

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 018**

21 Número de solicitud: 201231220

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

27.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2014

Fecha de la concesión:

04.12.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.12.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070484

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(100.0%)**

**CAMPUS UNIVERSITARIO-PABELLON DE
GOBIERNO EDIFICIO JOSÉ PRAT PLAZA DE LA
UNIVERSIDAD, Nº 2
02071 ALBACETE (Albacete) ES**

72 Inventor/es:

**BAKAYAN, Adil y
LLOPIS BORRÁS, Juan Francisco**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **VARIANTES DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN SENSIBLE AL CALCIO tdTOMATO-AEQUORINA**

57 Resumen:

Variantes de la proteína de fusión sensible al calcio tdTomato-aequorina.

La presente invención se refiere a proteínas derivadas de la proteína de fusión tdTomato-aequorina, a una composición que las comprende, a la secuencia nucleotídica que las codifica, a su uso para la detección y/o cuantificación in vitro de la concentración de calcio intracelular, así como a un kit que las comprende y al uso del kit para el mismo fin. También se refiere al procedimiento de obtención de la proteína de fusión de la invención. Además, también se refiere a un método de cribado utilizando las proteínas de fusión de la invención.

ES 2 445 018 B1

DESCRIPCIÓN

Variantes de la proteína de fusión sensible al calcio tdTomato-aequorina

La presente invención se refiere a proteínas derivadas de la proteína de fusión tdTomato-aequorina, que emite en la región roja del espectro cuando la aequorina une el ión calcio. Las proteínas de la invención son útiles para la cuantificación de calcio intracelular. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la Biomedicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El calcio (Ca^{2+}) es conocido por participar como segundo mensajero en el control de una gran variedad de procesos celulares en diferentes organismos. La aequorina (Aeq) es una fotoproteína sensible al Ca^{2+} , un complejo formado por la proteína apoequorina, el luminóforo coelenterazina (CLZ) y oxígeno molecular. Las técnicas de bioimagen para Ca^{2+} basadas en Aeq están bien establecidas. Esta fotoproteína emite luz azul cuando está en contacto con Ca^{2+} libre, y presenta una alta relación señal-ruido. Sin embargo, su bajo rendimiento cuántico limita la resolución espacio-temporal en medidas de una sola célula y su uso en bioimagen *in vivo*. Entre todos los sensores de Ca^{2+} disponibles, Aeq es un reportero de elección en numerosas aplicaciones debido a su extraordinaria flexibilidad. Por ejemplo, las propiedades funcionales de Aeq han sido alteradas mediante la incorporación de diferentes análogos de CLZ. Además, estudios de mutagénesis han aportado variantes con diferente sensibilidad al Ca^{2+} , desplazamiento de la emisión, mejora de la termoestabilidad de la proteína u otras características. Por otra parte, estos dos enfoques, mutaciones en apoequorina más la elección de una CLZ sintética, se han combinado con éxito.

La transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) consiste en el paso de la energía del estado excitado de una fotoproteína luminiscente (dador de energía, como Aeq), a un aceptor (como una proteína fluorescente, FP); de esta forma en lugar de la emisión de Aeq, se obtiene emisión del aceptor. Se ha utilizado BRET como una estrategia para el desplazamiento de la emisión azul de Aeq y la generación de tonos alternativos, por ejemplo verde, amarillo y rojo (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520). La primera proteína fluorescente roja (RFP) que se fusionó con Aeq como aceptor de BRET fue mRFP1, con un pico de emisión de 612 nm. Sin embargo, la transferencia de energía en estas fusiones fue muy limitada (Manjarres I. M., *et al.* Pflugers Arch 2008; 455: 961-970). Más recientemente hemos llevado a cabo un estudio comparativo de Aeq fusionada con diferentes FPs, y se encontró que tdTomato, que presenta un máximo de emisión a 582 nm, fue un aceptor de energía adecuado. La quimera tdTomato-Aeq (tdTA) presentó el mayor porcentaje de cuentas por encima de 600 nm de todas las fusiones existentes, aunque la transferencia de energía no excedió el 50% (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520), y tiene dos picos de emisión (a 470 nm y a 582nm), por lo que no es una proteína de fusión adecuada para estudios de Ca^{2+} en dos colores simultáneos (dos o más compartimentos, dos tipos celulares, etc).

Existen fusiones de GFP con Aeq (GA) con una emisión verde (pico de 509 nm) pero es importante encontrar un sensor de Ca^{2+} que emita en la región roja, y que, a diferencia de tdTA, no presente dos picos de emisión. La ventaja de obtener variantes de Aeq con emisión roja es que, por un lado, se facilita la adquisición de imágenes de doble canal en combinación con GA que es una variante verde (Manjarres I. M., *et al.* Pflugers Arch 2008; 455: 961-970), si se consigue el suficiente brillo y separación espectral entre la variante verde (GA) y la roja. Por otro lado, para el seguimiento de Ca^{2+} en los tejidos profundos de mamíferos vivos, se necesita que emita en la llamada ventana óptica (de 600 a 900 nm), ya que la luz ultravioleta, azul y verde es considerablemente atenuada por los tejidos animales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El presente trabajo está dirigido a la obtención de un sensor bioluminiscente de Ca^{2+} de color rojo, tomando tdTA como punto de partida, mejorando la eficacia de la transferencia de energía, ajustando la afinidad del Ca^{2+} al nivel apropiado para la expresión de las quimeras en diferentes compartimentos celulares. Para este fin, se combinaron varios enfoques. Se mejoró la BRET al disminuir la distancia entre tdTomato y Aeq (comparado con tdTA). La variante resultante se denominó AD1. Posteriormente, se aplicó mutagénesis dirigida en la proteína apoequorina, lo que ha resultado en un porcentaje de BRET máximo, el aumento de la estabilidad de las proteínas quiméricas, y cambios en la sensibilidad al Ca^{2+} . Finalmente, estas variantes se emparejaron con análogos de CLZ sintéticos y se ensayó su capacidad de informar de niveles de Ca^{2+} en dos compartimentos celulares de la misma célula (mediante protocolos de imagen en dos canales), la movilización de Ca^{2+} por la estimulación repetitiva con un agonista que actúa sobre un receptor de membrana, y el registro de la actividad espontánea del Ca^{2+} celular.

Los autores de la presente invención han variado la configuración del enlace entre apoequorina y tdTomato para maximizar la transferencia de energía. Una combinación de delecciones cortas en el extremo C terminal de tdTomato, N terminal de apoequorina y la eliminación completa del péptido conector en tdTA ha producido variantes como AD1 con BRET muy eficiente, donde se recogió más del 77% de la luz por encima de 575 nm, aunque esta manipulación provocó una disminución en el brillo de un 28%. Se obtuvieron otras mejoras mediante la combinación de AD1 con mutaciones puntuales en la secuencia de apoequorina descritas en la literatura, como Y82F, que provoca un desplazamiento hacia el rojo, y Q168R, que aumenta su termoestabilidad. Con ellas se obtuvo un resultado de hasta el 85% del total de la luz en la banda roja (variantes ADIF y ADIFQ).

La bioluminiscencia celular se incrementó 7 veces por la mutación de termoestabilidad Q168R (variante ADNQ), lo

que permitió la detección de cambios transitorios de Ca^{2+} con protocolos de adquisición rápida. Se logró la medición simultánea de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial, mediante el emparejamiento apropiado de variantes de emisión verde y roja, junto con el ajuste de la sensibilidad al Ca^{2+} y la localización subcelular de las quimeras. Se obtuvieron imágenes de oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas e inducidas por carbacol en células HEK individuales, con una combinación del biosensor rojo de una alta afinidad por Ca^{2+} y una CLZ sintética (CLZ-hcp). En conclusión, las variantes de tdTA descritas en la presente invención mejoran BRET de Aeq a un emisor rojo hasta un valor máximo, lo que facilita poder tomar imágenes de Ca^{2+} en tejidos profundos de animales.

La tdTomato en la se refiere a un dímero de DsRed que se obtiene a partir del organismo *Discosoma sp.* (Shaner N. C., *et al.* NatBiotechnol 2004; 22: 1567-1572) y cuya secuencia de ácido nucleico se refieren a la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos se refiere a la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 1 es idéntica a la secuencia nucleotídica en GenBank AY678269.1. La SEQ ID NO: 2 es idéntica a la secuencia de proteína AAV52169.1 en GenBank.

La apoeaquerina utilizada en la presente invención se refiere a una proteína que, combinada con el cofactor CLZ, emite luz en la zona azul del espectro visible, que se aísla del organismo *Aequorea victoria* y cuya secuencia de ácido nucleico se refiere a la SEQ ID NO: 3 y cuya secuencia de proteínas se refiere la SEQ ID NO: 4. También se puede referir a cualquiera de las variantes de apoeaquerina descritas que guardan al menos un 70% de identidad, por ejemplo Q7YTW8 (cuya secuencia nucleotídica en GenBank es AB103338.1), P02592, Q6J4T7, Q6J296, Q7YTX0, Q6J294, Q6J293, Q6J295, Q6J2A1, Q6J2A0, Q6J299, Q6J296, Q6J297, Q6J2A2, Q7YTW7, Q7YTW9 o P07164 que son obtenidas a partir de *Aequorea victoria*; o Q8WQY8, Q8WQY7 o Q6XDT9 que son obtenidas a partir de otras especies de *Aequorea*. Los códigos de las secuencias de proteína corresponden a la base de datos UniProtKB.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión fluorescente roja que comprende:

- a. una subunidad (a) que consiste en una proteína con al menos un 70%, preferiblemente al menos un 81%, más preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de identidad con la proteína SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma, y
- b. una subunidad (b) que consiste en una proteína fotoluminiscente sensible al calcio, con al menos un 70%, preferiblemente al menos un 81%, más preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de identidad con la proteína SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma,

donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) sin espaciador o mediante un polipéptido espaciador de hasta 19 aminoácidos, preferiblemente el polipéptido espaciador consiste en un polipéptido de hasta 11 aminoácidos, más preferiblemente es de entre 2 y 11 aminoácidos.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas (luz de excitación) y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente (emisión fluorescente).

Luminiscencia es todo proceso de emisión de luz cuyo origen no está condicionado por un aumento de temperatura. Quimioluminiscencia es el fenómeno por el que en algunas reacciones químicas la energía liberada se emite en forma de luz. Se produce cuando, en una reacción química, los electrones saltan de las capas más altas de los átomos a las más bajas. Bioluminiscencia es la quimioluminiscencia que se produce por organismos vivos o células.

Se entiende por "proteína fluorescente" aquella proteína que tras ser excitada con una determinada longitud de onda, emite luz de una longitud de onda mayor. Se entiende por "proteína fluorescente roja" aquella proteína que tras ser excitada en una determinada longitud de onda emite luz en la zona roja del espectro visible. Se entiende por "proteína luminiscente" aquella proteína que emite luz a consecuencia de una reacción química, que puede ser enzimática o no. Se entiende por "fotoproteína" aquella proteína luminiscente cuya luz emitida es proporcional a la cantidad de proteína, y no a la cantidad de sustrato de una reacción enzimática. Algunas fotoproteínas (como Aeq u obelina) inician la emisión de luz al unir el ión calcio.

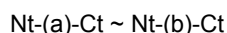
El término "identidad", tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias de aminoácidos puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4 capaz de emitir fluorescencia.

El término "polipéptido espaciador" o "linker", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una secuencia de aminoácidos corta, preferiblemente, de hasta 19 aminoácidos de longitud situada entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad (a) y la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b).

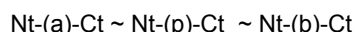
Cuando la unión es directa, es decir, sin espaciador, entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión de la

invención, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b), tal y como se representa en el siguiente esquema:



- 5 donde (a) representa a la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

- 10 Cuando la unión entre las subunidades (a) y (b) de la proteína de fusión de la invención se realiza mediante un polipéptido espaciador, el aminoácido del extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) forma un enlace peptídico con el aminoácido del extremo amino-terminal del polipéptido espaciador (p) y el aminoácido del extremo carboxilo-terminal del polipéptido espaciador forma un enlace con el aminoácido del extremo amino-terminal de la subunidad (b), tal y como se representa en el siguiente esquema:



- 15 donde (a) representa a la subunidad (a), (b) representa a la subunidad (b), (p) representa el polipéptido espaciador, Nt representa el extremo amino-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, Ct representa el extremo carboxilo-terminal de la subunidad o del polipéptido espaciador correspondiente, y ~ representa un enlace peptídico entre las diferentes unidades de la proteína de fusión de la invención.

En una realización preferida, la proteína de fusión tiene un pico de emisión de 582 nm.

En una realización preferida, la subunidad (a) es la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma y/o la subunidad (b) es la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

- 20 En una realización más preferida, la subunidad (a) de la proteína de fusión de la presente invención es la SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente la donde la subunidad (b) es la SEQ ID NO: 4.

- 25 En una realización más preferida, la subunidad (a) de la proteína de fusión de la presente invención consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 1 al 465, ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida la subunidad (a) de la proteína de fusión de la presente invención consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 1 al 468, ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 2.

- 30 En otra realización preferida, la subunidad (b) de la proteína de fusión de la presente invención consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 7 al 189 ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida, la subunidad (b) de la proteína de fusión de la presente invención consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 5 al 189 ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 4. En otra realización preferida la subunidad (b) de la proteína de fusión de la presente invención consiste en los aminoácidos consecutivos 1 al 189 ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 4.

El polipéptido espaciador se puede seleccionar, sin limitar a la lista que comprende SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 ya la secuencia serina-glicina (SG).

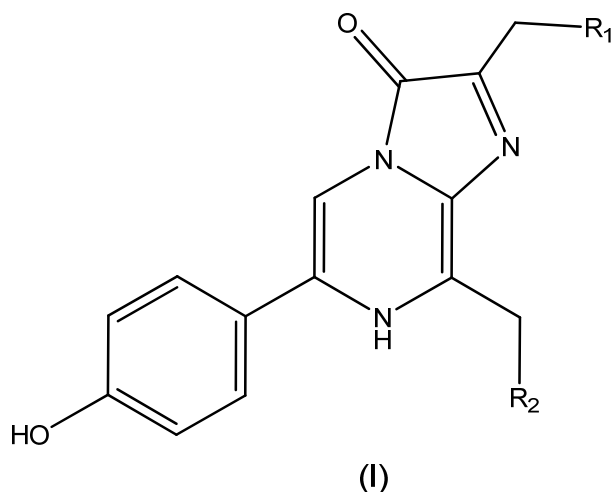
- 35 La proteína de fusión de la presente invención se puede seleccionar, sin limitarse a la lista que comprende SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26.

En otra realización preferida, la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) sin espaciador y más preferiblemente la proteína de fusión es SEQ ID NO: 22.

- 40 En otra realización preferida de la proteína de fusión de la presente invención, la subunidad (b) el aminoácido tirosina de la posición 82 es sustituido por un aminoácido fenilalanina y/o el aminoácido glutamina de la posición 168 es sustituido por un aminoácido arginina y/o el aminoácido asparragina de la posición 26 es sustituido por un aminoácido ácido aspártico.

- 45 La proteína de fusión de la presente invención se puede unir al cofactor CLZ. La apoaquorina necesita unirse a este cofactor y al oxígeno molecular para poder emitir luz (Head JF et al. Nature 2000. 405:372-376; Toma S et al. Protein Science 2005. 14:409-416. En la presente invención cuando se habla del término "reconstitución" para la Aeq, se refiere a que la apoaquorina se une al cofactor CLZ.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la proteína de fusión del primer aspecto de la invención en combinación con el cofactor CLZ de fórmula general (I):



donde: R_1 es un grupo arilo, sustituido o sin sustituir y R_2 se selecciona de entre un grupo arilo o un grupo cicloalquilo.

El término "arilo" se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 12 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Los grupos arilo son por ejemplo, pero sin limitarse a fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes. Preferiblemente R_1 es un fenilo o naftilo, que puede estar o no sustituido, cuando está sustituido preferiblemente al menos por un grupo OH o halógeno, más preferiblemente el halógeno es F, más preferiblemente el grupo está en posición para. Preferiblemente R_2 es un fenilo.

"Cicloalquilo" se refiere a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclopentilo, ciclohexilo o adamantilo. Preferiblemente R_2 es un ciclohexilo o ciclopentilo.

El término "cofactor CLZ" puede referirse a los cofactores CLZ conocidos por el experto en la materia, como puede ser el caso de CLZ-nativo, CLZ-h, CLZ-f, CLZ-cp, CLZ-hcp o CLZ-n.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica la proteína de fusión de la presente invención. La presente invención también se refiere a la construcción genética de RNA que comprende el RNA que se transcribe a partir de la secuencia de la invención. La secuencia nucleotídica puede estar comprendida en una construcción génica. Para generar construcciones génicas que comprendan la secuencia nucleotídica de la invención, se pueden utilizar las herramientas moleculares conocidas por cualquier experto en la materia, entre ellas el clonaje y la utilización de enzimas de restricción. Esta construcción génica de la invención puede comprender el ácido nucleico de la invención, operativamente unido a, una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico de la invención, constituyendo de este modo un *cassette* de expresión.

"Unidos operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control "unida de forma operativa" al ácido nucleico, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del ácido nucleico.

"Secuencia de control" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Dichas secuencias de control incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de iniciación, señales de terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, aquellos componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

En una realización preferida, la construcción génica de la invención comprende el ácido nucleico de la invención unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- a. un promotor,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- d. una señal de poliadenilación, o

e. un activador transcripcional.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región de ADN situada en posición 5’ con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico de la invención. En una realización particular, las secuencias de control de expresión unidas al ácido nucleico de la invención son funcionales en células y organismos procariotas, por ejemplo, pero sin limitarse, bacterias; mientras que en otra realización particular, dichas secuencias de control de expresión son funcionales en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de levadura o células animales.

El ácido nucleico de la invención o la construcción génica de la invención pueden ser introducidos al interior de una célula, denominada célula hospedadora, por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonaje adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

El término “célula hospedadora”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN.

En una realización preferida de la presente invención la secuencia nucleotídica se puede seleccionar de la lista que comprende SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende una secuencia nucleotídica como las descritas anteriormente. En adelante nos referiremos a éstas como a las “células de la invención”. La introducción de dichas construcciones génicas se puede realizar con los métodos conocidos en el estado de la técnica. La presente invención también se refiere a la célula que al comprender la proteína de la invención emite fluorescencia roja. También se refiere esta invención, a la población celular que comprende la célula de la invención.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de la proteína de fusión de la presente invención que comprende cultivar la célula de la invención, descrita anteriormente, en condiciones que permiten la expresión de dichas proteínas, dicha expresión se produce en bacterias (por ejemplo en *E. coli*), levaduras, baculovirus, células de mamífero en cultivo o cualquier otro sistema de expresión de proteína recombinante. Ejemplos no limitantes de células de mamífero son líneas celulares como HeLa o HEK, células musculares, astrocitos, neuronas, células epiteliales y endoteliales.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, además comprende aislar y/o purificar dichas proteínas obtenidas. Las técnicas de aislamiento o purificación que pueden utilizarse para las proteínas de la invención son las conocidas por el experto en la materia. Por este motivo, las proteínas de la invención pueden estar unidas a secuencias de etiquetado (“tag sequences”), por ejemplo etiqueta de polihistidina.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de la proteína de fusión de la presente invención o de la composición que contiene dicha proteína, para la detección y/o cuantificación *in vitro* de la concentración de calcio en una célula, procariota o eucariota (por ejemplo, líneas celulares como HeLa o HEK), en un tejido o en un modelo animal. Preferiblemente el calcio que se detecta se localiza en el interior de una célula, por ejemplo pero sin limitarse a la mitocondria, retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, citoplasma, aparato de Golgi, vesículas secretoras, gránulos de secreción, o dominios subcelulares (como pueden ser subplasmalema o membrana plasmática, entre otras).

En todos estos casos, se añaden secuencias de direccionamiento subcelular en el extremo amino (N) o carboxilo (C) terminal de las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas de la invención. Un ejemplo de direccionamiento subcelular es el direccionamiento a mitocondria por unión de una secuencia en el extremo amino-terminal. En la presente invención se muestran ejemplos, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 que se refieren a la secuencia nucleotídica y a la proteína respectivamente de mitoAD1 (AD1 con señal de localización mitocondrial) y SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 que se refieren a la secuencia nucleotídica y a la proteína respectivamente de mitoADNQ (ADNQ con señal de localización mitocondrial).

