después de agitar en vórtex durante 30 segundos, se dejó precipitar el ADN y el oro de la solución. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol. La mezcla ADN/oro se diluyó a 1:4 antes del uso para transformación.

25 El callo de tipo II fue pretratado en medio osmótico durante aproximadamente 16 horas. El medio osmótico consistió en medio de mantenimiento con sorbitol 0,2 M y manitol 0,2 M. Después, el callo se puso en placas de 60 x 20 mm de medio osmótico solidificado con 2% de agar para su bombardeo mediante helio presurizado. Rejillas de 104 µm de malla cubrieron cada diana (500-600 mg de callo) para impedir salpicaduras y pérdida de tejido. Las dianas fueron bombardeadas individualmente con la mezcla ADN/oro usando el dispositivo Dow AgroSciences Helium Blast Device 1.0 (patente de EE.UU. N° 5.141.131). Bajo un vacío parcial de 84,7 kPa, a una distancia de tiro de 10 cm y una presión de 10,33 MPa, la mezcla ADN/oro fue acelerada hacia cada diana cuatro veces, administrando 20 µl por tiro. Se rotaron las dianas 180° después de cada bombardeo. El tejido también fue mezclado a mitad del procedimiento para exponer el callo no bombardeado. Tras completarse el bombardeo, las dianas se pusieron sobre el medio osmótico original para una incubación durante una noche a 26°C en la oscuridad.

35 Se seleccionaron cuatro líneas celulares de callo de tipo II para cada experimento. Se usaron dos dianas de cada línea por construcción. También, se incluyeron dos controles no transformados (CNT) compuestos de tejido reunido entre todas las cuatro líneas. Los controles fueron transferidos a medios osmóticos y de bombardeo según el protocolo anterior, pero no fueron sometidos a bombardeo con helio.

45 Aproximadamente 20 horas después del bombardeo, se transfirieron 200-400 mg de cada diana a un tubo de muestras de 1,5 ml (Kontes, Vineland, NJ). Para la extracción de proteínas, se homogeneizó el callo usando un almirez Kontes Pellet Pestle de acero inoxidable propulsado por un motor de 0,35 amperios, 40 Watios (Modelo 102, Rae Corporation, McHenry, IL) a una configuración de “90”. El reactivo de lisis de cultivos celulares de un kit de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI) sirvió como tampón de extracción. Se añadieron inhibidores de proteasa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y sal de hemisulfato de leupeptina al tampón de lisis a las concentraciones de 1 mM y 50 µM, respectivamente. Antes de moler, se añadieron 0,5 µl de tampón de lisis por mg de tejido al tubo de muestras. Se homogeneizó el callo en cuatro intervalos de 25 segundos, con una incubación en hielo de 10 segundos después de cada periodo de molienda. Después, se añadió 1,0 µl de tampón de lisis por mg de tejido a la muestra, que se puso en hielo hasta que se completó toda la molienda de las muestras. Se centrifugaron después las muestras dos veces a 50 5°C durante 7 minutos a máxima velocidad (centrífuga Eppendorf Modelo 5415). Después del primer centrifugado, se retiró el sobrenadante de cada tubo y el sedimento fue descartado. También se recogieron los extractos de callo (sobrenadantes) después del segundo centrifugado, y se mantuvieron en hielo para los análisis de GUS y LUC.

55 A partir del kit de ensayo LUC, se preparó el tampón de ensayo LUC según las instrucciones del fabricante. Se calentó este tampón hasta temperatura ambiente y se cargó en la bomba dispensadora de un fotómetro de luminiscencia automático (Luminómetro Modelo 1251 y Dispensador Modelo 1291, Bio-Orbit, Finlandia). Cada muestra se ensayó por triplicado añadiendo 20 µl de extracto a tres viales de polipropileno del luminómetro (Wallac, Gaithersburg, MD). Por vial, fueron dispensados 100 µl de tampón de ensayo y la luminiscencia fue detectada durante un periodo de integración de 45 segundos. Dentro de cada experimento también se midieron “reacciones de blanco”, que incluyeron 20 µl de tampón de extracción en vez de extracto de callo.