Para la detección y/o cuantificación *in vitro* de la concentración de calcio, la proteína de fusión de la presente invención o la composición que la comprende se puede combinar con al menos una fotoproteína sensible a calcio, con emisión verde o azul.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar la sensibilidad o afinidad de proteínas de fusión de la invención en una célula o tejido que comprende:

- 5 a. cultivar las células o el tejido;
- b. poner en contacto las células o el tejido con una proteína sensible al calcio;
- c. añadir a las células el cofactor CLZ,
- 10 d. Estimular las células con un agonista de receptores de membrana para incrementar el calcio a un nivel fisiológico;
- e. determinar la luminiscencia emitida por las células o tejido;
- f. estimular las células con un compuesto que sature las proteínas sensibles al calcio;
- g. determinar la luminiscencia emitida por las células o el tejido;
- h. Comparar el valor obtenido en el paso (e) con el valor obtenido en el paso (g),
- 15 i. determinar la sensibilidad de la proteína sensible al calcio mediante la evaluación de la comparación del paso (h).

En adelante nos referiremos a éste como a "el método primero de la invención".

- 20 Ejemplos de agonistas de receptores de membrana podría ser un agonista muscarínico (como el carbacol) o histamina. Un ejemplo de compuesto que sature las proteínas sensibles al calcio podría ser la digitonina. La determinación de la luminiscencia se puede realizar mediante las técnicas conocidas por el experto en la materia, como son utilización de unas cámaras contadoras de fotones, EM-CCD o un fotomultiplicador.

Se entiende por nivel fisiológico de calcio el nivel alcanzado en el citoplasma tras el estímulo de una hormona o agonista de un receptor de membrana utilizado a concentraciones fisiológicas, que son aquellas halladas normalmente en el cuerpo.

- 25 Se entiende por saturar proteínas sensibles al calcio la puesta en contacto de las mismas con concentraciones de calcio capaces de liberar toda la luminiscencia, que es proporcional a la cantidad de esta proteína. Se utiliza un agente que permeabiliza la membrana celular, por ejemplo, digitonina, y pone en contacto el calcio extracelular con la proteína.

- 30 La comparación en el paso (h) del método primero de la invención se puede realizar mediante la determinación de las cuentas emitidas (luminiscencia) y expresarlas como L/Lmax (cuentas dividido por la suma de las cuentas totales). La comparación del valor L/Lmax con el agonista de receptores de membrana (como el carbacol) y la digitonina, permite estimar la sensibilidad del biosensor al calcio.

- 35 La invención también se refiere a un método para el análisis óptico cuantitativo de la concentración intracelular de calcio (Ca^{2+}). Este procedimiento se puede utilizar para determinar las propiedades farmacológicas de sustancias de prueba que actúen sobre receptores o enzimas implicados en la liberación de Ca^{2+} intracelular. Por ejemplo, el ensayo es adecuado para encontrar ligandos (activadores o inhibidores) de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), otros receptores de membrana acoplados a fosfolipasa C, moduladores de fosfolipasa C u otras enzimas implicadas en la liberación de Ca^{2+} intracelular, o receptores de inositol trifosfato o receptores de rianodina, que median la salida de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares al citoplasma. El término "acoplado" significa una comunicación o interacción molecular entre el receptor y la proteína G, o entre ésta y una enzima como la fosfolipasa C. Los receptores acoplados a proteínas C y enzimas forman parte de la transmisión de señales desde el exterior al interior de la célula. La presente invención también se refiere a un método de screening (cribado) de ligandos de receptores de membrana (en adelante el método segundo de la invención) que comprende:
- 40

- 45 a. cultivar una célula o tejido que expresen un receptor de membrana acoplado a la liberación de Ca^{2+} intracelular;
- b. poner en contacto una célula o tejido con la proteína de fusión del primer aspecto de la invención o con la secuencia nucleotídica que la comprende;
- c. añadir a las células el cofactor CLZ,
- d. estimular las células con una sustancia;

- e. estimular las células con un agonista conocido del receptor.
- f. determinar la emisión de la fotoproteína sensible al Ca^{2+} por las células o tejido;
- g. Cuantificar la luminiscencia emitida en respuesta a las sustancias de prueba, proporcional a la señal de Ca^{2+} intracelular.

5 La presente invención también se refiere a un método de screening o cribado de moduladores de enzimas (en adelante el método tercero de la invención) que comprende:

- a. cultivar una célula o tejido que expresen una enzima acoplada a la liberación de Ca^{2+} intracelular;
- b. poner en contacto una célula o tejido con la proteína de fusión del primer aspecto de la invención con la secuencia nucleotídica que la comprende;

10 c. añadir a las células el cofactor CLZ,

d. estimular las células con una sustancia;

e. Estimular las células o el tejido con un activador conocido de la enzima.

f. determinar la emisión de la fotoproteína sensible al Ca^{2+} por las células o tejido;

15 g. Cuantificar la luminiscencia emitida en respuesta a las sustancias de prueba, proporcional a la señal de Ca^{2+} intracelular.

Uso del método segundo y del método tercero de la invención para la identificación de un antagonista de un receptor o un inhibidor de un enzima acoplados a la liberación de Ca^{2+} intracelular. El uso del método segundo de la invención permite identificar este tipo de antagonista mediante la determinación de la disminución de la emisión de la fotoproteína sensible al Ca^{2+} por la presencia de la sustancia que se evalúa.

20 El término “sustancia” se refiere a un compuesto del que se quiere determinar su actuación sobre receptores o enzimas implicados en la liberación de Ca^{2+} intracelular. En los métodos segundo y tercero de la invención, la luminiscencia emitida por la sustancia es proporcional a la señal de Ca^{2+} intracelular.

Preferiblemente, las células en el paso (a) tanto en el método segundo como en el tercero de la invención se sitúan en ausencia de luz. En el paso (f) la determinación de la emisión puede ser llevada a cabo por una cámara o
25 fotomultiplicador apropiado según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

En este método se miden las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} con la ayuda de líneas celulares recombinantes que expresen una de las fotoproteínas sensibles al Ca^{2+} con emisión roja descritas anteriormente. Para establecer la línea celular, se transfecta la fotoproteína sensible al Ca^{2+} de forma transitoria o se selecciona la línea celular recombinante que exprese la fotoproteína. Además, estas líneas expresan de manera constitutiva un receptor o una
30 enzima para los que se desea encontrar un activador o inhibidor farmacológico. Alternativamente, el receptor o enzima se puede expresar en la línea celular mediante transfección.

Los métodos segundo y tercero de la invención se pueden miniaturizar y automatizar para la selección de alto rendimiento (HTS) o ultra-alto rendimiento (uHTS) de activadores e inhibidores de estos receptores o enzimas. Dado que el acoplamiento entre receptor y el aumento de la señal de Ca^{2+} intracelular es rápido, el método proporciona
35 una lectura óptica en segundos o minutos tras la adición de modulador de los citados receptores o enzimas.

Los compuestos de prueba son preferiblemente compuestos químicos que tienen un peso molecular generalmente de 100 a 1000. Estos compuestos incluyen péptidos, proteínas, sustancias naturales o sus extractos. Esta lista es sólo a modo de ejemplo. Un ejemplo de un receptor que puede usarse es el receptor muscarínico, que en ciertos tipos celulares causa aumentos del Ca^{2+} intracelular. En las figuras 3 y 9, en las que se utiliza el agonista muscarínico carbacol en células HEK (derivadas de riñón humano embrionario), se observa aumento de
40 luminiscencia causado por el incremento del Ca^{2+} intracelular. Otro receptor que señala a través de Ca^{2+} es el receptor de histamina tipo H2, como por ejemplo en las figuras 6 y 7 en células HeLa (derivadas de un cáncer cervical humano). Otro ejemplo es el receptor adrenérgico alfa-1 que, tras una activación, induce un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos receptores se denominan “receptores acoplados a proteínas G” (GPCR) y
45 son proteínas integrales de membrana que transducen la acción de una hormona presente en el medio extracelular al interior de la célula. Su acoplamiento a diversas proteínas G da como resultado liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, y un incremento en el Ca^{2+} citoplásmico y de algunos orgánulos celulares, como la mitocondria.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un kit que comprende al menos una proteína de fusión descrita en la presente invención, una composición que contiene dicha proteína según se ha descrito anteriormente,
50 o al menos una secuencia nucleotídica recombinante según se ha descrito anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit descrito anteriormente, para la detección y/o cuantificación *in vitro* de niveles de calcio en una célula, en un tejido o en un modelo animal.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

- 5 Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

- 10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 **FIG. 1.** Esquema de las diferentes configuraciones de enlace entre el extremo C terminal de tdTomato (residuos de aminoácidos en negrita a la izquierda) y el N terminal de apoaequorina (residuos en negrita a la derecha), a partir de la fusión tdTA (secuencia de referencia). Los aminoácidos se designan por el código de una letra y las variantes se alinean de acuerdo a su secuencia aminoacídica. El dipéptido central SG se conserva en la mayoría de las fusiones. Una línea horizontal sobre la secuencia de tdTA indica sitios mutagénicos importantes en la generación de las variantes (véase Materiales y Métodos). Dos variantes (a1 y b12) consisten en la inserción de secuencia adicional en el dipéptido SG de tdTA.

- 20 **FIG. 2.** Espectros de emisión bioluminiscente de cuatro sensores basados en Aeq representativos. Se obtuvo proteína híbrida a partir de lisados de células de mamífero en cultivo (ADiF) o a partir de cultivos de *E. coli* y purificación por columna de afinidad (CitA, tdTA, AD1). La Aeq se reconstituyó con CLZ-f. Los espectros se normalizaron de forma que la suma de los dos picos fuera igual a la unidad. En el cuadro se indica el valor del pico de emisión del dador (Aeq) y aceptor de BRET y la anchura a media altura (AMA, no aplicable a tdTA), todos ellos expresados en nm. La línea discontinua vertical resalta la luz emitida por encima de 600 nm, importante para la detección de imágenes de calcio en animales.

- 25 **FIG. 3.** Curso temporal de la bioluminiscencia en células HEK que expresan cada uno de los cinco sensores de Ca^{2+} indicados (experimentos representativos). La Aeq se reconstituyó con CLZ-f. Se inició la adquisición de imágenes (3s por imagen) y las células se estimularon con carbacol (50 μM). Al final de cada experimento se permeabilizó la membrana celular con digitonina 30 μM para liberar las cuentas totales de Aeq. La intensidad de la emisión, convertida a L/Lmax, se representa en los ejes Y de la izquierda (la escala cambia según la variante), mientras que en los ejes Y de la derecha se muestra el porcentaje de Aeq restante en función del tiempo (la velocidad del consumo de Aeq).

- 30 **FIG. 4.** Sensibilidad al Ca^{2+} de los diferentes sensores durante la respuesta fisiológica de células vivas. Células HEK que expresaban cada proteína quimérica, e incubadas con CLZ-f, se expusieron a carbacol 50 μM y, al final de cada experimento, a digitonina 30 μM para obtener la luminiscencia total, como se indica en la Fig. 3. El valor de L/Lmax asignado a carbacol y digitonina en células individuales corresponde al pico de la primera respuesta de Ca^{2+} a estos estímulos y se muestra como su logaritmo decimal. El valor numérico a la derecha de los símbolos es el promedio de cada variante. Se muestran resultados de 3 a 6 experimentos en días diferentes para cada variante.

- 35 **FIG. 5.** Calibración de Ca^{2+} de las variantes CitA, tdTA y AD1 obtenida en proteína recombinante (expresada en *E. coli*) y purificada. Las muestras de proteína se incubaron con CLZ-nativa o CLZ-f para reconstituir la Aeq. Se muestra la relación entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ obtenida mediante tampones de Ca^{2+} y L/Lmax (gráfico log-log). La intersección de la línea punteada vertical con el eje X corresponde a los valores promedio de L/Lmax obtenidos en la estimulación de células HEK con carbacol descrita en la Figura 4.

- 40 **FIG. 6.** Curso temporal de la bioluminiscencia en las mitocondrias (A, B), o citoplasma y núcleo (C, D) durante la estimulación de las células con histamina (experimentos representativos). Células HeLa que expresaban las variantes indicadas se preincubaron con CLZ-f para reconstituir la Aeq. Las imágenes de bioluminiscencia se registraron con una exposición de 2 segundos por cada imagen. Las células se estimularon primero con histamina 100 μM y más tarde con digitonina 30 μM , durante el tiempo indicado por barras horizontales debajo de “Histamina” y “Digitonina”. No se utilizó ningún filtro de emisión. Se muestra la bioluminiscencia expresada como L/Lmax (eje Y izquierdo), junto con la correspondiente tasa de consumo de Aeq (eje derecho). Para cada sensor, se muestran imágenes de la fluorescencia (FL, tomadas justo antes de comenzar el experimento), y bioluminiscencia (BL, durante el pico de la respuesta de Ca^{2+}). Las regiones de interés utilizadas para el análisis se indican por líneas discontinuas en la imagen de bioluminiscencia. La barra de la escala microscópica representa 30 μm .

FIG. 7. Medición de Ca^{2+} citoplasmático y mitocondrial en las mismas células en experimentos de imagen en dos colores. Se muestran células HeLa que co-expresan GAQ (emisión fluorescente verde, expresión en citoplasma y

núcleo, imagen superior izquierda) y mitoADNQ (emisión fluorescente roja, expresión en mitocondria, imagen superior derecha). Se reconstituyó la Aeq con CLZ-f. Las imágenes de bioluminiscencia se adquirieron con 2 s de exposición por canal, alternando los filtros de emisión de 535/52 nm (canal verde) y 570LP (canal rojo). Las células se expusieron a histamina 100 μ M y más tarde a digitonina 30 μ M para liberar las cuentas totales de Aeq. Se realizó una separación espectral de las señales antes de la conversión a L/Lmax. Se muestra la bioluminiscencia (L/Lmax, eje Y izquierdo), junto con la correspondiente tasa de consumo de Aeq (eje Y derecho) para cada compartimento celular. Se muestran imágenes de bioluminiscencia durante el pico de la respuesta de Ca^{2+} de mitoADNQ (Mit, mitocondrias, imagen izquierda) y GAQ (Cyt, citoplasma/núcleo, imagen derecha) con las regiones de interés utilizadas para el análisis. La barra de la escala microscópica representa 20 μ m.

FIG. 8. Oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en células HEK individuales que expresan AD1 de forma transitoria. Las células fueron preincubadas con CLZ-hcp durante 3 horas y el tiempo de integración fue de 4 s por cada imagen. En la parte inferior se muestra una imagen de fluorescencia (FL) seguida de tres imágenes de bioluminiscencia (BL) tomadas durante el nivel más alto de la señal de tres células representativas del campo microscópico (regiones de interés, ROI-1, 2 y 3). Los gráficos muestran el curso temporal de la intensidad de bioluminiscencia (en unidades relativas, RU) que corresponden a la actividad espontánea de Ca^{2+} de las células seleccionadas. La barra de la escala microscópica representa 20 μ m. ROI, región de interés.

FIG. 9. Curso temporal de la bioluminiscencia en células HEK que expresan transitoriamente ADNQ, y preincubadas con CLZ-hcp (experimentos representativos). La adquisición de imágenes se realizó con 2 s (A) o 220 ms (B y C) de exposición por imagen. Las células se estimularon con carbacol (50 μ M, A; o 10 μ M, B y C), según se indica por barras horizontales. Al final de cada experimento se permeabilizó la membrana celular con digitonina 30 μ M. No se presenta todo el curso del tiempo para mayor claridad, se insertó una línea discontinua para indicar una interrupción. La intensidad de la emisión (L/Lmax) se representa en los ejes Y de la izquierda, mientras que en los ejes Y de la derecha se muestra el porcentaje de Aeq restante en función del tiempo. La barra de la escala microscópica en la imagen superior izquierda representa 20 μ m.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES DERIVADAS DE tdTA CON ESPACIADORES DIFERENTES Y MUTAGÉNESIS PUNTUAL

Las variantes con diferentes configuraciones de enlace entre tdTomato y apoeaquerina se construyeron sobre la base de tdTA en el vector de expresión pcDNA3 (*Invitrogen*), desarrollado anteriormente (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520) (SEQ ID NO: 62: para la secuencia de nucleótidos de TdTA y SEQ ID NO: 63: para la secuencia de aminoácidos de TdTA). De N- a C-terminal, tdTA está formado por tdTomato, un péptido espaciador de 20 aminoácidos, y apoeaquerina (Figura 1). Se introdujo un sitio único de restricción Kpn2I, que codifica para el dipéptido SG (notación de aminoácidos de una sola letra, subrayado en la Figura 1), entre el espaciador y apoeaquerina. La extensión del espaciador entre tdTomato y apoeaquerina, ya sea en tdTA o en ADiF, se llevó a cabo mediante la inserción de un ADN de doble cadena en la secuencia del sitio de restricción Kpn2I. Los oligonucleótidos complementarios que codifican el espaciador se mezclaron en cantidades iguales y se incubaron a 65°C durante 10 minutos, la mezcla luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Dado que el espaciador contenía aminoácidos repetidos, se utilizaron diferentes codones para evitar la hibridación errónea. Los oligonucleótidos hibridados tenían extensiones solapantes como si hubieran sido tratados por Kpn2I (Tabla 1). Los plásmidos que codifican tdTA o ADiF se trataron con Kpn2I y se ligaron con los oligonucleótidos hibridados respectivos (22aa-L, L-13aa y 6aa L-) para generar las variantes de espaciador largo b12, a1 y ADiFL.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de variantes con enlazadores diferentes y para la inserción de mutaciones puntuales. La tabla se divide en sentido horizontal en tres secciones (líneas discontinuas). La primera detalla la composición de oligonucleótidos usados para construir las diferentes variantes de péptido enlazador. En la sección siguiente se enumeran los oligonucleótidos mutagénicos utilizados para convertir los aminoácidos en la región de unión de tdTA por SG, o por un solo aminoácido D o L. Algunos cambios de aminoácidos requirieron dos rondas de mutagénesis; se indica primera o segunda ronda. La última sección muestra los oligonucleótidos mutagénicos utilizados para insertar mutaciones puntuales en apoeaquerina o para eliminar un sitio de restricción *HindIII*, como paso intermedio en la clonación de las variantes de expresión mitocondrial. Todos los oligonucleótidos mutagénicos llevan un grupo fosfato (P) en su extremo 5' como modificación post-síntesis. La secuencia de ADN se detalla siempre en orientación 5'→3'. Corresponden a las SEQ ID 43 a SEQ ID: 61.

Nombre y descripción	Secuencia de ADN de oligonucleótidos
22aa-L-1 , oligonucleótido sentido de un enlazador de 22 aminoácidos para generar el clon <i>b12</i>	5'- CCGGGGTGGCAGTGGAAAGTGGTCAAAGTGGTTCCG GTAGTGGAGGCCAGAGTGGTAGTGGAAGTGGCCAAT CC
22aa-L-2 , oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 22 aminoácidos para generar el clon <i>b12</i>	5'- CCGGGGATTGGCCACTTCCACTACCACTCTGGCCT CCACTACCGGAACCACTTTGACCACTTCCACTGCCA C
13aa-L-1 , oligonucleótido sentido de un enlazador de 13 aminoácidos para construir el clon <i>a1</i>	5'- CCGGGGTAGTGGAGGCCAGAGTGGTAGTGGAAGT GGCCAATCC
13aa-L-2 , oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 13 aminoácidos para construir el clon <i>a1</i>	5'- CCGGGGATTGGCCACTTCCACTACCACTCTGGCCT CCACTACC
6aa-L-1 , oligonucleótido sentido de un enlazador de 6 aminoácidos para generar el clon <i>ADiFL</i>	5'- CCGGCGGCAGCGGTAGCT
6aa-L-2 , oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 6 aminoácidos para generar el clon <i>ADiFL</i>	5'- CCGGAGCTACCGCTGCCG
YG-SG , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar clones <i>A3</i> , <i>AW</i> , <i>AE</i> , <i>AD1</i> , <i>Alfa</i>	(P)5'- CTGTTCCCTGTCCGGAATGGACGAGCTGTAC
LF-SG-1 , oligonucleótido mutagénico en sentido y fosforilado para construir clones <i>B2</i> y <i>BW</i> (1ª ronda de mutagénesis)	(P)5'- CCGCCACCACTTGGGCCTGTACGGCATGGACG
LF-SG-2 , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para construir clones <i>B2</i> y <i>BW</i> (2ª ronda de mutagénesis)	(P)5'- CCGCCACCACTCCGGACTGTACGGCATGGACG
DN-SG-1 , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar clones <i>A3</i> y <i>B2</i> (1ª ronda de mutagénesis)	(P)5'- CTTACATCAGACTTCGCCAGACCAAGATGGATTGGAC G
DN-SG-2 , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar clones <i>A3</i> y <i>B2</i> (2ª ronda de mutagénesis)	(P)5'- TACATCAGACTTCTCCGGACCAAGATGGATTGGAC
SD-SG , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para construir el clon <i>AD1</i>	(P)5'- GATCTGTCAAACCTTACATCCGGATTGACAACCCAAG ATG

SV-SG , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para construir el clon <i>AE</i>	(P)5'- CAGTCCGGACTCAGATCCGGAAACTTACATCAGACT TCG
G-D , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para construir el clon <i>Alfa</i>	(P)5'- CCACCTGTTCTGTCCGACTTCGACAACCCAAGATGG
F224L , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar el clon <i>Alfa</i>	(P)5'- GAGGGCCGCCACCACCTGCTGCTGTCCGGATTTCGAC AAC
N26D , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar el clon <i>ADN</i> y <i>ADNQ</i>	(P)5'- GTTCAATTTCTTGATGTGCGACCACAATGGAAAAATCT CTCTTGACG
Y82F , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar el clon <i>ADiF</i> y <i>ADiFL</i>	(P)5'- GTGGAAACTGATTGGCCTGCATTTATTGAAGGATGGA AAAAATTG
Q168R , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para generar el clon <i>ADQ</i> y <i>ADNQ</i>	(P)5'- GATGTTGATGAGATGACAAGACGACATCTGGGATTTT GGTACACC
HIII-out , oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado para la eliminación del 1er sitio <i>HindIII</i> en <i>mitotdTA</i>	(P)5'- CTATAGGGAGACCCAAGCTAGGTACCGAGCTCG

Las variantes de espaciador corto derivadas de tdTA (A3, B2, AW, BW, AE y AD1) se obtuvieron por mutagénesis dirigida, mediante la conversión de los pares de aminoácidos deseados (marcados por una línea encima de la secuencia de tdTA en la Figura 1) a un dipéptido SG flexible. Los codones que codifican SG contienen el sitio de restricción Kpn2I. Una vez se introdujeron estos dos codones en la secuencia de tdTomato y apoaquorina, se hicieron los diferentes clones por digestión enzimática de los plásmidos con Kpn2I, eliminación de los fragmentos pequeños por la purificación del ADN plasmídico, y religación. Esto permitió la generación de clones en los cuales el extremo C-terminal de tdTomato se redujo hasta el residuo H465 o L468 de tdTomato, y clones cuya apoaquorina N-terminal se inició con el aminoácido K2, F7 o P10 (Figura 1). La construcción del vector de expresión bacteriano para CitA, tdTA y AD1 se logró mediante digestión doble (*HindIII* y *XhoI*) de sus genes correspondientes en pcDNA3 y subclonación en el plásmido pTriEx-4 (*Novagen*).

El dipéptido espaciador SG de la variante AD1 se cambió a SD (residuos 5 y 6 de apoaquorina) por mutagénesis dirigida utilizando el oligonucleótido GD para formar la variante llamada Alfa. A su vez, se utilizó el oligonucleótido F224L para convertir la Phe 467 de tdTomato de AD1 en Leu, para generar la variante Beta (Figura 1). Las mutaciones puntuales N26D, Y82F y Q168R de apoaquorina [6,7,24] se introdujeron en la variante AD1 (Q168R en GA para la variante GAQ) con el mismo método. Todos los oligonucleótidos (Tabla 4) se sintetizaron por *Fisher Scientific*.

La construcción de mitoADNQ y mitoAD1 se derivó de mito-tdTA (donado amablemente por la Dra. María Teresa Alonso, IBGM, Valladolid). El péptido señal mitocondrial en mito-tdTA está flanqueado con dos sitios de restricción *HindIII*. Se eliminó el primero de ellos por mutagénesis dirigida utilizando el oligonucleótido HIII-out (Tabla 4). El clon mutado fue digerido con *HindIII/XhoI* para liberar tdTA. ADNQ y AD1 fueron igualmente cortadas y se insertaron en lugar de tdTA para generar mitoADNQ y mitoAD1, respectivamente. Las enzimas de restricción utilizadas (*Kpn2I*, *HindIII* y *XhoI*) y la T4 ADN ligasa fueron de *Fermentas* y el kit de mutagénesis de sitios múltiples fue de *Stratagene*. La digestión con enzimas de restricción, ligación y mutagénesis de ADN fueron todos de acuerdo con los protocolos del fabricante. Todos los clones fueron verificados por secuenciación del ADN (*Macrogen*).

CULTIVO CELULAR, TRANSFECCIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE AEQ

Las células HEK-293 se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM)-alfa (Lonza), complementado con 4 mM L-glutamina (Lonza). Las células HeLa se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Lonza) suplementado con 2 mM L-glutamina. Ambos medios fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza). Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada, a 37°C y

CO₂ al 5%. Ambas líneas celulares se sembraron a una densidad de 6×10^5 células/cm², y se transfectaron el día después de la siembra con Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Antes de cada experimento, las células que expresan la construcción deseada se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y la Aeq se reconstituyó con 3 µM de CLZ-*nativa*, CLZ-*f*, o CLZ-*hcp* (todas de *Biotium*), o con CLZ-*h* (*Invitrogen*). La incubación de células con CLZ se hizo en medio OptiMEM I (Gibco) suplementado con FBS al 1% durante 2-3 horas a 37°C y CO₂ al 5%, en la oscuridad. Para los experimentos de imagen de bioluminiscencia mitocondrial y de doble color, la Aeq se reconstituyó con 6 µM CLZ-*f* durante 3 horas a temperatura ambiente para minimizar el consumo de la Aeq mitocondrial durante la reconstitución.

PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES PARA LA EVALUACIÓN ESPECTRAL DE LAS QUIMERAS Y WESTERN BLOT

Un día después de la transfección, las células HeLa ($2-3 \times 10^6$ células) que expresan transitoriamente las diferentes quimeras se colocaron en hielo, se enjuagaron dos veces con un medio salino tamponado con fosfato (PBS) y se recogieron con un raspador de células. En las preparaciones destinadas a medidas espectrales, las células se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos y luego se resuspendieron en un tampón de reconstitución frío (PBS con 10 mM de ditiotreitól (DTT), 5 mM de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) y 5 µM de CLZ-*f*). Las células suspendidas se incubaron durante 3 horas a 4°C en la oscuridad para reconstituir la Aeq. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron con un tampón hipoosmótico que contiene 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EGTA, 5 mM DTT, y un cóctel de inhibidores de proteasa (complete-Mini, libre de EDTA, *Roche*). Las membranas de las células se rompieron por dos ciclos de congelación-descongelación, seguido por paso a través de una aguja de calibre 25 (cuatro veces). Las muestras de lisado obtenidas se centrifugaron a 13,000xg durante 1 minuto. El sobrenadante que contiene la Aeq activa se recuperó y se almacenó a -20°C para su uso posterior en la caracterización espectroscópica.

WESTERN BLOT

Las células HeLa transfectadas destinadas a Western blot se lisaron y se procesaron como se ha indicado anteriormente, pero sin la etapa de la reconstitución de Aeq. El contenido de proteína en el sobrenadante se estimó por un ensayo de proteína BCA (*Pierce Thermo Scientific*). Las proteínas en la muestra (40 µg) se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (10%). Las bandas de proteínas se transfirieron a una membrana Hybond-P (*Amersham Biosciences*). Después de bloquear con BSA al 3%, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C, ya sea con el anti-GFP de ratón (1:2000) (*Covance*) o anti-DsRed de ratón (1:500) (*BD Pharmingen*). Las membranas se lavaron y se incubaron con una inmunoglobulina-G de oveja anti-ratón, conjugada a la peroxidasa de rábano (1:1000) (*Santa Cruz*) a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se utilizó como sustrato de la peroxidasa la solución de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura (*Thermo Scientific Pierce*) y la detección se llevó a cabo con el equipo FUJIFILM LAS-3000. Los experimentos se realizaron por lo menos dos veces para cada muestra. El estándar de peso molecular fue de *BioRad* (*Precision Plus Protein Standard Dual Color*).

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN E. COLI Y PURIFICACIÓN

La expresión de proteína recombinante etiquetada por poly-His (tdTA, AD1 y CitA) en *E. coli* se llevó a cabo utilizando el plásmido pTriEx-4 (*Novagen*). Sólo fueron introducidas pequeñas modificaciones en el protocolo detallado en Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520. Después de la sonicación, la eficiencia de extracción de proteínas se incrementó mediante el uso de cinco ciclos de congelación-descongelación. Los lisados celulares se centrifugaron para eliminar los desechos celulares. Las proteínas etiquetadas por poly-His en el sobrenadante se purificaron en una columna de acuerdo con el protocolo del fabricante (Resina de Ni-NTA HisBind; *Novagen*). El intercambio del tampón fue mediante el uso de filtros de corte de peso molecular de 30 kDa (CitA) o 50 kDa (tdTA y AD1) (AmiconUltra MWCO 30K o 50K, *Millipore*). Un ml de la muestra de proteína purificada se concentró en 50 µl de volumen y se resuspendió en 1 ml del tampón deseado; este paso se repitió 3 a 4 veces. La cuantificación de proteínas en las muestras purificadas se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop midiendo la absorbancia a 280 nm, o a la longitud de onda correspondiente al pico del coeficiente de extinción de la FP en la quimera (516 nm para CitA, y 554 nm para tdTA y AD1). Las muestras puras se almacenaron a 4°C.

Electroforesis en gel nativo

La integridad de las proteínas purificadas se ensayó en un gel de poliacrilamida (6%) no desnaturalizante. El gel nativo fue primero visualizado por fluorescencia. Las bandas que contienen Citrina se revelaron mediante la exposición del gel a 490 nm de luz monocromática, mientras que tdTomato fue excitado a 540 nm. Se colocaron filtros de emisión (de color amarillo para CitA; rojo para el tdTA y AD1) delante del objetivo de una cámara digital (Sony, DSC-S500). A continuación, el gel fue teñido con Coomassie para revelar todas las bandas de proteína (FUJIFILM LAS-3000).

EVALUACIÓN DE LAS VARIANTES DE FUSIÓN *IN VITRO*

Se intercambió el tampón de las muestras purificadas que contienen apoeaquerina a 50 mM Tris-HCl y NaCl 150 mM (pH 7,5). La Aeq se reconstituyó *in vitro* mediante la adición de 5 μ M CLZ-*f* o CLZ-*nativa*, DTT 10 mM y EGTA 5 mM, y se incubaron durante la noche a 4 ° C, en la oscuridad.

5 Espectros de transferencia de energía resonante

Las medidas espectrales de las variantes de tdTA se realizaron en el laboratorio del Dr. Philippe Brûlet (CNRS, Gif-sur-Yvette, Francia). Una alícuota de cada variante de proteína recombinante purificada o lisado celular se pone en contacto con una solución de Ca^{2+} saturante (50 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl_2 , pH 7,5) en un tubo de PCR claro para inducir la emisión total de luz. Los fotones emitidos fueron recogidos por una fibra óptica hasta un espectrómetro (SPECIM) y capturados por una cámara EM-CCD (Andor Technologies). La calibración espectral se hizo con punteros láser de 405 y 650 nm. Esta configuración permite el análisis espectral inmediato y sincrónico de la luminiscencia emitida a todas las longitudes de onda (sin barrido).

Curvas de sensibilidad al Ca^{2+}

Las muestras purificadas, reconstituidas con CLZ-*f* o CLZ-*nativa*, se lavaron y se intercambió el tampón a otro con cero Ca^{2+} (10 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM K_2EGTA , pH 7,2), asegurando una mínima contaminación con Ca^{2+} . En este punto las muestras pueden ser almacenadas a 4°C en la oscuridad. Justo antes del experimento, la concentración de K_2EGTA en las muestras de proteína se diluyó a 1 mM en una solución de 10 mM MOPS (pH 7,2), 100 mM KCl. Una alícuota de 10 μ l de muestra de proteína (rango de concentración de 30 a 50 ng/ μ l) se colocó en un tubo de luminómetro (Sirius, Berthold Detection Systems) y se mezcló con 400 μ l de una solución que contiene la concentración deseada de Ca^{2+} libre. Las soluciones tamponadas con EGTA de mayor o menor concentración de Ca^{2+} libre fueron de Molecular Probes, Invitrogen. Esta concentración se calculó considerando el EGTA presente en la muestra de proteína, la K_d de CaEGTA , el pH y la temperatura. La emisión de luminiscencia se midió durante 20 s (ruido basal) antes de la inyección de la solución con Ca^{2+} libre conocido. Se continuó la adquisición hasta que se obtuvo una señal estable o con decaimiento. En este punto, se inyectó un volumen de 500 μ l de una solución saturante de Ca^{2+} (MOPS 10 mM, 50 mM CaCl_2 , pH 7,2) y la integración de la luz continuó hasta que se había consumido toda la Aeq y la intensidad de la luz alcanzó el nivel basal. La intensidad de luminiscencia (L) a diferentes $[\text{Ca}^{2+}]$ se tomó como el valor de pico de la respuesta en el caso de la señal con decaimiento, o como el valor estable, en caso de emisión estable. El máximo de luminiscencia (L_{max}) se midió mediante la integración de todas las cuentas restantes desde ese momento (valor L) hasta el final del experimento. Los valores de K_d se extrajeron a partir de una relación de ajuste dosis-respuesta sigmoidal (de pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism4.

Capacidad luminiscente *in vitro*

Se intercambió el tampón de las muestras purificadas y reconstituidas (CLZ-*f*) a 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 5 mM EGTA (pH 7,5), para eliminar el DTT y especialmente cualquier resto de CLZ. Las alícuotas de las muestras de proteína pura (CitA, tdTA, y AD1) con igual cantidad de proteína (40 ng) se mezclaron con 500 μ l de una solución saturante de Ca^{2+} (50 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl_2 , pH 7,5). La capacidad luminiscente de la variante de FP-Aeq se midió mediante la integración de toda la luz emitida durante el experimento con un luminómetro (Sirius, Berthold Detection Systems).

Obtención de imágenes de microscopía

La preparación de los cultivos de células y la instalación de microscopía utilizados en este estudio se presentaron en detalle en nuestro trabajo anterior (Bakayan A., et al. PLoS One 2011; 6: e19520). En resumen, las imágenes de fluorescencia de células HEK o HeLa que expresan las variantes de Aeq fusionadas con GFP o tdTomato fueron tomadas usando dos canales, verde y rojo. Las imágenes de fluorescencia de las células cargadas con el indicador sintético de Ca^{2+} Fluo3 (Molecular Probes) se realizaron con una excitación a 500 nm y el cubo de filtros Brightline Filtercube HC-YFP (Semrock). Éste está compuesto de los filtros HC500/24 nm (excitación), dicróico de 520 nm, y HC542/27 nm (emisión) (longitud de onda central/ancho de banda). La adquisición de imágenes y la velocidad de fotogramas se especifican en los resultados. Las células se montan en una cámara de microscopía y se superfunden con soluciones de carbacol (Sigma), histamina (Sigma) y digitonina (Sigma) en HBSS, como se indica en las figuras. Las imágenes de bioluminiscencia se tomaron en la oscuridad. La emisión de luz de las células fue recogida por un objetivo, pasó a través de filtros de emisión definidos (o sin filtro, según se indique) previamente montados en una rueda de filtros, y fue capturada por una cámara EM-CCD (Hamamatsu) (Bakayan A., et al. PLoS One 2011; 6: e19520).

Imagen en dos canales de emisión

El registro de imágenes de bioluminiscencia de doble color del Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial se realizó de forma secuencial mediante el uso de dos canales de emisión, verde (filtro de paso de banda de 535/52 nm) y rojo (filtro 570LP), colocados entre un objetivo de inmersión en aceite 63x y la cámara EM-CCD. Las señales de bioluminiscencia se adquirieron durante 2 s por canal, con un intervalo de tiempo total de 4,1 s por fotograma (para los dos canales). La cámara se fijó en el modo de imagen de fotón-2, máxima ganancia y *binning* 4x4 (128x128 píxeles por campo microscópico). Se realizó una corrección de la emisión espectral de GAQ y mitoADNQ a los canales no deseados (rojo y verde, respectivamente) con *Microsoft Excel*, utilizando el porcentaje de la contribución de cada una de estas variantes (expresada aisladamente) a estos canales.

10 CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE FUSIÓN EN CÉLULAS VIVAS INDIVIDUALES

Medición de la transferencia de energía utilizando el método de cuatro canales

La evaluación de la transferencia de energía de las diferentes variantes se llevó a cabo en células HeLa (o células HEK donde se indica) individuales, utilizando el método de cuatro canales. Una descripción detallada de este enfoque, junto con su validación cuantitativa, fue presentada previamente en (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520). En resumen, las señales de la bioluminiscencia fueron registradas, de forma secuencial, a través de cuatro filtros de paso de banda en una rueda de filtros: 481/34, 535/52, 595/40 y 640/50 nm (longitud de onda central/ancho de banda). Se cuantificó el porcentaje de la contribución de la luz emitida de cada variante a través de estos canales en células individuales. Todos los recuentos fueron corregidos por la señal ruido basal, normalizados por el ancho de banda y transmitancia de cada filtro, y por la sensibilidad espectral de la cámara EM-CCD.

20 Evaluación de la sensibilidad de las variantes a Ca^{2+} en células individuales

Células HEK que expresan transitoriamente diferentes variantes de FP-Aeq (24 horas después de la transfección) se incubaron con *CLZ-nativa*, *-f* o *-hcp* para la reconstitución de la Aeq, como se describió anteriormente. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se mantuvieron en HBSS para la captura de imágenes. Se perfundió una solución de carbacol (50 μM) como se indica en Figura 3. Al final de cada experimento, se calculó L_{max} al permeabilizar las células con digitonina 30 μM para permitir la entrada de Ca^{2+} extracelular y, por lo tanto, la obtención de la emisión de luz de la Aeq restante. La estimulación de las células HEK con carbacol eleva los niveles de Ca^{2+} citoplásmico a un valor relativamente reproducible (0,9-1 μM), en particular en el primer pico de Ca^{2+} . La comparación del valor de L/L_{max} en este pico y después de la saturación de la sonda (perfusión de digitonina) proporciona una estimación de la su sensibilidad al Ca^{2+} en células vivas.

30 RESULTADOS

Generación de nuevas variantes derivadas de tdTA con emisión roja

El péptido de 20 residuos fue sustituido por el dipéptido SG (en las variantes A3, B2, AW, BW, AE, AD1) o fue eliminado por completo (variante Alfa) (FIG. 1). En cambio, las variantes B12 y A1 fueron construidas con inserciones de 22 y 13 residuos de aminoácidos, respectivamente. La variante ADiFL tiene un enlazador 6 aminoácidos más largo que AD1 y se describirá más adelante. La secuencia YGMDELYK en el extremo de tdTomato, que se añadió originalmente para mejorar la estabilidad y facilitar la clonación de fusiones C terminales (Shaner N. C., *et al.* NatBiotechnol 2004; 22: 1567-1572), fue eliminada (Figura 1). Las variantes B2 y BW son como A3 y AW, respectivamente, pero carecen del tripéptido LFL en el extremo C terminal de tdTomato. Hay que señalar que la FP roja tdTomato tiene dos copias de Tomato enlazadas para que sea un dímero en tándem. Los cambios descritos se realizaron sólo en la secuencia del segundo Tomato. También se ensayaron delecciones en el extremo N de la secuencia de apoeaquerina (código P02592). Las combinaciones de las delecciones descritas se muestran en la Figura 1, las cuales fueron comprobadas mediante su secuencia de ADN y posteriormente caracterizadas.

Las construcciones de la Figura 1 en un vector de expresión de mamíferos se expresaron en células HeLa para examinar la viabilidad celular y la fluorescencia roja de la fracción tdTomato por microscopía. El clon de partida tdTA (SEQ ID NO: 63) y las variantes b12(SEQ ID NO: 6), a1 (SEQ ID NO: 8), A3(SEQ ID NO: 10), B2(SEQ ID NO: 12), AW(SEQ ID NO: 14), BW(SEQ ID NO: 16), AE(SEQ ID NO: 18), AD1(SEQ ID NO: 20), Alfa(SEQ ID NO: 22), Beta(SEQ ID NO: 24) y ADiFL(SEQ ID NO: 26) mostraron tinción citoplásmica difusa en células vivas transfectadas con los plásmidos de expresión. Por otra parte, se observaron agregados fluorescentes con las variantes B2 y AE. Esta última mostró baja tasa de supervivencia de las células que la expresan, lo que es una señal de su citotoxicidad. En cuanto a la bioluminiscencia, todas las variantes, excepto A3 y B2, emitieron luz cuando se añadió digitonina a las células para elevar los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos. La eliminación del tripéptido FDN en el extremo N-terminal de apoeaquerina (en las variantes A3 y B2) fue perjudicial y abolió por completo la bioluminiscencia. Así, al menos en el contexto de estas fusiones con tdTomato, el tripéptido FDN (o parte de éste) es esencial para la luminiscencia de Aeq.