65 Para el análisis de la actividad GUS, se usó un kit de ensayo GUS-Light™ (Tropix, Bedford, MA). De nuevo, cada muestra se ensayó por triplicado, usando 20 µl de extracto por vial del luminómetro. El tampón de reacción de GUS-Light™ se preparó a partir del kit de ensayo según las instrucciones del fabricante. Se calentó este tampón hasta temperatura ambiente y se añadió en alícuotas de 180 µl a cada vial del luminómetro, a intervalos de 10 segundos. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 300 µl de tampón acelerador de la emisión

## ES 2 269 207 T3

de luz GUS-Light™ y la luminescencia fue detectada durante un periodo de integración de 5 segundos. También se incluyeron “reacciones de blanco” en el ensayo GUS, usando 20 µl de tampón de extracción en vez de extracto de callo.

5 Los resultados de GUS y LUC se reportaron en unidades de luz relativas (RLU). Las lecturas tanto de “blancos” como de CNT fueron restadas de los niveles RLU de las muestras. Para comparación de una construcción GUS con otra, las lecturas GUS fueron normalizadas a los datos LUC usando las raíces cuadradas de cada una para calcular una relación GUS/LUC para cada muestra ensayada. Después se promediaron las relaciones para todas las muestras por construcción, y las medias fueron comparadas usando un test T para el análisis de la significancia estadística. Se usó  
10 una construcción de promotor modificado 35S (35T)/GUS/Nos poli A (pDAB305) como control en cada experimento. Los niveles de expresión de la construcción de ensayo fueron reportados como tanto por ciento de la actividad del pDAB305.

15 El plásmido pDAB620 no demostró expresión por encima del fondo, respecto al control 35T. Sin embargo, en experimentos repetidos pDAB621 y pDAB625 dieron de media 62% y 82% del estándar, respectivamente. El pDAB621 expresó consistentemente a niveles significativamente más bajos que el control. Mientras que el pDAB625 dio como resultado una expresión que fue algo más variable y en algunos casos resultó ser tan bueno como el pDAB305.

### Ejemplo 6

20 *Expresión estable en el maíz*

La actividad del promotor del ADF fue caracterizada por la frecuencia de formación de callo de tejido de maíz transformado con el plásmido pDAB630 (promotor del ADF/intrón del ADF/PAT/nosA) en presencia de medios que  
25 contenían un agente selectivo. También se produjeron eventos de maíz transgénico que contenían PAT bajo el control del promotor de la actina de arroz, para servir como controles internos. En un total de 15 experimentos estrechamente relacionados, la construcción de ADF rindió de igual modo o bien superó a la construcción del promotor de la actina de arroz con respecto a la recuperación de aislados resistentes a los herbicidas. Un análisis “Southern” confirmó la presencia del gen PAT en todos los eventos ADF producidos.

30 Ejemplo 7

### *Maíz transgénico*

35 En plantas transgénicas de dos eventos transformados con el plásmido pDAB625 se analizó la expresión GUS en tejido foliar. En ensayos cuantitativos, se observaron niveles de GUS equivalentes a 0,02% de proteína extraíble total.