La integridad de la proteína quimérica AD1 fue verificada por Western blot de extractos citosólicos de células HeLa transfectadas con la misma. Se observó una banda inmunorreactiva única de la masa molecular esperada frente a anticuerpos anti-DsRed (la proteína precursora de tdTomato).

Efecto del enlace entre tdTA y apoeaequorina sobre la transferencia de energía

Se caracterizaron las variantes descritas en la Figura 1 por la eficiencia BRET. Las células HeLa fueron transfectadas con las quimeras y se incubaron con CLZ-f para la reconstitución de Aeq. La incubación con el cofactor CLZ es esencial para la formación de Aeq capaz de emitir fotones en respuesta a la unión del Ca^{2+} . Esta CLZ ofrece una buena combinación, al presentar emisión ligeramente desplazada hacia el rojo, y una intensidad relativa y tiempo de regeneración moderados. La bioluminiscencia se inició en las células mediante la adición de digitonina, que hace permeable la membrana celular al Ca^{2+} extracelular, y se alternaron filtros de emisión centrados en 481, 535, 595 y 640 nm de forma secuencial cada 2 s. Anteriormente hemos demostrado que este enfoque de cuatro filtros permite la caracterización espectral de las proteínas quiméricas en células vivas de mamífero (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520).

La Tabla 2 muestra el porcentaje de la luz emitida que pasa a través de estos filtros. Se incluyen en la Tabla 2 la Aeq, y las fusiones previamente caracterizadas, GA (fusión GFP-Aeq) y tdTA (Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520) para poder compararlas con las variantes nuevas objeto de esta invención. Mientras que Aeq emite más luz en el filtro de 481 nm, GA presentó un pico de emisión a 535 nm, lo que indica BRET muy fuerte entre Aeq y GFP. El punto de partida de todas las variantes, tdTA, muestra dos picos, uno a 481 nm (luz emitida directamente por Aeq) y otro a 595 nm (por transferencia de energía a tdTomato). De la luminiscencia total de tdTA a través de estos cuatro filtros, el 58% correspondió a los de 481 y 535 nm (filtros azul y verde, B+G) y el 42% a 595 y 640 nm (filtros naranja y rojo, O+R) (véase las dos columnas de la derecha de la Tabla 2). Los espectros completos de CitA y tdTA también se obtuvieron en muestras de proteína purificada (FIG. 2).

La variante AW, que consiste en la eliminación del péptido YGMDELYK en el extremo C terminal de tdTomato más la sustitución del enlazador presente en tdTA por el dipéptido SG (Figura 1), dio lugar a una transferencia de energía mayor que tdTA (51% del recuento en B+G y 49% en O+R). Sin embargo, un mayor acortamiento de la secuencia de tdTomato fue perjudicial para BRET, ya que la variante BW, con la delección añadida del tripéptido LFL, mostró sólo el 26% del recuento en los canales O+R. Manteniendo constante la supresión presente en la variante AW, se examinó el efecto de acortar el extremo N de apoeaequorina por cuatro (variante AE) o nueve residuos (variante AD1). En AE, no se observó ningún cambio espectral en comparación con AW. Por el contrario, AD1 dio lugar a un marcado desplazamiento hacia el rojo: el 23% de la luz pasó a través de los filtros B+G y el 77% se recogió en los filtros O+R. Un espectro completo de AD1 se obtuvo también en proteína recombinante (Figura 2).

Tabla 2: Caracterización de BRET en las diferentes variantes, según la distribución de la bioluminiscencia en cuatro filtros de emisión. El perfil de emisión de Aeq, GA, y tdTA se representa junto a ocho variantes del péptido de enlace (Figura 1). Se determinó el porcentaje de cuentas en cuatro canales para cada variante expresada en células HeLa individuales durante la respuesta de Ca^{2+} tras su permeabilización con digitonina. Los filtros de emisión fueron: 481/34, 535/52, 595/40 y 640/50 nm (longitud de onda central/ancho de banda) (véase Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520). Las cuentas en cada canal se normalizaron por el ancho de banda del filtro, por su transmitancia, y por la sensibilidad de la cámara EM-CCD y se dividieron por la suma de las cuentas en los cuatro canales. Se muestra el promedio de 8 a 38 células $\pm$ la desviación standard. Las dos columnas de la derecha muestran la suma del % de emisión en los canales 481 y 535 nm (B+G), y 595 y 640 nm (O+R).

Contribución de la señal de bioluminiscencia (% del total) en cada filtro de emisión

Par de BRET	481 nm (B)	535 nm (G)	595 nm (O)	640 nm (R)	B+G	O+R
Aeq	60.2 ± 2.1	29.2 ± 1.3	7.2 ± 1.9	3.4 ± 1.0	89.4	10.6
GA	16.2 ± 4.1	72.3 ± 2.5	9.4 ± 4.0	2.1 ± 1.1	88.5	11.5
tdTA	38.1 ± 2.5	20.0 ± 2.1	28.6 ± 2.6	13.3 ± 1.5	58.1	41.9
b12	44.6 ± 4.1	22.4 ± 2.2	22.3 ± 3.6	10.7 ± 2.7	67.0	33.0
a1	41.3 ± 5.1	21.1 ± 3.6	25.7 ± 4.0	11.9 ± 3.0	62.4	37.6
AW	33.0 ± 3.2	18.3 ± 1.6	32.3 ± 2.9	16.4 ± 1.6	51.3	48.7
BW	48.6 ± 3.5	25.8 ± 1.7	17.4 ± 3.0	8.2 ± 1.5	74.4	25.6
AE	33.3 ± 2.2	19.0 ± 1.6	32.2 ± 1.4	15.5 ± 1.9	52.3	47.7
Alfa	26.0 ± 2.6	9.0 ± 1.2	45.7 ± 2.1	19.3 ± 1.8	35.0	65.0
Beta	13.8 ± 3.6	11.7 ± 1.7	50.0 ± 1.0	24.5 ± 3.6	25.5	74.5
AD1	12.6 ± 2.4	10.0 ± 1.6	50.8 ± 3.2	26.6 ± 1.3	22.6	77.4

B, azul; G, verde; O, naranja; y R, rojo.

Se construyeron también otras quimeras: la variante denominada Alfa se llevó a cabo para convertir el dipéptido conector SG de la variante AD1 en la secuencia SD presente en el N-terminal de apoeaquerina, mientras que en la variante Beta se convierte la secuencia LFL del extremo C terminal de Tomato en LLL. Ambas variantes, que son exactamente de la misma longitud que AD1, resultaron en un alto porcentaje de BRET y un desplazamiento hacia el rojo, en comparación con tdTA, pero no fue mejor que en AD1. Hemos probado también a aumentar la longitud del péptido conector presente en tdTA (variantes a1 y b12, Figura 1). En ambos casos, hubo una cierta pérdida de BRET en comparación con tdTA (Tabla 2).

10 Mejora de las propiedades de la variante AD1 mediante mutagénesis dirigida

Aplicamos una mutación puntual Tyr 82 a Phe (Y82F) en la secuencia de apoeaquerina en tdTA y en las variantes de la Figura 1. El resultado fue una mejora en BRET por el aumento del solapamiento entre los espectros de emisión de Aeq y de absorción de tdTomato, un mecanismo que es independiente de la optimización del péptido conector descrito anteriormente.

15 En la Tabla 3 se muestra que la mutación puntual Y82F en tdTA (tdTAF) resultó en un 49% de la emisión en los canales O+R (un aumento del 7%), en células HeLa transfectadas con la quimera e incubadas con CLZ-f. La misma mutación Y82F aumentó un 10% la luminiscencia en los canales O+R en la variante AW (AWF) y un 5% en la variante AD1 (ADIF). Esta última fue la variante con el mayor corrimiento al rojo descubierta hasta ahora (con un 82% de la emisión en los canales O+R). Así, la Phe 82 en la secuencia de apoeaquerina de ADIF, desplazando el espectro de emisión de Aeq hacia el rojo, aumentó la transferencia de energía a tdTomato hasta casi un valor máximo. Por otra parte, la variante ADiFL, que es idéntica a ADIF (AD1 más Y82F), pero con el hexapéptido SGGSGG añadido al conector (Figura 1), presentó muchas menos cuentas en los canales O+R (66%).

25 **Tabla 3.** Caracterización de BRET en las variantes con mutaciones puntuales, según la distribución de la bioluminiscencia en cuatro filtros de emisión. Los datos se obtuvieron como se indica en la Tabla 2. *Los clones cuyo nombre incluye F, N y Q designan las mutaciones Y82F, N26D y Q168R en apoeaquerina, respectivamente. Cabe señalar que ADiFL contiene una inserción adicional en el enlace entre tdTomato y apoeaquerina, además de la mutación Y82F (Figura 1). Las fusiones GA, tdTA, AW y AD1 de la Tabla 2 se incluyen para facilitar la comparación con sus formas mutadas. Se muestra el promedio de 13 a 38 células ± la desviación standard. Las dos columnas de la derecha muestran la suma del % de emisión en los canales 481 y 535 nm (B+G), y 595 y 640 nm (O+R).

30

		Contribución de la señal de bioluminiscencia (% del total) en cada filtro de emisión					
Análogo CLZ	Par de BRET	481 nm (B)	535 nm (G)	595 nm (O)	640 nm (R)	B+G	O+R
-f	GA	16.2 ± 4.1	72.3 ± 2.5	9.4 ± 4.0	2.1 ± 1.1	88.5	11.5
	GAQ*	17.7 ± 3.0	71.0 ± 3.2	9.2 ± 2.9	2.1 ± 0.8	88.7	11.3
	tdTA	38.1 ± 2.5	20.0 ± 2.1	28.6 ± 2.6	13.3 ± 1.5	58.1	41.9
	tdTAF*	25.0 ± 3.2	26.0 ± 2.8	33.0 ± 4.0	16.0 ± 2.2	51.0	49.0
	AW	33.0 ± 3.1	18.3 ± 2.5	32.3 ± 2.0	16.4 ± 1.6	51.3	48.7
	AWF*	20.8 ± 3.5	20.5 ± 2.1	39.1 ± 4.1	19.6 ± 2.0	41.3	58.7
	AD1	12.6 ± 3.2	10.0 ± 2.1	50.8 ± 2.8	26.6 ± 2.0	22.6	77.4
	ADiF*	7.6 ± 1.1	10.4 ± 1.3	54.0 ± 1.4	28.0 ± 1.1	18.0	82.0
	ADiFL*	15.3 ± 2.4	18.7 ± 2.8	43.9 ± 3.0	22.1 ± 2.2	34.0	66.0
	ADN*	10.5 ± 2.3	9.1 ± 0.9	52.6 ± 2.1	27.8 ± 0.8	19.6	80.4
	ADQ*	16.1 ± 2.0	11.0 ± 1.0	48.1 ± 2.6	24.8 ± 1.1	27.1	72.9
	ADNQ*	13.1 ± 0.9	9.7 ± 0.5	51.5 ± 1.1	25.7 ± 0.6	22.8	77.2
-hcp	tdTA	52.0 ± 2.7	16.8 ± 0.9	20.8 ± 2.1	10.4 ± 1.2	68.8	31.2
	AWF*	29.9 ± 3.9	19.1 ± 2.5	33.5 ± 4.0	17.5 ± 2.4	49.0	51.0
	AD1	18.0 ± 3.9	9.6 ± 1.5	47.6 ± 3.5	24.8 ± 1.7	27.6	72.4
	ADiF*	16.5 ± 2.1	10.9 ± 1.0	45.7 ± 1.1	26.9 ± 1.3	27.4	72.6
	ADN*	15.0 ± 1.9	7.3 ± 1.0	50.3 ± 1.6	27.4 ± 1.3	22.3	77.7
	ADQ*	20.4 ± 1.7	10.8 ± 0.7	45.2 ± 0.8	23.6 ± 0.9	31.2	68.8
	ADNQ*	17.0 ± 2.8	8.7 ± 0.8	47.4 ± 1.5	26.9 ± 2.1	25.7	74.3

B, azul; G, verde; O, naranja; y R, rojo.

5 Lambolez y colaboradores han descrito un conjunto de mutaciones de apoaecorina obtenidas por un procedimiento de evolución *in vitro* y selección funcional (Tsuzuki K., *et al.* J Biol Chem 2005; 280: 34324-34331). Los llamados
mutantes "brillantes" aumentaron la bioluminiscencia en cuando se expresaron en bacterias, aunque el rendimiento
de fotones se mantuvo sin cambios en los ensayos libres de células. Así, la mejora debe surgir de que la proteína
expresada en bacterias tenga una mayor estabilidad o esté a mayor concentración. El mutante Q168R, localizado en
una posición justo al lado de H169, un residuo de unión a la CLZ, mostró un aumento de la vida media de Aeq en las
células, una termoestabilidad excepcional y disminuyó ligeramente su afinidad al Ca^{2+} (EC_{50} 6,8 μM). Por el
10 contrario, el mutante N26D, situado en la primera mano EF (motivo de unión al Ca^{2+}), no afectó la vida media de la
proteína, aunque forma parte del grupo de mutaciones "brillantes".

Estas mutaciones se introdujeron en AD1 en un intento de mejorar la expresión celular de la quimera. El efecto de
estas mutaciones en el perfil espectral se muestra en la Tabla 2. La mutación N26D en AD1 (variante denominada
ADN) mejoró ligeramente BRET (80,4% de la luz en canales O+R). Sin embargo, la introducción de Q168R (variante
ADQ) disminuyó la emisión en los canales O+R en un 4,5%. La combinación de ambas mutaciones (variante
15 llamada ADNQ) resultó en un espectro de emisión prácticamente igual a AD1. El efecto de estas mutaciones en la
sensibilidad al Ca^{2+} y otras propiedades se describirá más adelante.

Sensibilidad al Ca^{2+} de las variantes en células vivas *in vitro*

Después de la identificación de variantes con un marcado desplazamiento hacia el rojo, obtenidas por el ajuste de la

distancia dador-aceptor (Tabla 2) y la mejora de su solapamiento espectral y estabilidad (Tabla 3), se caracterizó la sensibilidad al Ca^{2+} de las variantes más prometedoras. En el primer enfoque, se obtuvo una medida de esta sensibilidad en células HEK transfectadas con las quimeras. En segundo lugar, se obtuvo proteína recombinante de variantes seleccionadas y se midió la sensibilidad al Ca^{2+} *in vitro* con tampones de Ca^{2+} .

- 5 Para las mediciones del primer enfoque, hemos desarrollado un método (método primero de la invención): para determinar la sensibilidad y la afinidad de proteínas sensibles al calcio, células que expresaban cada quimera fueron estimuladas con carbacol, un agonista de receptores muscarínicos, seguido por la saturación de la sonda con Ca^{2+} (incubación con digitonina 30 μM). Los sensores de alta afinidad por Ca^{2+} muestran L/Lmax elevada con carbacol, próxima al valor obtenido por digitonina. Y los sensores de baja afinidad tienen valor L/Lmax pequeño con carbacol (Figura 3). Los resultados correlacionan muy bien con la medida de la sensibilidad al Ca^{2+} *in vitro* (segundo enfoque).

- 15 Los niveles de Ca^{2+} citosólico se elevan a un valor cercano a 0,9 μM con carbacol en células Hek en cultivo (en base a calibraciones realizadas con indicadores fluorescentes de Ca^{2+} de síntesis) y alcanzan valores de saturación del biosensor por la incubación con digitonina, que hace permeable la membrana plasmática al Ca^{2+} . Para cada célula sujeta a estos dos estímulos se calculó el cociente L/Lmax (la luz emitida en cada punto del curso temporal dividida por la luminiscencia total restante en el experimento). L/Lmax es directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} . La Figura 4 muestra L/Lmax (escala logarítmica) para las diferentes variantes utilizando CLZ-f en la reconstitución de Aeq. Las variantes CitA (descrita en Bakayan A., *et al.* PLoS One 2011; 6: e19520; que se trata de una fusión citrina-Aeq) y GA mostraron la mayor sensibilidad al Ca^{2+} (valores grandes de L/Lmax durante el primer transitorio de Ca^{2+} por estimulación con carbacol, en comparación con el pico hallado al añadir digitonina). En cambio, tdTA mostró una sensibilidad intermedia, y que fue similar a la de las variantes AW, AD1, AWF, ADIF y ADN. Se obtuvieron diferencias similares entre estas quimeras cuando se usó CLZ-nativa en la reconstitución (sólo se ensayaron CitA, GA, tdTA, AW y AD1). Por lo tanto, las variantes de tdTA obtenidas por el acortamiento y ajuste del péptido conector entre apoequorina y tdTomato (AW, AD1), o mediante la introducción de las mutaciones puntuales Y82F y N26D en apoequorina (AWF, ADIF y ADN), tienen una sensibilidad al Ca^{2+} virtualmente idéntica. En cambio, las variantes de tdTA que incluyen la mutación Q168R en apoequorina (ADQ y ADNQ) presentaron una disminución de L/Lmax, de acuerdo con su menor afinidad por el Ca^{2+} demostrada anteriormente en Aeq sola (Tricoire L., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 9500-9505).

- 30 La sensibilidad al Ca^{2+} también se midió *in vitro* en las variantes CitA, tdTA y AD1 en muestras de proteína recombinante producida en bacteria, purificada por columna de afinidad, y reconstituida con CLZ-nativa o CLZ-f (Figura 5). CitA presentó al menos un orden de magnitud mayor afinidad que tdTA y AD1. Estas últimas mostraron curvas muy similares a excepción de una desviación alrededor de $\log [\text{Ca}^{2+}] = -7$ (100 nM Ca^{2+}). Los resultados obtenidos *in vitro* para las variantes seleccionadas coinciden con las mediciones de sensibilidad realizadas en células vivas (párrafo anterior). De hecho, asumiendo que la estimulación fisiológica con carbacol aumenta el Ca^{2+} citoplásmico a un valor cercano a 1 μM , los valores de L/Lmax obtenidos en células (Figura 4) son muy similares a los obtenidos con proteína recombinante (Figura 5), y la diferencia en L/Lmax entre CitA y las variantes derivadas de tdTA se conservó. La Figura 5 también muestra una mayor sensibilidad al Ca^{2+} (L/Lmax mayor), de cada variante reconstituida con CLZ-f en comparación a CLZ-nativa. Por último, la Tabla 4 resume las constantes de disociación para las variantes principales, calculadas de la Figura 5 (y obtenidos de la literatura para Aeq y GA), y los valores L/Lmax obtenidos en la Figura 4 y de datos no mostrados para CLZ-hcp y CLZ-nativa.

Tabla 4. Constantes de disociación (K_d) y valores de L/Lmax de sensores basados en Aeq. Las K_d de los diferentes sensores de Ca^{2+} se obtuvieron de forma experimental en este estudio o de la literatura (Aeq y GA). Los valores de L/Lmax corresponden al primer pico de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación por carbacol. Estos valores L/Lmax reflejan la sensibilidad de los sensores a una concentración aproximada de 1 μM Ca^{2+} (Figuras 3 y 4).

45

Tabla 4.

Sensor	K_d (nM)		L/L_{max} (pico de Ca^{2+} con carbacol)		
	CLZ-nativa	CLZ-f	CLZ-nativa	CLZ-f	CLZ-hcp
Aeq	1,220 ^[42]	510 ^[4]	0.00057	-	-
GA	630 ^[26]	-	0.005	0.047	-
CitA	417	260	0.023	0.17	-
tdTA	1,260	730	0.00074	0.004	0.039
AD1	1,500	870	0.00071	0.0034	0.054
ADNQ	-	-	-	0.0005	0.006

K_d , constante de disociación

Bioluminiscencia relativa de las variantes expresadas en células de mamífero

Células HeLa que expresan diferentes fusiones FP-Aeq se reconstituyeron con CLZ-f, se incubaron con digitonina, y se integraron las cuentas totales emitidas en cada célula durante el curso temporal (promedio de 8-30 células para las distintas variantes). Se obtuvo mayor luminiscencia total en las células que expresaban tdTA (1,02 unidades relativas de luminiscencia) que en aquellas con CitA o GA (0,26 y 0,36, respectivamente). La bioluminiscencia por célula fue mayor en las variantes AW, AWF, AD1, ADIF y ADN (0,63, 0,82, 0,50, 0,42 y 0,75, respectivamente, en las mismas unidades), pero todavía fue inferior a tdTA. Sin embargo, las variantes de AD1 que incorporan la mutación Q168R sola (ADQ), o en combinación con N26D (ADNQ) mostraron un marcado aumento de actividad respecto a AD1 (una luminiscencia total de 1,89 y 3,47 unidades relativas por célula, respectivamente). Este resultado está de acuerdo con la estabilidad conferida a Aeq sola por estas mutaciones (Tsuzuki K., *et al.* J Biol Chem 2005; 280: 34324-34331). Además, las variantes ADQ y ADNQ mostraron un mayor porcentaje de células fluorescentes después de la transfección transitoria del gen que tdTA o AD1. Por lo tanto, es probable que la mutación Q168R o la combinación N26D/Q168R aumenten la cantidad y/o estabilidad de estas proteínas quiméricas de Aeq en las células, produciendo más fluorescencia y bioluminiscencia total. Por otra parte, ya se había demostrado que GA (fusión GFP-Aeq) emite más bioluminiscencia que Aeq sola en células de mamífero. GFP parece provocar una estabilización de Aeq en la fusión GA y este efecto se potencia en la variante ADNQ: las células que expresan ADNQ emiten casi diez veces más bioluminiscencia por célula que las que expresan GA (3,47/0,36 = 9,7).

Capacidad luminiscente

El término "capacidad luminiscente" se refiere a la luz total que puede ser emitida por una muestra luminiscente relativa a la cantidad de proteína presente en ella. Para algunas quimeras seleccionadas, la capacidad de luminiscencia se evaluó en muestras de proteína recombinante después de purificación por afinidad, comparando la luz total emitida con Ca^{2+} saturante con la misma cantidad de cada proteína. La integridad de las proteínas se comprobó por fluorescencia en un gel nativo. Se verificó la fluorescencia verde (CitA) y roja (tdTA, AD1) de las bandas y no se observó degradación de las muestras en geles teñidos con Coomassie (datos no mostrados). Tomando tdTA como referencia, CitA mostró una capacidad luminiscente del 91% de tdTA, y AD1 del 72% de tdTA, todo ello referido a la misma cantidad de proteína recombinante. Por lo tanto, es muy probable que la mayor parte de la diferencia de luminiscencia celular de CitA, GA, tdTA y las variantes de tdTA descritas en el párrafo anterior se deban a cambios en la cantidad y/o la estabilidad de las proteínas quiméricas en células de mamífero, más que a su capacidad luminiscente intrínseca.

MEDICIÓN DE Ca^{2+} CITOPLÁSMICO Y MITOCONDRIAL A NIVEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES EN EXPERIMENTOS DE IMAGEN EN DOS COLORES

Elección de variantes Aeq verde y roja para su expresión en el citoplasma y matriz mitocondrial

En general se acepta que las señales de Ca^{2+} globales en el citoplasma pueden ser influenciadas por la captación de Ca^{2+} mitocondrial, que da forma a los cambios transitorios de Ca^{2+} reduciendo tanto su amplitud como la velocidad de propagación de las ondas. El registro de imágenes de bioluminiscencia en dos canales para monitorizar niveles de Ca^{2+} al mismo tiempo en dos orgánulos celulares, por ejemplo, citoplasma y mitocondrias, es una herramienta útil para la comprensión de la relación de los flujos de Ca^{2+} entre estos compartimentos (Manjarres I. M., *et al.* Pflugers Arch 2008; 455: 961-970).

Para poder registrar imágenes de Ca^{2+} en el citoplasma y las mitocondrias al mismo tiempo con sondas genéticamente codificadas, éstas deben emitir luz en bandas distintas del espectro. Las variantes de tdTA aquí descritas mejoran sustancialmente la separación espectral con las variantes de emisión verde como GA. En segundo lugar, su afinidad debe ajustarse a los niveles de Ca^{2+} esperados en cada compartimento celular en reposo y durante la estimulación. Para ello es importante tanto la elección de la variante de apoaequorina (FIG 4 y 5) como la CLZ sintética utilizada. Además, es obligado usar la misma CLZ para reconstituir Aeq en todos los compartimentos celulares, puesto que no se puede dirigir su difusión a un compartimento en particular.

Como hemos descrito, en la variante AD1, CLZ-f proporcionaba la mayor transferencia de energía entre Aeq y tdTomato (77% de la luz en canales O+R), y por lo tanto una separación espectral de GA razonable (Tabla 2). Modificamos la secuencia de AD1 para que fuera importada a la matriz mitocondrial (mitoAD1) (véase Material y Métodos). Sin embargo, mitoAD1 reconstituida con CLZ-f descargó rápidamente gran parte de la luminiscencia con el nivel de Ca^{2+} mitocondrial alcanzado durante la estimulación de las células HeLa con histamina (Figura 6A, consumo de Aeq). Por lo tanto, elegimos para su uso en mitocondrias la variante ADNQ, que presenta el mismo perfil espectral de AD1 (Tabla 3), un alto nivel de expresión y actividad luminiscente, pero con una reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} (Figura 4). La expresión en células HeLa de mitoADNQ (véase construcción en Materiales y Métodos) mostró la localización mitocondrial de la quimera, con un marcaje fluorescente intenso en comparación con el citoplasma (Figura 6B y 7). La tasa de consumo de la luminiscencia de mitoADNQ fue moderada (Figura 6B).

En cuanto a la variante complementaria a mitoADNQ para ser utilizada en el citoplasma, elegimos GA. Sin embargo, GA combinada con CLZ-f resultó en una afinidad al Ca^{2+} muy alta y una rápida tasa de luminiscencia, más del 50% fue consumida después de la primera respuesta de Ca^{2+} (Figura 6C). La introducción de la mutación puntual Q168R en GA fue suficiente para disminuir su sensibilidad al Ca^{2+} alrededor de 9 veces, y disminuir la tasa de consumo de Aeq (Figura 6D). La variante resultante se denominó GAQ, y no se observó ningún cambio en su espectro luminiscente en comparación con GA (Tabla 3).

Medidas de Ca^{2+} citoplásmico y mitocondrial en la misma célula con las variantes seleccionadas

Antes de realizar los experimentos de imagen en dos colores simultáneos, se midió la emisión de las sondas GAQ y mitoADNQ separadamente en los canales verde (filtro de paso de banda de 535/52 nm) y rojo (filtro de paso largo de 570 nm). Se transfectaron células HeLa por separado con las quimeras y se estimularon con histamina. La contribución espectral de cada quimera se calculó como las cuentas de la respuesta de Ca^{2+} en cada canal dividido por la suma de cuentas en ambos canales. El canal verde (535/52 nm) registró el 81% de las cuentas de GAQ, y el canal rojo recogió el 85% de las cuentas de mitoADNQ. Este porcentaje puede ser mejorado optimizando estos filtros de emisión.

A continuación se co-transfectaron células HeLa con GAQ y mitoADNQ para obtener imágenes de Ca^{2+} en el citoplasma y las mitocondrias de las mismas células. La mayoría de ellas mostraron co-expresión de niveles adecuados de GAQ en el citoplasma/núcleo, y mitoADNQ en las mitocondrias; se muestra un experimento representativo en la Figura 7. La aplicación de histamina 100 μM indujo un aumento de Ca^{2+} que comenzó primero en el citoplasma/núcleo (GAQ, canal verde) y fue seguido por un pico de Ca^{2+} mitocondrial (mitoADNQ, canal rojo) (Figura 7).

USO DE CLZ-hcp PARA REGISTRAR ACTIVIDAD DE Ca^{2+} ESPONTÁNEA O PARA ADQUIRIR IMÁGENES DE Ca^{2+} A ALTA FRECUENCIA

Actividad espontánea de Ca^{2+} en células HEK individuales

La Aeq cambia su espectro y tasa de emisión, la sensibilidad hacia el Ca^{2+} y la cinética de la reacción (ascenso y decaimiento de la bioluminiscencia) dependiendo de la CLZ, nativa o sintética, utilizada en la reconstitución (Shimomura O., *et al.* Cell Calcium 1993; 14: 373-378). Por lo tanto, el tipo de CLZ añade flexibilidad a las variantes tdTA descritas, y cada CLZ puede ser óptima para una aplicación específica, por ejemplo, el seguimiento de la actividad espontánea de Ca^{2+} . De las distintas CLZ sintéticas, se ha mostrado que Aeq/CLZ-hcp proporciona la mayor tasa de emisión (190 veces más cuantos/s que la CLZ-nativa a pCa 7) y la cinética más rápida (constante de tiempo de ascenso, 2,4 ms, y de decaimiento, 150-300 ms) (Shimomura O., *et al.* Cell Calcium 1993; 14: 373-378). Sin embargo, la CLZ-hcp causó un corrimiento al azul de 29 nm en comparación con CLZ-f (pico a 444 nm frente a 473 nm, respectivamente), que dio lugar a una transferencia de energía ligeramente inferior en la variante AD1 (Tabla 3). En cuanto a la sensibilidad al Ca^{2+} en las células que expresan AD1, CLZ-hcp produjo valores de L/Lmax (0,0546) 16 veces más altos que CLZ-f (L/Lmax = 0,0033, Figura 4) durante los cambios transitorios de Ca^{2+} estimulados por carbacol. Este resultado está de acuerdo con el valor publicado de 11 veces mayor intensidad relativa de Aeq/CLZ-hcp en comparación con CLZ-f a pCa 7.

La mayor sensibilidad de AD1/CLZ-hcp al Ca^{2+} podría permitirnos el registro de imágenes durante oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en células. Para ello, se incubaron células HEK que expresan AD1 con CLZ-hcp como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron en medio de cultivo MEM-alfa sin rojo fenol. Con el fin de mantener las células viables por varias horas, se tomaron las imágenes de bioluminiscencia en un microscopio colocado en una cámara con humedad controlada a 37°C y 5% de CO_2 . Se

muestra un experimento representativo (de tres) en la Figura 8. Varias células en el mismo campo microscópico mostraron una actividad espontánea de los niveles de Ca^{2+} citosólico, que se prolongó durante cinco horas. Durante ese tiempo, muchas células se movieron fuera del campo de registro, lo que impidió la conversión de las cuentas en L/Lmax.

5 Registro de imágenes de Ca^{2+} a alta frecuencia en células HEK

Como ya se mencionó, una de las características más atractivas de CLZ-hcp es su cinética rápida. Por otra parte, la variante ADNQ mostró una baja afinidad al Ca^{2+} (Figura 4) y aproximadamente 7 veces más luminiscencia en células HeLa transfectadas que AD1. La combinación de ADNQ con CLZ-hcp podría permitir la rápida adquisición de imágenes durante cambios transitorios de Ca^{2+} por su alta tasa de emisión y, al mismo tiempo, permitir la estimulación repetitiva de las células con agonistas en experimentos de larga duración. Células HEK que expresan ADNQ se incubaron con CLZ-hcp, se inició la adquisición de una imagen cada 2s, y las células se estimularon con 50 μM carbacol, se lavaron y se estimularon de nuevo (Figura 9A). Se observó señal luminiscente correspondiente a oscilaciones de Ca^{2+} repetitivas. El tiempo de duración promedio de las oscilaciones fue de 6 s. Después de una hora de adquisición de imágenes, se había consumido menos del 10% de la Aeq total (Figura 9A).

En células HEK transfectadas con ADNQ e incubadas con CLZ-hcp, se tomaron imágenes a una velocidad de adquisición más rápida (220 ms/imagen), y se estimularon con carbacol 10 μM (Figura 9B). En algunos experimentos, las células HEK respondieron con una cinética aún más nítida a este estímulo, con una duración de los picos de Ca^{2+} de 2s (Figura 9B, panel inferior). Por lo tanto, la combinación ADNQ/CLZ-hcp permitió monitorizar oscilaciones de Ca^{2+} citoplásmico con una buena relación señal-ruido, y con el consumo de menos del 10% de la Aeq total disponible, lo que permite el registro de imágenes durante períodos prolongados de tiempo.

Conclusiones

Anteriormente se identificó tdTomato como el mejor aceptor de BRET de Aeq entre las diversas RFPs evaluadas. Para mejorar la eficiencia de BRET en tdTA, se han ensayado cambios en varios factores, como el grado de solapamiento espectral, la orientación y la distancia entre los cromóforos dador/aceptor.

CAMBIO DEL PÉPTIDO DE ENLACE Y DELECCIONES EN tdTOMATO Y APOAEQUORINA. En primer lugar, acortamos y alargamos el enlazador entre tdTomato y apoequorina presente en tdTA y estudiamos su efecto sobre BRET. En general, el acortamiento mejoró la transferencia de energía. Además, la introducción de delecciones tanto en el extremo C terminal de tdTomato como N de apoequorina proporcionaron mejoras incrementales en BRET y un corrimiento al rojo de la emisión. Así, un empaquetamiento más compacto de dador y aceptor favorece BRET, presumiblemente a través de una disminución de la distancia y/o una orientación más favorable de los cromóforos, hasta un límite máximo obtenido en la variante AD1. Delecciones adicionales no mejoraron BRET (variante BW) o suprimieron la bioluminiscencia por completo (en A3 y B2), mientras que algunas delecciones intermedias, como en la variante AE, produjeron quimeras inestables con tendencia a la agregación y la toxicidad. En conclusión, encontramos que el péptido enlazador y las delecciones presentes en AD1 son óptimas, con una eficiencia estimada de BRET del 75% (Tabla 2, Figura 2).

MUTACIONES PARA OBTENER UN CORRIMIENTO AL ROJO DE AEQ. Una forma adicional de ajustar las propiedades de Aeq es el uso de mutagénesis aleatoria o dirigida. Se ha demostrado que algunas mutaciones afectan al pico de máxima emisión, por ejemplo, Y82F en Aeq desplaza su emisión 29 nm hacia el rojo (Stepanyuk G. A., *et al.* FEBS Lett 2005; 579: 1008-1014). La introducción de esta mutación en la variante ADiF resultó en un corrimiento al rojo del pico de Aeq (Figura 2) y, por tanto, aumentó el grado de superposición espectral con tdTomato, y la eficiencia de BRET (Tabla 3).

MUTACIONES EN AEQ QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LA PROTEINA y LA SENSIBILIDAD AL Ca^{2+} . La tasa de emisión de una variante también depende de la Aeq total disponible a nivel celular. Se sabe que la Aeq silvestre tiene una vida media corta en células eucariotas, especialmente en el citosol. Algunas mutaciones, tales como Q168R, aumentan la termoestabilidad y probablemente extienden la vida media de la Aeq (Tsuzuki K., *et al.* J Biol Chem 2005; 280: 34324-34331). En efecto, hemos observado una mayor actividad bioluminiscente de las variantes que incluyen la mutación Q168R en células HeLa. Además, esta mutación también disminuye la afinidad por el Ca^{2+} (Figura 4, ADQ y ADNQ) (Tricoire L., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 9500-9505). Así, a diferencia de AD1, las variantes ADQ y ADNQ en combinación con CLZ-f resultaron en una menor sensibilidad al Ca^{2+} (Figura 4 y Tabla 4). Esta afinidad disminuida puede contribuir a la Aeq total disponible en las células después de la reconstitución con CLZ, al afectar al consumo de Aeq durante ese paso. Esto puede estar relacionado con la luminiscencia total observada en las células: $\text{ADNQ} > \text{tdTA} > \text{CitA}$, que se correlaciona inversamente con su afinidad por el Ca^{2+} (Tabla 4).

DIFERENCIA ENTRE LAS VARIANTES SOBRE AFINIDAD. Las fusiones CitA y GA reconstituidas con CLZ-nativa mostraron mayor sensibilidad hacia el Ca^{2+} que tdTA y AD1 (Figura 5; Tabla 4). Además, también se ha mostrado en la literatura que GA presenta una afinidad más alta que Aeq sola. Se sabe que Aeq, en presencia de Ca^{2+} , interactúa con la GFP silvestre (la forma natural presente en Aeq), cambiando el tamaño relativo de sus dos picos de excitación. Es probable que en las FPs derivadas de GFP (como citrina) se conserve esta propiedad, lo que

explicaría la alta eficiencia de BRET (Figura 2) y alta sensibilidad al Ca^{2+} de CitA (Figura 5). AD1 tiene una afinidad al Ca^{2+} ligeramente menor que tdTA (Tabla 4). Por debajo de 150 nM, la curva de titulación de Ca^{2+} de AD1/CLZ-nativa se aplana (Figura 5), lo que podría deberse a la delección de apoaecuatorina N-terminal, que puede afectar a la coordinación entre las tres manos EF, especialmente la primera (Tricoire L., *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 9500-9505).

VENTAJAS DE LA RECONSTITUCIÓN CON CLZ Y SUS EFECTOS SOBRE EL ESPECTRO DE EMISIÓN Y AFINIDAD. El paso de la reconstitución Aeq con su cofactor CLZ, aunque requiere tiempo, también ofrece ventajas, ya que permite ajustar algunas de las propiedades de Aeq. De los diversos análogos, CLZ-f proporciona el pico de emisión de mayor longitud de onda (473 nm), en comparación con CLZ-h (464 nm) y CLZ-hcp (444 nm). Así, por ejemplo, AD1 combinada con CLZ-f mostró la mayor transferencia de energía de las tres CLZ (Tabla 3; no se muestra CLZ-h). También facilitó los experimentos de imagen por su tasa de emisión moderada (Figura 3) (Shimomura O., *et al.* Cell Calcium 1993; 14: 373-378). Por último, en los ensayos de sensibilidad al Ca^{2+} se refleja la afinidad intermedia de CLZ-f en comparación con -nativa o -hcp (Figura 4 y tabla 4) (Shimomura O., *et al.* Cell Calcium 1993; 14: 373-378).

SENSIBILIDAD AL Ca^{2+} Y TASA DE CONSUMO DE AEQ, VENTAJAS DE LA CLZ-hcp. Las tasas de emisión y consumo de un sensor basado en Aeq son proporcionales a su sensibilidad al Ca^{2+} . A pesar de que una tasa de emisión alta facilita la adquisición de imágenes de luminiscencia, puede limitar su observación a largo plazo (véase el rápido consumo de GA y CitA en la Figura 3). Del mismo modo, un sensor de baja afinidad con menor tasa de emisión hace más difícil tomar imágenes de Ca^{2+} (por ejemplo, ADNQ en la Figura 3). Por lo tanto, un sensor con una afinidad, emisión (cuantos/s), y tasa de consumo moderados proporcionaría el equilibrio necesario.

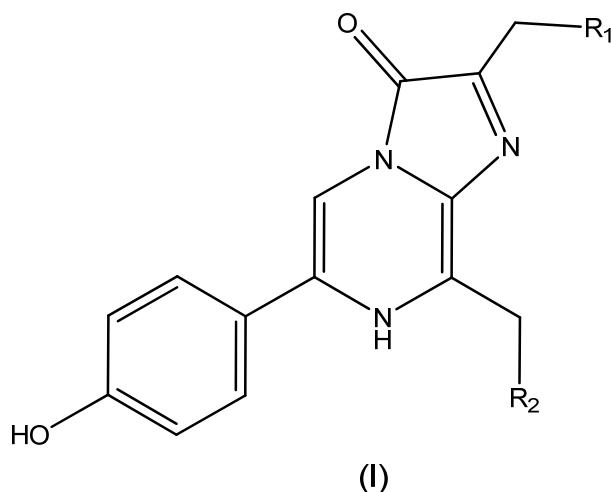
Por tanto, el siguiente objetivo fue aumentar los cuantos/s de ADNQ sin afectar mucho la estabilidad de la proteína mejorada. Demostramos que la combinación de ADNQ con CLZ-hcp, que muestra una cinética de reacción rápida, fue adecuada para registrar la dinámica de Ca^{2+} a velocidades de captura relativamente altas (Figura 9). Por otro lado, CLZ-hcp junto con AD1 resultó en una variante de emisión roja de alta afinidad (Tabla 4). Esta combinación permitió visualizar la movilización espontánea de Ca^{2+} de células HEK con una buena relación señal/ruido en experimentos de larga duración (Figura 8).

MEDIDAS DE IMAGEN DE Ca^{2+} CITOPLÁSMICO Y MITOCONDRIAL EN LA MISMA CÉLULA. Dos principales desafíos están presentes en el seguimiento de Ca^{2+} con Aeq en un orgánulo celular como la mitocondria: la cantidad total de proteína que puede ser expresada y los niveles de Ca^{2+} . La cantidad de proteína exógena que se puede acumular en las mitocondrias es bastante limitada en comparación con la expresión citosólica o nuclear. Además, el Ca^{2+} en las mitocondrias puede alcanzar el rango micromolar y por lo tanto se debe ajustar la afinidad de la sonda específica a los niveles de Ca^{2+} que ocurren durante la estimulación. En consecuencia, la variante ADNQ/CLZ-f, con una actividad luminiscente alta y una afinidad baja, fue la combinación seleccionada. Se espera que la concentración de Ca^{2+} mitocondrial alcance 10 μM o más. Las calibraciones con mitoAD1 dieron valores de 40 μM (Figura 5 y 6A). Como sonda citoplásmica complementaria de ADNQ mitocondrial, se construyó la variante verde GAQ que, combinada con CLZ-f, presenta menor afinidad al Ca^{2+} que GA (Figura 6C-D). Esto es especialmente importante, ya que la uniportador mitocondrial tiene una K_d en el rango 2-4 μM . Además de utilizar un sensor con moderada sensibilidad al Ca^{2+} , otra manera de minimizar la interferencia potencial de la sonda con la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Manjarres I. M., *et al.* Pflugers Arch 2008; 455: 961-970), sería dirigir su expresión al núcleo.