40

45

50

55

60

65

## ES 2 269 207 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico aislada, que comprende las bases 1 a 734 de la SEQ. ID No: 1 y un intrón adecuado para potenciar la expresión.
2. Un ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el intrón es intrón 1 del ADF, intrón 1 del Adh1, intrón 1 de la ubiquitina, o intrón 1 del Bronce 2.
- 10 3. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, en el que las bases 1 a 734 de la SEQ. ID No: 1 y el intrón están unidos operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga.
4. Una construcción de ácido nucleico o molécula de ácido nucleico aislada, que comprende un promotor adecuado para el uso en plantas y las bases 882 a 2161 de la SEQ. ID No: 1.
- 15 5. Un ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el promotor es el promotor del ADF, el promotor del per5, el promotor del 35T, el promotor del CaMV19S, el promotor del CaMV35S, el promotor del CaMV35S potenciado, la pequeña subunidad promotora para la 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, el promotor de la actina del arroz, el promotor de la ciclofilina, el promotor del ADH1, el promotor de la patatina de Clase I, el promotor de la glucosa Pirofosforilasa, el promotor de la beta conglucininina, el promotor del E8, el promotor del 2AII, o el promotor de la chitinasa ácida.
- 20 6. Un ácido nucleico según la reivindicación 4, en el que el promotor comprende las bases 1 a 734 de la SEQ. ID No: 1.
- 25 7. Una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 4, 5 ó 6, en la que el promotor y las bases 882 a 2161 de la SEQ. ID No: 1 están unidos operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga.
8. Una planta transformada, que comprende al menos una célula vegetal que contiene una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 7.
- 30 9. Una semilla o grano transformado, que comprende una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 7.
- 35 10. Un método de transformar una planta, que comprende:
- a) introducir en una célula vegetal un vector que comprende una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 7; y
  - b) regenerar una planta a partir de dicha célula.
- 40 11. Un método de producir una semilla, que comprende:
- a) introducir en una célula vegetal un vector que comprende una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 7;
  - b) regenerar una planta a partir de dicha célula; y
  - c) transmitir sexualmente dicha construcción de ácido nucleico a la progenie.
- 45 50 12. El método de la reivindicación 11, que comprende además la etapa adicional de recoger la semilla producida por dicha progenie.
- 55
- 60
- 65

# ES 2 269 207 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rubin-Wilson, Beth Smith, Kelley A

<120> PROMOTOR E INTRON DEL FACTOR DESPOLIMERIZADOR DE LA ACTINA DEL MAIZ

<130> 50695

<140>

<141>

<150> US 60/167,111

<151> 23-11-1999

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2253

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Producto de PCR AP2/BC294

<400> 1

```

cgccccgggca ggtaaatagc aagtgatttt cctctctatgg attccatcta ttttctcggc 60
caccaaacta gccctaaagat ttgttttgtc tggatagcac aaaaattgtc catcttgctt 120
gcaccataa cactgccttg aacagaagat gcaatgattac ctgcatgcat tgaacgacat 180
accagataag tgcaccagat accacaaact tacatctctgg agacacctta ctatatgatt 240
tatgtttgca caacatacag gtattatact cacctcttag agttgtattt ttatattcgt 300
attgtagtgt aatttgattt gtattagttt agttctgtat tggttgtttc taaaaaaatc 360
gttagattat atcgataata tatgtggtat tctcttttac gtaatcattg tgcactaaca 420
ttttgttgaa tataatataat accgttgcaa cgtacgggca cccaactagt ctattcatta 480
ttttcccagg atgctcattc cgaatctctc ctctcggaga agaaaacgaa cgaaagatca 540
cgaaagatcg cgcacgcggc gcccgtccat ctctacatcc gacgaccgcg caagctcgca 600
gtgggcccgt ccgttccgtc ggggggcagc taccgctac cacacccccg ctccccgcac 660
cgcacggacc ggggtggtaa aacccggcga ccacatcaaa acacgaggcg tccccgactc 720
cgcagtcctc aggaccggtc actcggcagc cagcttagca gcacagcagc agccagagcc 780
atccccctct ctgctacgc tctgcttctt cggcgcgat tctctctctt cctctctcac 840
cctcgtccgt ccccttccgg cgcacgagct cgcctggagt ggtaaggccc ccgctcccat 900
ccgctacccc tcccctcccc tccgcgcact ctggttctct cccggatcgg cgagcgcgtg 960
ctgattccgg gccctctggt tctcgggagc ggttagcgtg cgcttcggat ctagttagat 1020
tcaggggggtc aggaggatcg ccgctgctcg gccctgctcg gggctgattc gtggtttcgt 1080
cgggagggag tcttgatcgg gatcatgggg ttcttcatgg ttccgtgacg ctggggagcc 1140
agaaacttgc gtgggattcc gcgatctgtg gccctggatt ctggtctctc gtctagcgtc 1200
agctgcagac cgtggcgtgg tgcgcggccg ctctggatcc ttgctgtttg cgcctgctcg 1260
tgtaaaatcg aactgtttag atctaagtcc cgttagatgc cgtggcgtg gaatctcgtt 1320
tgatctgtgt gtcagagcgc ctgtgtagct ctctggctg taacatacat ctgctgattt 1380
ggctctcgac ggcttaggcc gggggagcct agatggcggg gcaccagctg ctccctaatt 1440
aggttggttc tctgtggtat ctgttgactt gatcttaggt tgcagacttg cagtaggacg 1500
ctggcactgc cattgaccag gagctgcaca acaggggcca agctaggtta ttttagggag 1560
gtgcagatag gggcggtaat gacctctaga ttctgacta taaaatgtaa tgatcggatc 1620
gaatcgggat catctcccat tctattcat ttttgaacta aaaataatta agggccctaa 1680
cttattatga agaaacattt gggtcgtgat ccaactactac ccttaggggg agatgcaccc 1740
caaaaaaatt ctatagattt agttaaattt tcaacatata tgcatcccta taaaaaattc 1800
ttatgcacat tcaattttgt tctagcttcc cccttaggta ctgagcacta gcataagaat 1860

```

```

tttgttctag aatatgtggc ggtagtatac cctcttagca ctactaggt gtctccact 1920
ctcccagaaa atgctttctt tgtttagaca ctctgcaacta tgggtcgaga gtcaagacta 1980
tgagctgaaa tgctgaaatg tctaattgta gcaatctctg cactggttca attgcagcct 2040
gatttagaaa tgctggggac agctgctgt gcaatgcaaa ataaaatgtg gtagtaggta 2100
ctttgaaggg agactcaaac tttgcatttc caactaacca tgatttaact tgtggttga 2160
ggcgaacgcg agatcgggtg tgcctgtgaa cgaatgagtg atgctgaagt ttggcagact 2220
gcagtcgaaq aggtcgcacc gcttcataac tttt 2253

```

<210> 2

<211> 5796

# ES 2 269 207 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: pDAB305

<400> 2

```

10      tcgcgcgttc  cggatgatgac  ggtgaaaacc  tccgacacat  gcagctcccg  gagacgggtca  60
      cagccttgtcc  gtaagcggat  gccgggagca  gacagcccg  tcagggcgcg  tcagcgggtg  120
      ttggcgggtg  tcggggctgg  cttaaactatg  cggatcaga  gcagattgta  ctgagagtgc  180
      accatatgctg  gtgtgaaata  ccgcacagat  gctaaaggag  aaaataccgc  atcagggcgc  240
      attcggcatt  caggctgcgc  aactgttggg  aagggcgatc  ggtgcgggcc  tcttcgctat  300
      tacgccagct  ggcgaaaggg  ggatgtgctg  caagcgatt  aagttgggta  acgccagggt  360
15      tttcccagtc  acgacgttgt  aaaacgacgg  ccaagtaatt  cccgatctag  taacatagat  420
      gacaccggcg  gcgataatct  atcctagtct  gccgctata  tttgttttc  tatcgcgtat  480
      taaatgtata  attgcgggac  tctaatacata  aaaaccctac  tcataaataa  cgtcatgcat  540
      tacatgttaa  ttattacatg  cttaacgtaa  ttaacagaa  attatatgat  aatcatcgca  600
      agaccggcaa  caggattcaa  tcttaagaaa  cttattgcc  aaatgtttga  acgatcgggg  660
20      aaattcgagc  tctccaattc  cccaccgagg  ctgtagccga  cgatggtgcy  ccaggagagt  720
      tgttgattca  ttgtttgctt  ccctgtgctg  gttttcacc  gaagttcatg  ccagtcacgc  780
      gtttttgtag  cagaaaagcc  gccgactctg  gttgcggtc  gcgagtgaag  atccctttct  840
      tgttaccgcc  aacgcgcaat  atgccttggg  aggtcgcaaa  atcggcgaaa  ttccatacct  900
      gttcaccgac  gacggcgtg  acgcgatcaa  agcggcggtg  atacatatcc  agccatgcac  960
      actgatactc  ttcactccac  atgtcggtgt  acattgagtg  cagcccggct  aacgtatcca  1020
25      cgccgtattc  ggtgatgata  atcggctgat  gcaattctc  ctgccaggcc  agaagttctt  1080