En conclusión, AD1 es un nuevo sensor de Ca^{2+} con bioluminiscencia roja, que cuando se combina con análogos de CLZ y mutaciones puntuales adecuadas, permite generar variantes con propiedades ajustadas para distintas necesidades. Éstas podrán ser utilizadas en el futuro en otras aplicaciones además de los ejemplos presentados aquí. Además, al ser el sensor basado en Aeq con la mayor emisión por encima de 600 nm, tiene un gran potencial para permitir registrar imágenes de Ca^{2+} en tejidos profundos de organismos vivos.

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión fluorescente roja que comprende
 - a. una subunidad (a) que consiste en una proteína con al menos un 70% de identidad con la proteína SEQ ID NO: 2, y
 - 5 b. una subunidad (b) que consiste en una proteína fotoluminiscente sensible al calcio, con al menos un 70% de identidad con la proteína SEQ ID NO: 4,donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) sin espaciador o mediante un polipéptido espaciador de hasta 19 aminoácidos.
- 10 2. Proteína según la reivindicación anterior donde el polipéptido espaciador consiste en un polipéptido de hasta 11 aminoácidos.
3. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la subunidad (a) es la SEQ ID NO: 2 y/o la subunidad (b) es la SEQ ID NO: 4.
4. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la subunidad (a) consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 1 al 465 ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 2.
- 15 5. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la subunidad (b) consiste en al menos los aminoácidos consecutivos 5 al 189 ambos inclusive de la proteína SEQ ID NO: 4.
6. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el polipéptido espaciador es de entre 2 y 11 aminoácidos.
- 20 7. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el polipéptido espaciador es la SEQ ID NO: 41.
8. Proteína según la reivindicación 6 donde el polipéptido espaciador es la SEQ ID NO: 42.
9. Proteína según la reivindicación 8 donde dicha proteína de fusión es SEQ ID NO: 26.
10. Proteína según la reivindicación 6 donde el polipéptido espaciador es serina-glicina.
11. Proteína según la reivindicación 10 donde dicha proteína de fusión es SEQ ID NO: 20.
- 25 12. Proteína según la reivindicación 10 donde dicha proteína de fusión es SEQ ID NO: 24.
13. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 5, donde la subunidad (b) está unida al extremo carboxilo-terminal de la subunidad (a) sin espaciador.
14. Proteína según la reivindicación anterior, donde dicha proteína de fusión es SEQ ID NO: 22.
- 30 15. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende en la subunidad (b) una sustitución del aminoácido tirosina de la posición 82 por un aminoácido fenilalanina.
16. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende en la subunidad (b) una sustitución del aminoácido glutamina de la posición 168 por un aminoácido arginina.
17. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende en la subunidad (b) una sustitución del aminoácido asparragina de la posición 26 por un aminoácido aspártico.
- 35 18. Composición que comprende la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en combinación con el cofactor CLZ de fórmula general (I):



donde: R₁ es un grupo arilo, sustituido o sin sustituir y R₂ se selecciona de entre un grupo arilo o un grupo cicloalquilo.

19. Composición según la reivindicación anterior, donde R₁ es un fenilo o naftilo.
- 5 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, donde R₁ es un arilo sustituido por un grupo OH o halógeno, preferiblemente el halógeno es F, más preferiblemente el grupo está en posición para.
21. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde R₂ es un fenilo o un pentilo.
22. Secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica una proteína fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 10 23. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 22 donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 25.
24. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 22 donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 19.
25. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 22 donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 23.
26. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 22, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 21
27. Célula que comprende la secuencia nucleotídica según las reivindicaciones 22 a 26.
- 15 28. Procedimiento para la obtención de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 que comprende cultivar una célula según la reivindicación 27 en condiciones que permiten la expresión de dichas proteínas, donde dicha expresión se produce en bacterias, levaduras, baculovirus, células de mamífero en cultivo o cualquier otro sistema de expresión de proteína recombinante.
29. Procedimiento según la reivindicación 28, que además comprende aislar y/o purificar dichas proteínas.
- 20 30. Uso de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, para la detección y cuantificación *in vitro* de la concentración de calcio en una célula o en un tejido.
31. Uso según la reivindicación 30 donde el calcio que se detecta se localiza en el interior de una célula.
32. Uso según la reivindicación 31 donde el calcio se localiza en la mitocondria de la célula.
- 25 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, donde la proteínas de fusión o la composición que la comprende, se encuentran en combinación con al menos una fotoproteína sensible a calcio, con emisión amarilla, verde o azul.
34. Método de cribado de ligandos de receptores de membrana que comprende:
 - 30 a. cultivar una célula o tejido que exprese un receptor de membrana acoplado a la liberación de Ca²⁺ intracelular
 - b. poner en contacto una célula o tejido con la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o con la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26;

- c. añadir a las células el cofactor CLZ,
 - d. Estimular las células con una sustancia;
 - e. Estimular las células o el tejido con un agonista conocido del receptor.
 - f. determinar la emisión de la fotoproteína sensible al Ca^{2+} por las células o tejido;
 - 5 g. Cuantificar la luminiscencia emitida en respuesta a la sustancia, proporcional a la señal de Ca^{2+} intracelular.
35. Uso del método según la reivindicación 34 para la identificación de un antagonista de un receptor acoplado a la liberación de Ca^{2+} intracelular.
- 10 36. Uso del método según la reivindicación 34 para la determinación *in vitro* de la afinidad de una sustancia para un receptor de membrana acoplado a la liberación de Ca^{2+} intracelular;
37. Método de cribado de moduladores de enzimas que comprende:
- a. cultivar una célula o tejido que exprese una enzima acoplada a la liberación de Ca^{2+} intracelular
 - b. poner en contacto una célula o tejido con la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o con la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26.
 - 15 c. añadir a las células el cofactor CLZ,
 - d. Estimular las células con una sustancia;
 - e. Estimular las células o el tejido con un activador conocido de la enzima.
 - f. determinar la emisión de la fotoproteína sensible al Ca^{2+} por las células o tejido;
 - 20 g. Cuantificar la luminiscencia emitida en respuesta a la sustancia, proporcional a la señal de Ca^{2+} intracelular.
38. Uso del método según la reivindicación 37 para la determinación *in vitro* de la afinidad de una sustancia para una enzima acoplado a la liberación de Ca^{2+} intracelular;
- 25 39. Kit que comprende al menos una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, o al menos una secuencia nucleotídica recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26.
40. Uso del kit según la reivindicación 39, para la detección y/o cuantificación *in vitro* de niveles de calcio en una célula o en un tejido.

FIG. 1

b12	(GGSGSGQSGSGSGQSGSGSGQS)
a1	(GSGGQSGSGSGQS)
tdTA	GRHHLFLYGMDELYKGTELYKSGGSGSGGQ <u>SG</u> LRSVKLTSDFDNPRWIG
A3	GRHHLFL..... <u>SG</u> PRWIG
B2	GRHH..... <u>SG</u> PRWIG
AW	GRHHLFL..... <u>SG</u> LRSVKLTSDFDNPRWIG
BW	GRHH..... <u>SG</u> LRSVKLTSDFDNPRWIG
AE	GRHHLFL..... <u>SG</u> KLTSDFDNPRWIG
AD1	GRHHLFL..... <u>SG</u> FDNPRWIG
Alfa	GRHHLFL.....SDFDNPRWIG
Beta	GRHHL ~~LL~~ <u>SG</u> FDNPRWIG
ADiFL*	GRHHLFL.....SGGSGS... <u>SG</u> FDNPRWIG