      tttccagta  ctctctgccc  gtttccaaat  cgtgctttg  gacataccat  ccgtaataac  1140
      ggttcaggca  cagcacatca  aagagatcgc  tgatggtatc  ggtgtgagcg  tcgcagaaca  1200
      ttacattgac  gcaggtgatc  ggacgcgtcg  gctgagttt  acgcgttgc  tccgcaggt  1260
      gcgaaatatt  cccgtgact  tgcggacggg  taaccggttc  gttggcaata  ctccacatca  1320
      ccacgcttgg  gtggtttttg  tcacgcgcta  tcagttcttt  aatcgctgt  aagtgcgctt  1380
30      gctgagtttc  cccgtgact  gcctcttctg  tgacagttc  ttccgcttg  ttgcccgtt  1440
      cgaaaccaat  gcctaaagag  aggttaaagc  cgaagcagc  agtttcatca  atcaccacga  1500
      tgccatgttc  atctgcccag  tcgagcatct  ctacagcgt  agggtaatgc  gaggtacggt  1560
      aggagttggc  cccaatccag  tcattaatg  cgtggtcgtg  caccatcagc  acgttatcga  1620
      atcctttgcc  acgtaagtcc  gcatcttcat  gaccgacaaa  gccagtaaa  tagaacggtt  1680
35      tgtggttaa  caggaactgt  tcgcccttca  ctgactga  ccggatgccg  acgcgaagcg  1740
      ggtagatata  acactctgtc  tggtttttgg  ctgtagcga  cagttcatag  agataacctt  1800
      caccgggtg  ccagaggtgc  ggattcacca  ctgcaaaagt  cccgctagtg  ccttgtccag  1860
      ttgcaaccac  ctgttgatcc  gcatcacgca  gttcaacgct  gacatcacca  ttggccacca  1920
      cctgccagtc  aacagacgcg  tggttacagt  ctgacgac  atgcgtcacc  acggtgatat  1980
      cgtccacca  ggtgttcggc  gtggtgtaga  gcaaacgct  gcgatggatt  ccggcatagt  2040
40      taaagaaatc  atggaagtaa  gactgctttt  tctgcccgtt  ttcgtcggta  atcaccattc  2100
      ccggcgggat  agtctgccag  ttcagttcgt  tgccacaca  aacggtgata  cgtacacttt  2160
      tcccggcaat  aacatacggc  gtgacatcgg  ctcaaatgg  cgtatagccg  ccctgatgct  2220
      ccatcacttc  ctgattattg  acccacactt  tccgtaatg  agtgaccgca  tcgaaacgca  2280
      gcacgatacg  ctggcctgcc  caaccttctg  gtaaaagac  ttcgcgctga  taccagacgt  2340
45      tgcccgcata  attacgaata  tctgcatcgg  cgaactgatc  gttaaaactg  cctggcacag  2400
      caattgcccg  gctttcttgt  aacgcgcttt  cccaccaacg  ctgatcaatt  ccacagtttt  2460
      cgcgatccag  actgaatgcc  cacagccgct  cgaacttttt  gatttcacgg  gttggggttt  2520
      ctacaggacg  gaccatggct  gaatgcttat  cccgtgcttg  gaacaaatgg  ccccagatcc  2580
      gtcgcgagct  gcacgggtcc  aggaaaagcaa  tcgatatgct  aagctaaatc  atcaagatgc  2640