FIG. 2

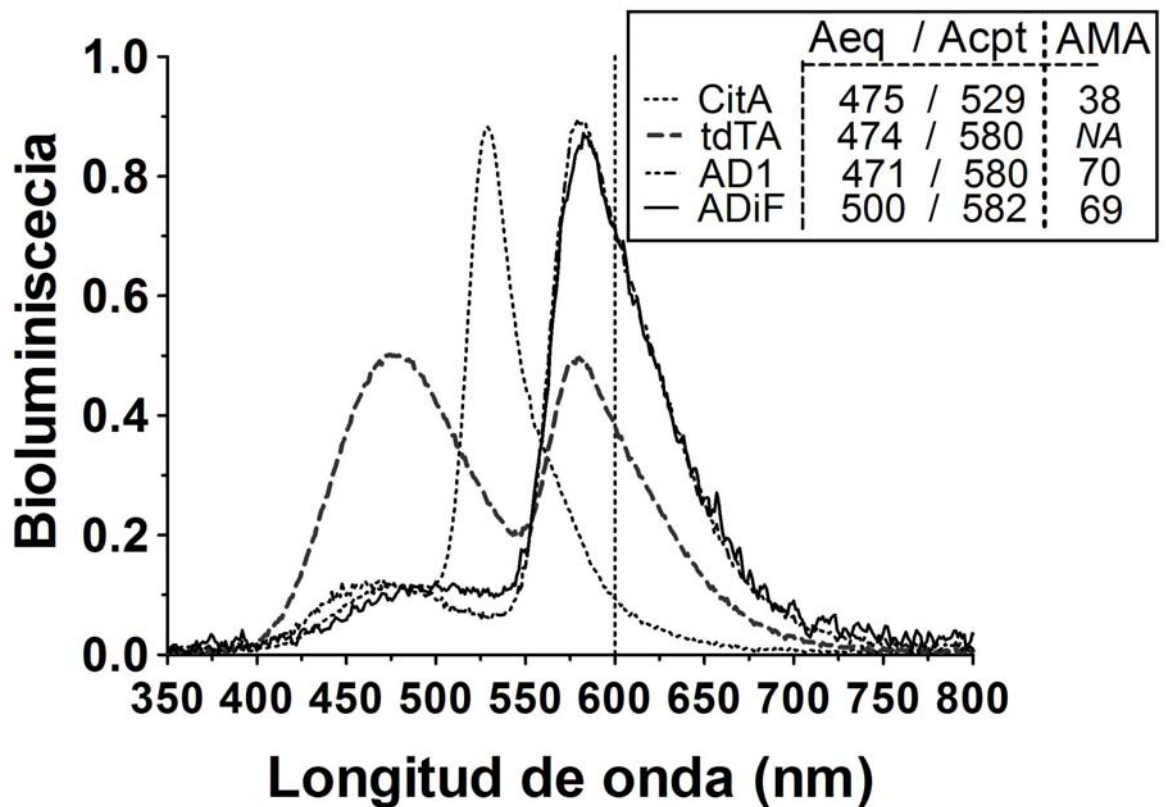


FIG. 3

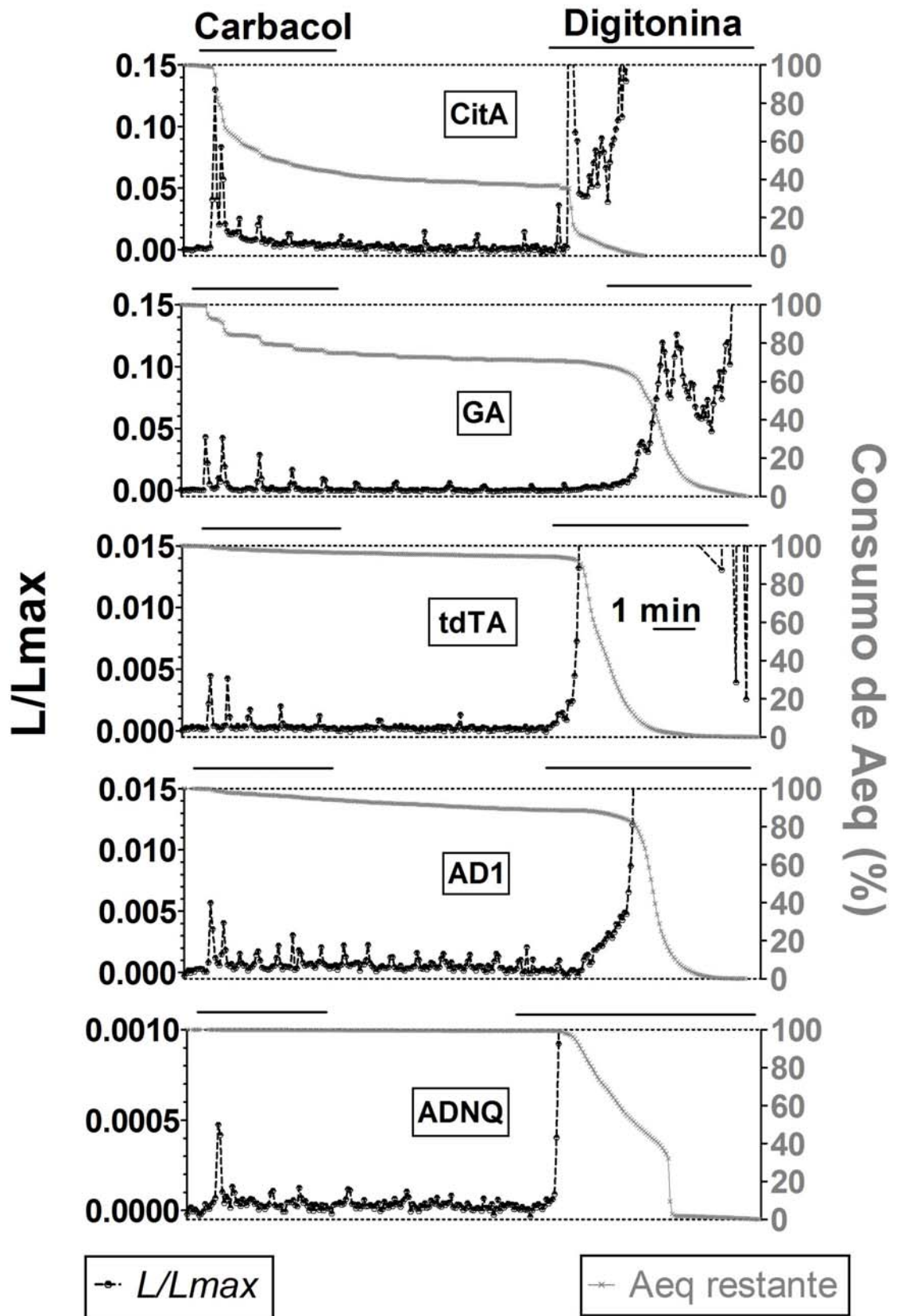


FIG. 4

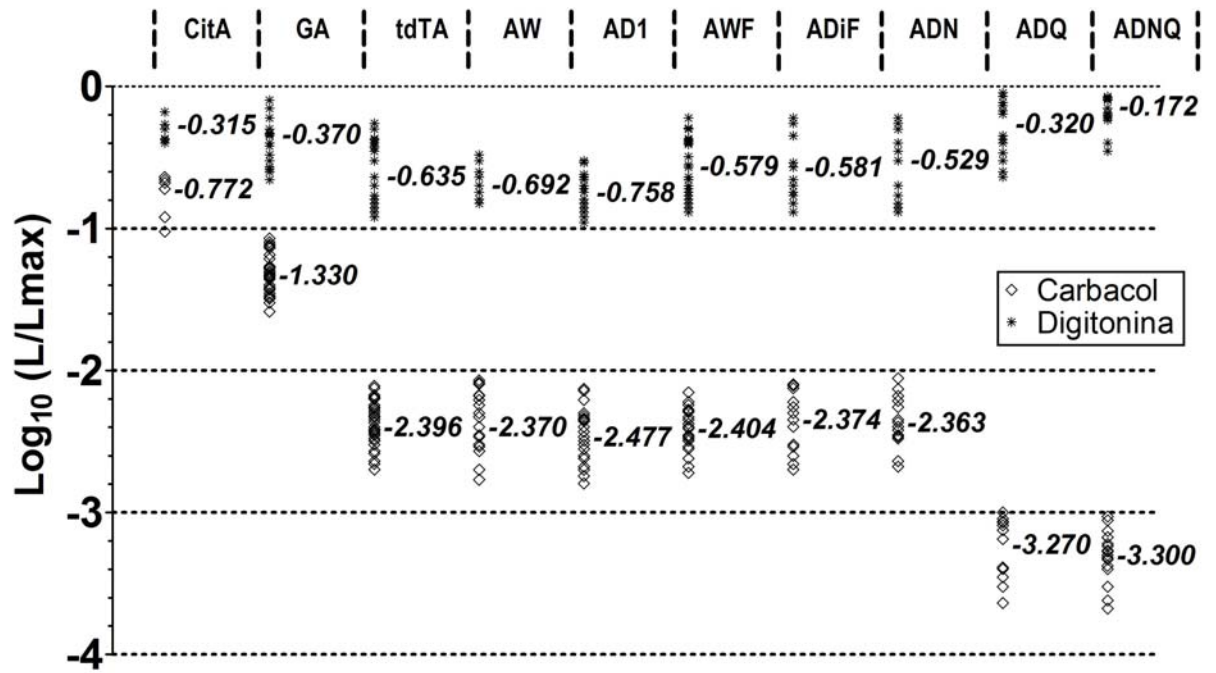


FIG. 5

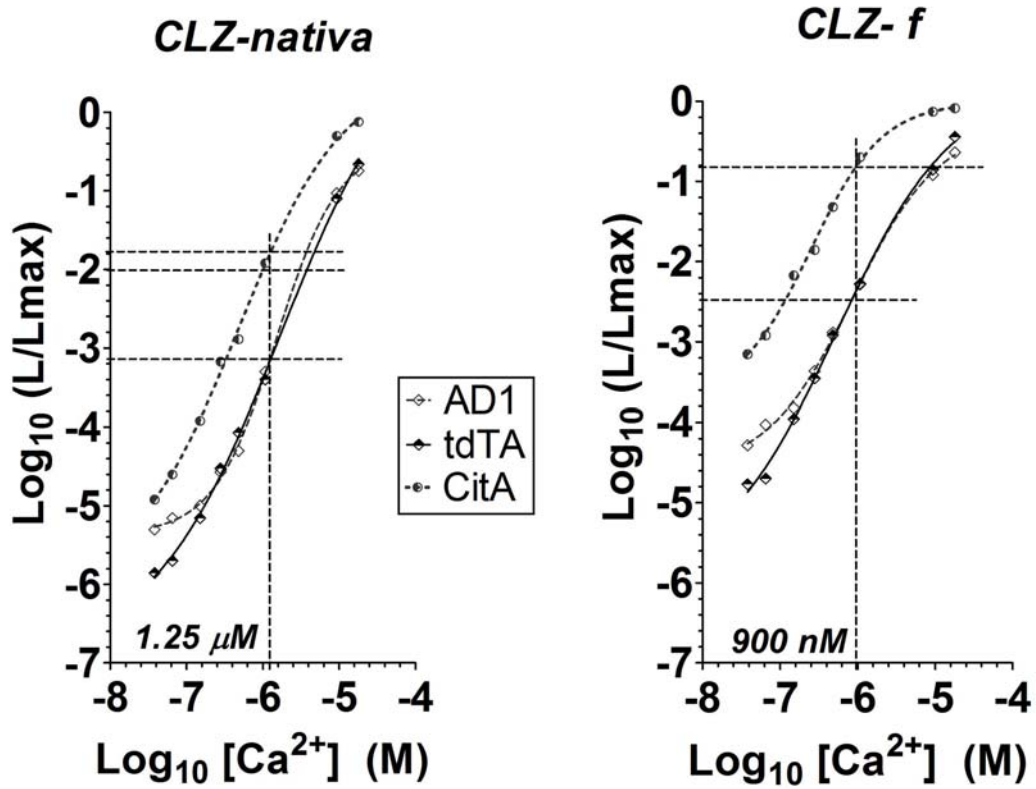


FIG. 6

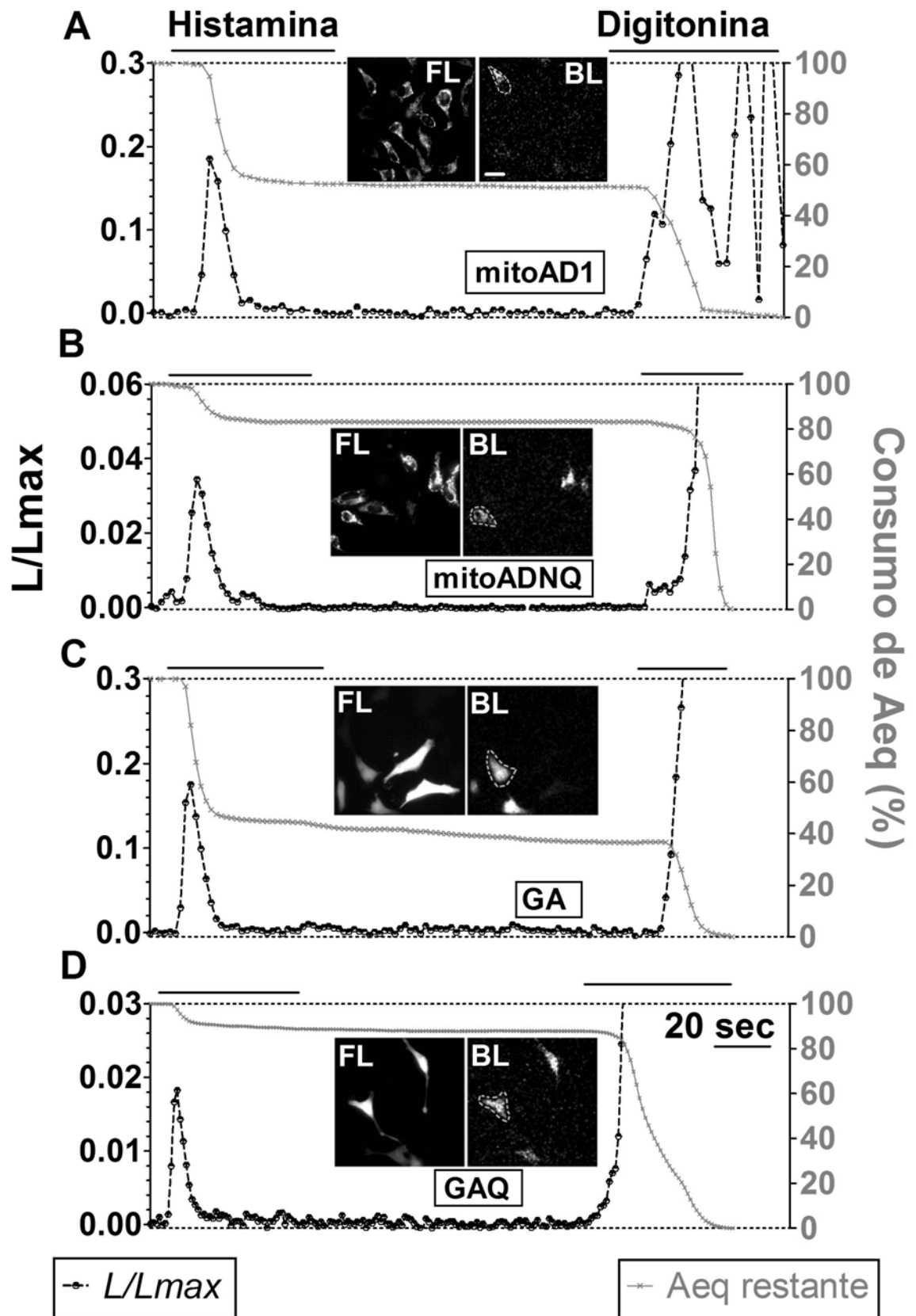


FIG. 7

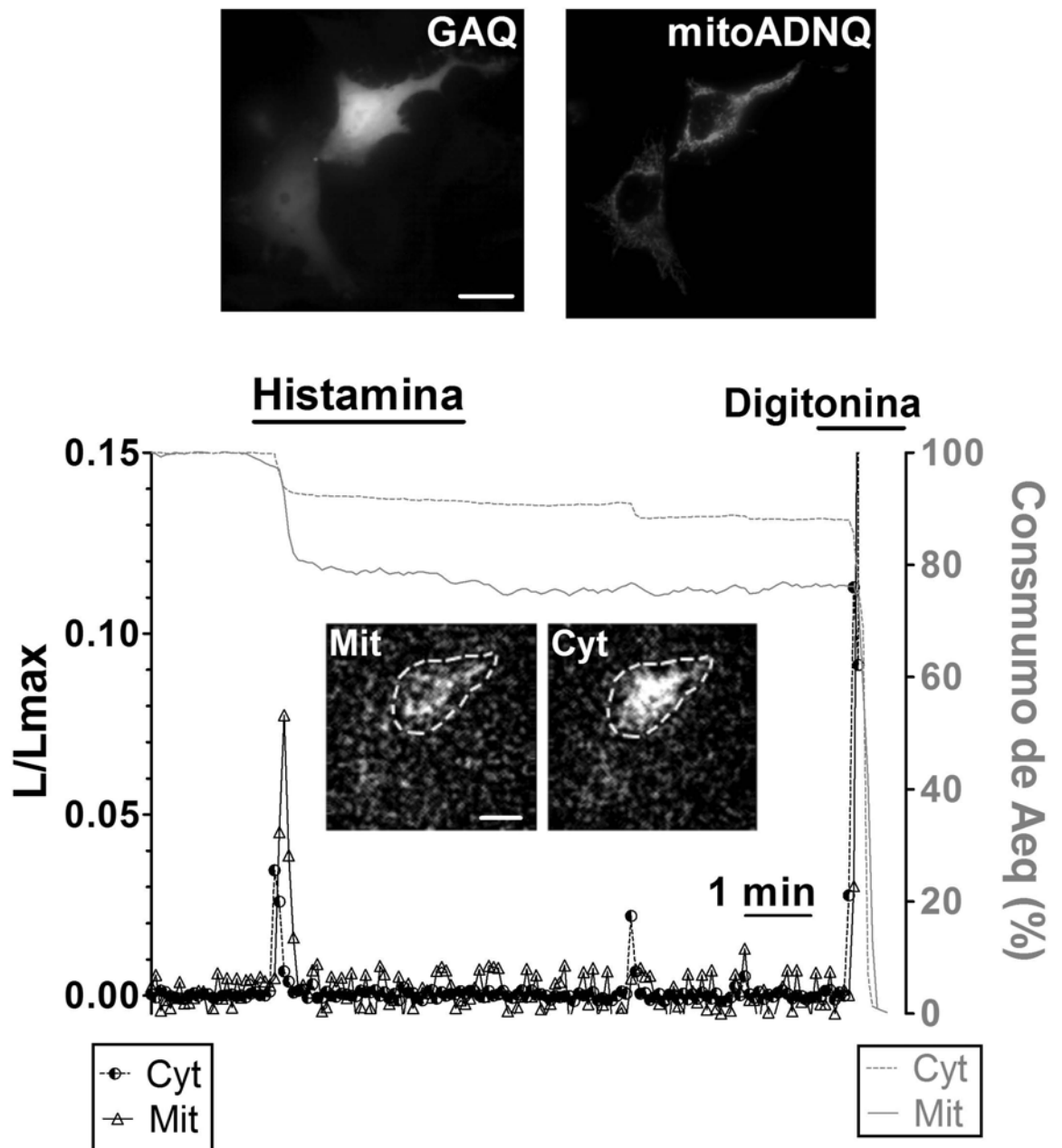


FIG. 8

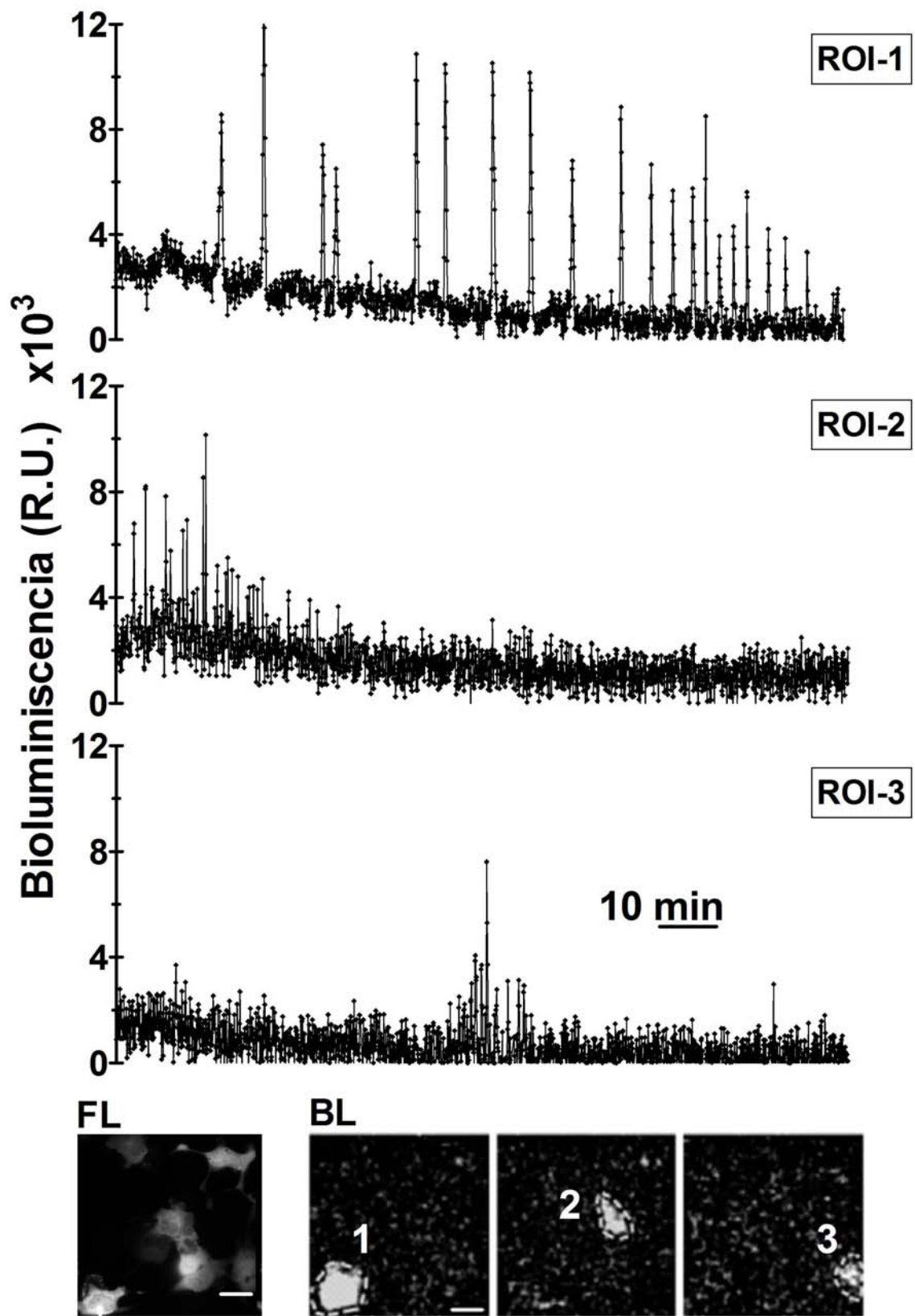
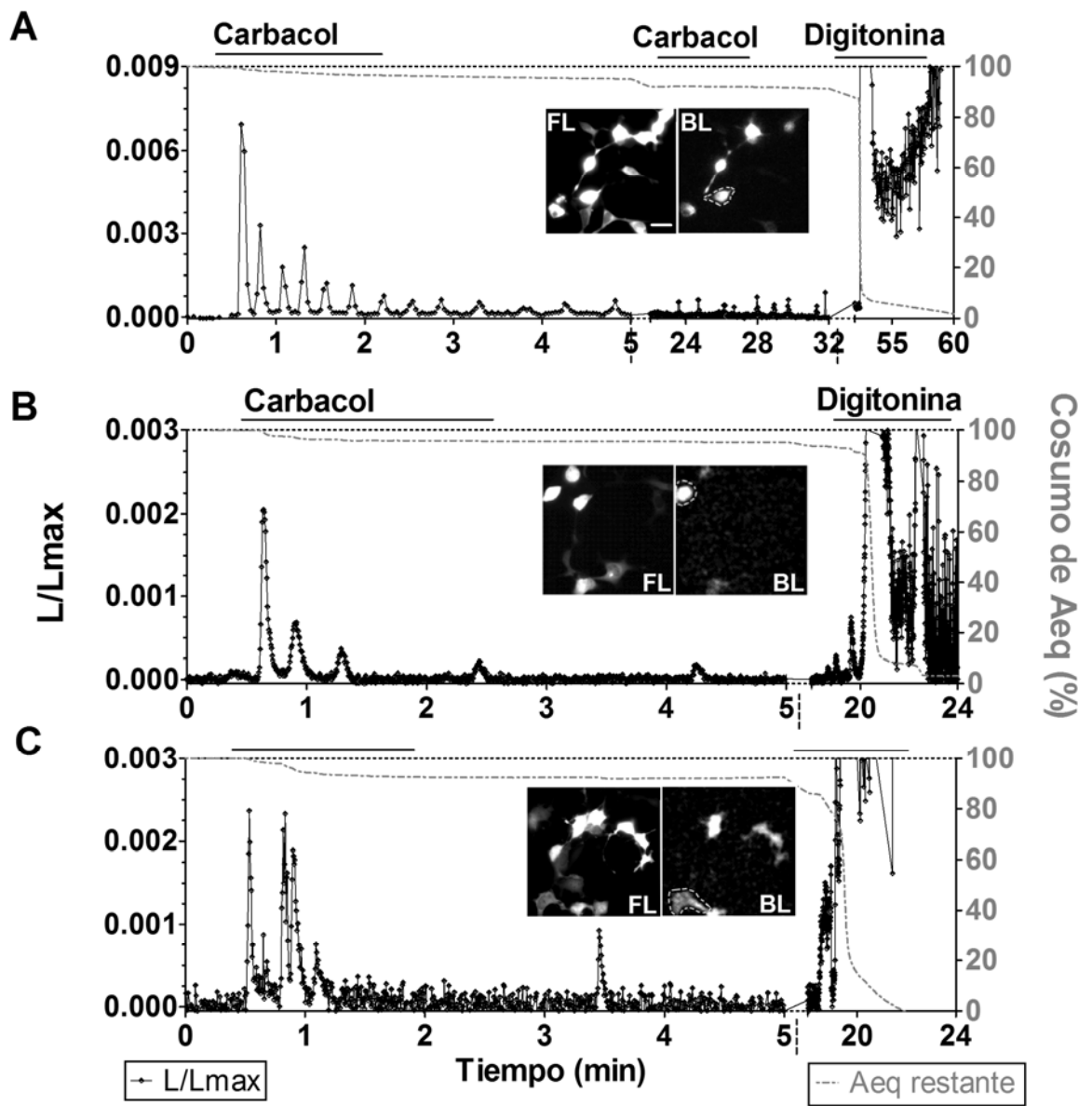


FIG. 9



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Castilla La Mancha
 <120> Variantes de la proteína de fusión sensible al calcio tdTomato-aequorina
 <130> ES1874.23
 <160> 63
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1428
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos tdTomato
 <400> 1
 atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
 ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
 ggcacccaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac 180
 atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
 cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
 gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
 tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
 accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
 gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
 atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600
 gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
 cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
 gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
 atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
 tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
 tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
 gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg 1020
 aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
 ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc ccgacggccc cgtaatgcag 1140
 aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgcctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
 aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
 aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
 aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
 gagggccgcc accacctgtt cctgtacggc atggacgagc tgtacaag 1428

<210> 2
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos tdTomato

 <400> 2
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15
 Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45
 Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60
 Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80
 Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95
 Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110
 Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125
 Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140
 Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly
 145 150 155 160
 Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175
 Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190
 Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205
 Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220
 Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240

Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
245 250 255

Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
260 265 270

Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
275 280 285

Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
290 295 300

Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
305 310 315 320

Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
325 330 335

Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
340 345 350

Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
355 360 365

Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
370 375 380

Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
385 390 395 400

Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
405 410 415

Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
420 425 430

Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
435 440 445

Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
450 455 460

His Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
465 470 475

<210> 3
<211> 567
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos ApoAequorina

<400> 3
gtcaaactta catcagactt cgacaaccca agatggattg gacgacacaa gcatatgttc 60
aatcttccttg atgtcaacca caatggaaaa atctctcttg acgagatggg ctacaaggca 120
tctgatattg tcatcaataa ccttggagca acacctgagc aagccaaacg acacaaagat 180
gctgtggaag ccttcttcgg aggagctgga atgaaatatg gtgtggaaac tgattggcct 240
gcatatatattg aaggatggaa aaaattggct actgatgaat tggagaaata cgccaaaaac 300
gaaccaaccc tcatccgcat ctgggggtgat gctttgtttg atatcgttga caaagatcaa 360
aatggagcta ttacactgga tgaatggaaa gcatacacca aagctgctgg tatcatccaa 420
tcatcagaag attgcgagga aacattcaga gtgtgcgata ttgatgaaag tggacaactc 480
gatgttgatg agatgacaag acagcatctg ggattttggg acaccatgga tcctgcttgc 540
gaaaagctct acggtggagc tgtcccc 567

<210> 4
<211> 189
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos ApoAequorina

<400> 4
Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
1 5 10 15
Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser
20 25 30
Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
35 40 45
Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
50 55 60
Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
65 70 75 80
Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
85 90 95
Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
100 105 110
Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
115 120 125
Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
130 135 140

ES 2 445 018 B1

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
145 150 155 160

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
165 170 175

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
180 185

<210> 5
<211> 2124
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos b12

<400> 5
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg 1020
aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc ccgacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgcctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtacggc atggacgagc tgtacaaggg taccgagctg 1440

tacaagtccg gcgggagcgg atccggcggc cagtccggtg gcagtggaag tgggtcaaagt 1500
 ggttccggta gtggaggcca gagtggtagt ggaagtggcc aatccggact cagatctgtc 1560
 aaacttacat cagacttcga caacccaaga tggattggac gacacaagca tatgttcaat 1620
 ttccttgatg tcaaccacaa tggaaaaatc tctcttgacg agatgggtcta caagggcatct 1680
 gatattgtca tcaataacct tggagcaaca cctgagcaag ccaaacgaca caaagatgct 1740
 gtggaagcct tcttcggagg agctggaatg aaatatgggtg tggaaactga ttggcctgca 1800
 tatattgaag gatggaaaaa attggctact gatgaattgg agaaatacgc caaaaacgaa 1860
 ccaaccctca tccgcatctg gggatgatgct ttgtttgata tcgttgacaa agatcaaaat 1920
 ggagctatta cactggatga atggaaagca tacaccaaag ctgctgggtat catccaatca 1980
 tcagaagatt gcgaggaaac attcagagtg tgcgatattg atgaaagtgg acaactcgat 2040
 gttgatgaga tgacaagaca gcatctggga ttttgggtaca ccatggatcc tgcttgcgaa 2100
 aagctctacg gtggagctgt cccc 2124

<210> 6
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos b12

<400> 6

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140

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

Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Thr Glu Leu
 465 470 475 480
 Tyr Lys Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gln Ser Gly Gly Ser Gly
 485 490 495
 Ser Gly Gln Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Ser Gly Ser Gly Ser
 500 505 510
 Gly Gln Ser Gly Leu Arg Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn
 515 520 525
 Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val
 530 535 540
 Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser
 545 550 555 560
 Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg
 565 570 575
 His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr
 580 585 590
 Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu
 595 600 605
 Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile
 610 615 620
 Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn
 625 630 635 640
 Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly
 645 650 655
 Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp
 660 665 670
 Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His
 675 680 685

ES 2 445 018 B1

Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly
690 695 700

Gly Ala Val Pro
705

<210> 7
<211> 2094
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos a1

<400> 7
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aaggcgggcc ccctgccctt cgcttgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgctgatg 1020
aacttcgagg acggcgggtc ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcagggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt accccgcga cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtacggc atggacgagc tgtacaaggg taccgagctg 1440
tacaagtccg gcgggagcgg atccggcggc cagtccggta gtggaggcca gagtggtagt 1500
ggaagtggcc aatccggact cagatctgtc aaacttacat cagacttcga caaccaaga 1560

tggattggac gacacaagca tatgttcaat ttccttgatg tcaaccacaa tggaaaaatc 1620
tctcttgacg agatgggtcta caaggcatct gatattgtca tcaataacct tggagcaaca 1680
cctgagcaag ccaaacgaca caaagatgct gtggaagcct tcttcggagg agctggaatg 1740
aaatatggtg tggaaactga ttggcctgca tatattgaag gatggaaaaa attggctact 1800
gatgaattgg agaaatacgc caaaaacgaa ccaaccctca tccgcatctg gggatgatgct 1860
ttgtttgata tcgttgacaa agatcaaaaat ggagctatta cactggatga atggaaagca 1920
tacaccaaag ctgctgggtat catccaatca tcagaagatt gcgaggaaac attcagagtg 1980
tgcgatattg atgaaagtgg acaactcgat gttgatgaga tgacaagaca gcatctggga 2040
ttttggtaca ccatggatcc tgcttgcgaa aagctctacg gtggagctgt cccc 2094