```

ES 2 269 207 T3

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

```

aaacttttcg cccttgctaa acacggtaaa attcgaatgg acatgtgtgg agcagcaaa 2700
gagctttccc caaaattact caacgaatca taaaccaga ttagtcagat caagagacag 2760
aggagaaaca aggcggacct ttgcacttga tctgggatt gccctgactt ggtggtgctg 2820
gtatattagg gatagggttg ctctatcca cagcttgctc accaaatc agctcctccg 2880
tggactgcct tgtcagacct tcagctggat cctctagagt cccccgtgt ctctccaaat 2940
gaaatgaact tccttatata gaggaagggt cttgggaagg atagtggat tgtgcgtcat 3000
cccttacgtc agtggagata tcacatcaat ccacttgctt tgaagacgtg gttggaacgt 3060
cttcttttcc cacgatgctc ctctgtgggtg ggggtccatc tttgggacca ctgtcggcag 3120
aggcatcttc aacgatggcc tttcctttat cgcctatgat gcattttagt gagccacctt 3180
ccttttccac tatcttcaca ataaagtgc agatagctgg gcaatggaat ccgaggaggt 3240
ttccggatat tacctttgt tgaaaagtct ccacttgatga tcacatcaat ccacttgctt 3300
tgaagacgtg gttggaacgt cttcttttcc cacgatgctc ctctgtgggtg ggggtccatc 3360
tttgggacca ctgtcggcag aggcaccttc aacgatggcc tttcctttat cgcaatgatg 3420
gcattttagt gagccacctt ccttttccac tatcttcaca ataaagtgc agatagctgg 3480
gcaatggaat ccgaggaggt tacctttgt tgaaaagtct ccacctgctt 3540
agatctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt 3600
gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg 3660
gtgcctaatt agtgagctaa ctacacatta ttgctgtgct ctcactgccc gctttccagt 3720
cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcggg agagccggtt 3780
tgcgtattgg gcgctctcc gttcctctgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3840
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaaag cggtaatac gttatccaca gaatcagggg 3900
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3960
ccgcgttgcg ggcgttttcc cataggctcc gcccctctga cgagcatcac aaaaactcac 4020
gctcaagtca gaggtagcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 4080
gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccttccgct taccggatac ctgtccgct 4140
ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg 4200
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccctg 4260
cgctcgttag cggtggtttt cgtcttagt cgtcttagt aagacacgac tttccgcccac 4320
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcaggtta ttagggcgg gctacagagt 4380
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc 4440
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaacca 4500
ccgctcgttag cggtagtttt ttgttttqca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4560
ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4620
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaagcatctt cacctagatc cttttaaatt 4680
aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tataagagta aacttggctc gacagttacc 4740
aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgtatctgct atttcgttca tccatagttg 4800
cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg 4860
ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc 4920
cagccggaag ggccgagcgc agaagtggte ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta 4980
ttaattggtt ccgggaagct agagtaagta gttcccgagt taatagttg cgcaacggtg 5040
ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcggt tggtaggct tcattcagct 5100
ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta 5160
gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta tcactcatgg 5220
ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgcccac cgtaagatgc ttttctgtga 5280
ctgggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgat gcggcgaccg agttgctctt 5340
gccccgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca 5400
ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaaactct caagcatctt accgctgttg agatccagtt 5460
cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt 5520
ctgggtgagc aaaaaCagga aggcAAAatg ccgcaaaaaa gggAataagg gcCacacgga 5580
aatgttgaat actcatactc ttccttttcc aatactattg aagcatttat cagggttatt 5640
gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttgaaaaa taacaaata ggggttccgc 5700
gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa 5760
cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcctc 5796
  
```