<210> 8
<211> 698
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos a1
<400> 8

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175
 Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190
 Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205
 Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220
 Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
 245 250 255
 Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
 260 265 270
 Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
 275 280 285
 Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn

ES 2 445 018 B1

435		440		445
Glu Asp Tyr Thr Ile Val	Glu Gln Tyr Glu Arg Ser	Glu Gly Arg His		
450	455	460		
His Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Thr Glu Leu				
465	470	475		480
Tyr Lys Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gln Ser Gly Ser Gly Gly				
	485	490		495
Gln Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Ser Gly Leu Arg Ser Val Lys Leu				
	500	505		510
Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met				
	515	520		525
Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu				
	530	535		540
Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr				
545	550	555		560
Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly				
	565	570		575
Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile				
	580	585		590
Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys				
	595	600		605
Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile				
	610	615		620
Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala				
625	630	635		640
Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu				
	645	650		655
Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp				
	660	665		670
Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala				
	675	680		685
Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro				
	690	695		

<210> 9
<211> 1950

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos A3

<400> 9

atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag	60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag	120
ggcaccacga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcttgggac	180
atcctgtccc cccagttcat gtacgggtcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc	240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc	300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgacccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac	360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag	420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc	480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc	540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg	600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc	660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc	720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc	780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc	840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc	900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc	960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggt tcaagtggga gcgctgatg	1020
aacttcgagg acggcgggtc ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg	1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcagggccc cgtaatgcag	1140
aagaagacca tgggctggga ggccctcacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg	1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc	1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc	1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc	1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ccaagatgga ttggacgaca caagcatatg	1440
ttcaatttcc ttgatgtcaa ccacaatgga aaaatctctc ttgacgagat ggtctacaag	1500
gcatctgata ttgtcatcaa taaccttgga gcaacacctg agcaagccaa acgacacaaa	1560
gatgctgtgg aagccttctt cggaggagct ggaatgaaat atggtgtgga aactgattgg	1620
cctgcatata ttgaaggatg gaaaaaattg gctactgatg aattggagaa atacgcaaaa	1680
aacgaaccaa ccctcatccg catctggggt gatgctttgt ttgatatcgt tgacaaagat	1740
caaatggag ctattacact ggatgaatgg aaagcataca ccaaagctgc tggatatcatc	1800
caatcatcag aagattgcga ggaaacattc agagtgtgcg atattgatga aagtggacaa	1860

ctcgatgttg atgagatgac aagacagcat ctgggatttt ggtacaccat ggatcctgct 1920
 tgcgaaaagc tctacggtgg agctgtcccc 1950

<210> 10
 <211> 650
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos A3

<400> 10

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175

Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190

Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205

Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220

Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
 245 250 255
 Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
 260 265 270
 Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
 275 280 285
 Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Ser Gly Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met
 465 470 475 480
 Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu
 485 490 495

Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr
500 505 510

Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly
515 520 525

Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile
530 535 540

Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys
545 550 555 560

Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile
565 570 575

Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala
580 585 590

Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu
595 600 605

Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp
610 615 620

Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala
625 630 635 640

Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645 650

<210> 11
<211> 1941
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos B2

<400> 11
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacga ccgccaagct gaaggtgacc aaggcgggcc ccctgccctt cgcctgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600

ES 2 445 018 B1

gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
 cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
 gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
 atggaggggt ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
 tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
 tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
 gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
 aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
 ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
 aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
 aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
 aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
 aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
 gagggccgcc accactccgg accaagatgg attggacgac acaagcatat gttcaatttc 1440
 cttgatgtca accacaatgg aaaaatctct cttgacgaga tggctctaaa ggcattctgat 1500
 attgtcatca ataaccttg agcaacacct gagcaagcca aacgacacaa agatgctgtg 1560
 gaagccttct tcggaggagc tggaatgaaa tatggtgtgg aaactgattg gcctgcatat 1620
 attgaaggat ggaaaaaatt ggctactgat gaattggaga aatacgccaa aaacgaacca 1680
 accctcatcc gcatctgggg tgatgctttg tttgatatcg ttgacaaaga tcaaatgga 1740
 gctattacac tggatgaatg gaaagcatac accaaagctg ctggtatcat ccaatcatca 1800
 gaagattgag aggaacatt cagagtgtgc gatattgatg aaagtggaca actcgatgtt 1860
 gatgagatga caagacagca tctgggattt tggtagacca tggatcctgc ttgcgaaaag 1920
 ctctacggtg gagctgtccc c 1941

<210> 12
 <211> 647
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos B2

<400> 12

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

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

ES 2 445 018 B1

Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Ser Gly Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe
 465 470 475 480
 Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr
 485 490 495
 Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln
 500 505 510
 Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly
 515 520 525
 Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp
 530 535 540
 Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro
 545 550 555 560
 Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys
 565 570 575
 Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys
 580 585 590
 Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg

ES 2 445 018 B1

595 600 605

Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr
610 615 620

Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys
625 630 635 640

Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645

<210> 13
<211> 1986
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos AW

<400> 13
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccacg gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgctgatg 1020
aacttcgagg acggcgggtc ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagtgc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgcccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380

gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ctcatatctg tcaaacttac atcagacttc 1440
gacaacccaa gatggattgg acgacacaag catatgttca atttccttga tgtcaaccac 1500
aatggaaaaa tctctcttga cgagatgggtc tacaaggcat ctgatattgt catcaataac 1560
cttggagcaa cacctgagca agccaaacga cacaagatg ctgtggaagc cttcttcgga 1620
ggagctggaa tgaaatatgg tgtggaaact gattggcctg catatattga aggatggaaa 1680
aaattggcta ctgatgaatt ggagaaatac gccaaaaacg aaccaaccct catccgcac 1740
tggggtgatg ctttgtttga tatcgttgac aaagatcaaa atggagctat tacactggat 1800
gaatggaaag catacaccaa agctgctggg atcatccaat catcagaaga ttgagaggaa 1860
acattcagag tgtgcgatat tgatgaaagt ggacaactcg atgttgatga gatgacaaga 1920
cagcatctgg gatttttgta caccatggat cctgcttgcg aaaagctcta cggtggagct 1980
gtcccc 1986

<210> 14
<211> 662
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos AW
<400> 14

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

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

ES 2 445 018 B1

Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Ser Gly Leu Arg Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe
 465 470 475 480
 Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu
 485 490 495
 Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys
 500 505 510
 Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala
 515 520 525
 Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met
 530 535 540
 Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys
 545 550 555 560
 Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr
 565 570 575
 Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp
 580 585 590
 Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala
 595 600 605
 Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val
 610 615 620
 Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg
 625 630 635 640
 Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu
 645 650 655
 Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 660

<210> 15
 <211> 1977
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos BW

<400> 15

atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gtttcaaggt gcgcatggag	60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag	120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac	180
atcctgtccc cccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc	240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc	300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgacccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac	360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag	420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc	480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc	540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg	600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc	660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc	720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc	780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc	840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc	900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc	960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgctgatg	1020
aacttcgagg acggcgggtc ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg	1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag	1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg	1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc	1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc	1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc	1380
gagggccgcc accactccgg actcagatct gtcaaactta catcagactt cgacaacca	1440
agatggattg gacgacacaa gcatatgttc aatttccttg atgtcaacca caatggaaaa	1500
atctctcttg acgagatggc ctacaaggca tctgatattg tcatcaataa ctttgagca	1560
acacctgagc aagccaaacg acacaaagat gctgtggaag ctttcttcgg aggagctgga	1620
atgaaatatg gtgtggaaac tgattggcct gcatatattg aaggatggaa aaaattggct	1680
actgatgaat tggagaaata cgccaaaaac gaaccaacc tcatccgcat ctggggtgat	1740
gctttgtttg atatcgttga caaagatcaa aatggagcta ttacactgga tgaatggaaa	1800
gcatacacca aagctgctgg tatcatccaa tcatcagaag attgagagga aacattcaga	1860
gtgtgcgata ttgatgaaag tggacaactc gatgttgatg agatgacaag acagcatctg	1920
ggattttggg acaccatgga tcctgcttgc gaaaagctct acggtggagc tgtcccc	1977

<210> 16
 <211> 659
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos BW

<400> 16

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175

Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190

Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205

Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220

Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr

ES 2 445 018 B1

225		230		235		240
Ala Ser Ser Glu Asp 245 Asn Asn Met Ala Val 250 Ile Lys Glu Phe Met 255 Arg						
Phe Lys Val Arg 260 Met Glu Gly Ser Met 265 Asn Gly His Glu Phe 270 Glu Ile						
Glu Gly Glu 275 Gly Glu Gly Arg Pro 280 Tyr Glu Gly Thr Gln 285 Thr Ala Lys						
Leu Lys Val 290 Thr Lys Gly 295 Pro Leu Pro Phe Ala 300 Trp Asp Ile Leu						
Ser 305 Pro Gln Phe Met Tyr 310 Gly Ser Lys Ala Tyr 315 Val Lys His Pro Ala 320						
Asp Ile Pro Asp Tyr 325 Lys Lys Leu Ser Phe 330 Pro Glu Gly Phe Lys 335 Trp						
Glu Arg Val 340 Met Asn Phe Glu Asp Gly 345 Gly Leu Val Thr Val 350 Thr Gln						
Asp Ser Ser 355 Leu Gln Asp Gly Thr 360 Leu Ile Tyr Lys Val 365 Lys Met Arg						
Gly Thr 370 Asn Phe Pro Pro Asp 375 Gly Pro Val Met Gln 380 Lys Lys Thr Met						
Gly 385 Trp Glu Ala Ser Thr 390 Glu Arg Leu Tyr Pro 395 Arg Asp Gly Val Leu 400						
Lys Gly Glu Ile His 405 Gln Ala Leu Lys Leu 410 Lys Asp Gly Gly His 415 Tyr						
Leu Val Glu 420 Phe Lys Thr Ile Tyr Met 425 Ala Lys Lys Pro Val 430 Gln Leu						
Pro Gly Tyr 435 Tyr Tyr Val Asp Thr 440 Lys Leu Asp Ile Thr 445 Ser His Asn						
Glu Asp 450 Tyr Thr Ile Val Glu 455 Gln Tyr Glu Arg Ser 460 Glu Gly Arg His						
His 465 Ser Gly Leu Arg Ser 470 Val Lys Leu Thr Ser 475 Asp Phe Asp Asn Pro 480						
Arg Trp Ile Gly 485 Arg His Lys His Met Phe 490 Asn Phe Leu Asp Val 495 Asn						
His Asn Gly Lys 500 Ile Ser Leu Asp Glu 505 Met Val Tyr Lys Ala 510 Ser Asp						

Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His
515 520 525

Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly
530 535 540

Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala
545 550 555 560

Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
565 570 575

Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly
580 585 590

Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile
595 600 605

Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile
610 615 620

Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
625 630 635 640

Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly
645 650 655

Ala Val Pro

<210> 17
<211> 1974
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos AE

<400> 17
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaagggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccacg gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggccact acctggtgga gttcaagacc 540

ES 2 445 018 B1

```

atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg      600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc      660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc      720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc      780
atggaggggt ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc      840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc      900
tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc      960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgcgtgatg     1020
aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg     1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc ccgacggccc cgtaatgcag     1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgcctgt acccccgca cggcgtgctg     1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc     1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc     1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc     1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga aaacttacat cagacttcga caaccaaga     1440
tggtattggac gacacaagca tatgttcaat ttccttgatg tcaaccacaa tggaaaaatc     1500
tctcttgacg agatggtcta caaggcatct gatattgtca tcaataacct tggagcaaca     1560
cctgagcaag ccaaacgaca caaagatgct gtggaagcct tcttcggagg agctggaatg     1620
aaatatggtg tggaaactga ttggcctgca tatattgaag gatggaaaaa attggctact     1680
gatgaattgg agaaatacgc caaaaacgaa ccaaccctca tccgcatctg gggatgatgt     1740
ttgtttgata tcgttgacaa agatcaaaaat ggagctatta cactggatga atggaaagca     1800
tacaccaaag ctgctggtat catccaatca tcagaagatt gcgaggaaac attcagagtg     1860
tgcgatattg atgaaagtgg acaactcgat gttgatgaga tgacaagaca gcatctggga     1920
ttttggtaca ccatggatcc tgcttgcgaa aagctctacg gtggagctgt cccc          1974

```

```

<210> 18
<211> 658
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos AE

<400> 18

```

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
1           5           10          15

```

```

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
20          25          30

```

```

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
35          40          45

```

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

Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Ser Gly Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg
 465 470 475 480
 Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His
 485 490 495
 Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile
 500 505 510
 Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys
 515 520 525
 Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val
 530 535 540
 Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile
 565 570 575
 Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala
 580 585 590

Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile
595 600 605

Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp
610 615 620

Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly
625 630 635 640

Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala
645 650 655

Val Pro

<210> 19
<211> 1959
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos AD1

<400> 19
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcggcc ccctgccctt cgcttgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cggacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgcctgt acccccgca cggcgtgctg 1200

aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgcccg gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac 1440
aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcaac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg 1500
gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttggag caacacctga gcaagccaaa 1560
cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa 1620
actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa 1680
tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggtg atgctttgtt tgatatcggt 1740
gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct 1800
ggatatcatcc aatcatcaga agattgcgag gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa 1860
agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacagcatc tgggattttg gtacaccatg 1920
gatcctgctt gcgaaaagct ctacggtgga gctgtcccc 1959

<210> 20
<211> 653
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos AD1
<400> 20

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
115 120 125

ES 2 445 018 B1

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140
 Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly
 145 150 155 160
 Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175
 Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190
 Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205
 Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220
 Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
 245 250 255
 Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
 260 265 270
 Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
 275 280 285
 Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr

ES 2 445 018 B1

				405					410					415		
Leu	Val	Glu	Phe 420	Lys	Thr	Ile	Tyr	Met 425	Ala	Lys	Lys	Pro	Val 430	Gln	Leu	
Pro	Gly	Tyr 435	Tyr	Tyr	Val	Asp	Thr 440	Lys	Leu	Asp	Ile	Thr 445	Ser	His	Asn	
Glu	Asp 450	Tyr	Thr	Ile	Val	Glu 455	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ser 460	Glu	Gly	Arg	His	
His 465	Leu	Phe	Leu	Ser	Gly 470	Phe	Asp	Asn	Pro	Arg 475	Trp	Ile	Gly	Arg	His 480	
Lys	His	Met	Phe	Asn 485	Phe	Leu	Asp	Val	Asn 490	His	Asn	Gly	Lys	Ile 495	Ser	
Leu	Asp	Glu	Met 500	Val	Tyr	Lys	Ala	Ser 505	Asp	Ile	Val	Ile	Asn 510	Asn	Leu	
Gly	Ala	Thr 515	Pro	Glu	Gln	Ala	Lys 520	Arg	His	Lys	Asp	Ala 525	Val	Glu	Ala	
Phe	Phe 530	Gly	Gly	Ala	Gly	Met 535	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu 540	Thr	Asp	Trp	Pro	
Ala 545	Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp 550	Lys	Lys	Leu	Ala	Thr 555	Asp	Glu	Leu	Glu	Lys 560	
Tyr	Ala	Lys	Asn	Glu 565	Pro	Thr	Leu	Ile	Arg 570	Ile	Trp	Gly	Asp	Ala 575	Leu	
Phe	Asp	Ile	Val 580	Asp	Lys	Asp	Gln	Asn 585	Gly	Ala	Ile	Thr	Leu 590	Asp	Glu	
Trp	Lys	Ala 595	Tyr	Thr	Lys	Ala	Ala 600	Gly	Ile	Ile	Gln	Ser 605	Ser	Glu	Asp	
Cys	Glu 610	Glu	Thr	Phe	Arg	Val 615	Cys	Asp	Ile	Asp	Glu 620	Ser	Gly	Gln	Leu	
Asp 625	Val	Asp	Glu	Met	Thr 630	Arg	Gln	His	Leu	Gly 635	Phe	Trp	Tyr	Thr	Met 640	
Asp	Pro	Ala	Cys	Glu 645	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gly 650	Ala	Val	Pro				

<210>	21
<211>	1959
<212>	DNA
<213>	Secuencia Artificial
<220>	

<223> secuencia de nucleótidos Alfa

<400> 21

atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gttcaaggt gcgcatggag	60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag	120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac	180
atcctgtccc cccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc	240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc	300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccacg gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac	360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag	420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc	480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc	540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg	600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc	660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc	720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc	780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc	840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc	900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc	960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgctgatg	1020
aacttcgagg acggcggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg	1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag	1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg	1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc	1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc	1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc	1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgac ttcgacaacc caagatggat tggacgacac	1440
aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcaac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg	1500
gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttgagg caacacctga gcaagccaaa	1560
cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa	1620
actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa	1680
tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggtg atgctttgtt tgatatcgtt	1740
gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct	1800
ggtatcatcc aatcatcaga agattgcgag gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa	1860
agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacagcatc tgggattttg gtacaccatg	1920
gatcctgctt gcgaaaagct ctacgggtgga gctgtcccc	1959

<210> 22
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos Alfa

<400> 22

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175

Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190

Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205

Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220

Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240

Ala Ser Ser Glu Asp₂₄₅ Asn Asn Met Ala Val₂₅₀ Ile Lys Glu Phe Met₂₅₅ Arg
 Phe Lys Val Arg₂₆₀ Met Glu Gly Ser Met₂₆₅ Asn Gly His Glu Phe₂₇₀ Glu Ile
 Glu Gly Glu₂₇₅ Gly Glu Gly Arg Pro₂₈₀ Tyr Glu Gly Thr Gln₂₈₅ Thr Ala Lys
 Leu Lys₂₉₀ Val Thr Lys Gly Gly₂₉₅ Pro Leu Pro Phe Ala₃₀₀ Trp Asp Ile Leu
 Ser₃₀₅ Pro Gln Phe Met Tyr₃₁₀ Gly Ser Lys Ala Tyr₃₁₅ Val Lys His Pro Ala₃₂₀
 Asp Ile Pro Asp Tyr₃₂₅ Lys Lys Leu Ser Phe₃₃₀ Pro Glu Gly Phe Lys₃₃₅ Trp
 Glu Arg Val Met₃₄₀ Asn Phe Glu Asp Gly₃₄₅ Gly Leu Val Thr Val₃₅₀ Thr Gln
 Asp Ser Ser₃₅₅ Leu Gln Asp Gly Thr₃₆₀ Leu Ile Tyr Lys Val₃₆₅ Lys Met Arg
 Gly Thr₃₇₀ Asn Phe Pro Pro Asp₃₇₅ Gly Pro Val Met Gln₃₈₀ Lys Lys Thr Met
 Gly₃₈₅ Trp Glu Ala Ser Thr₃₉₀ Glu Arg Leu Tyr Pro₃₉₅ Arg Asp Gly Val Leu₄₀₀
 Lys Gly Glu Ile His₄₀₅ Gln Ala Leu Lys Leu₄₁₀ Lys Asp Gly Gly His₄₁₅ Tyr
 Leu Val Glu Phe₄₂₀ Lys Thr Ile Tyr Met₄₂₅ Ala Lys Lys Pro Val₄₃₀ Gln Leu
 Pro Gly Tyr₄₃₅ Tyr Tyr Val Asp Thr₄₄₀ Lys Leu Asp Ile Thr₄₄₅ Ser His Asn
 Glu Asp₄₅₀ Tyr Thr Ile Val Glu₄₅₅ Gln Tyr Glu Arg Ser₄₆₀ Glu Gly Arg His
 His₄₆₅ Leu Phe Leu Ser Asp₄₇₀ Phe Asp Asn Pro Arg₄₇₅ Trp Ile Gly Arg His₄₈₀
 Lys His Met Phe Asn₄₈₅ Phe Leu Asp Val Asn₄₉₀ His Asn Gly Lys Ile₄₉₅ Ser
 Leu Asp Glu Met₅₀₀ Val Tyr Lys Ala Ser₅₀₅ Asp Ile Val Ile Asn₅₁₀ Asn Leu

Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
515 520 525

Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
530 535 540

Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
545 550 555 560

Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
565 570 575

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
580 585 590

Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
595 600 605

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
610 615 620

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
625 630 635 640

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645 650

<210> 23
<211> 1959
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos Beta

<400> 23
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaagggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcttgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaagggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720

gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggaggggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcgga gggccgcccc 840
tacgaggggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcgggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggct tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
aacttcgagg acggcggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgct gctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac 1440
aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcaac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg 1500
gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttgag caacacctga gcaagccaaa 1560
cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa 1620
actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa 1680
tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggtg atgctttgtt tgatatcggt 1740
gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct 1800
ggatatcatcc aatcatcaga agattgagc gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa 1860
agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacagcatc tgggattttg gtacaccatg 1920
gatcctgctt gcgaaaagct ctacgggtgga gctgtcccc 1959

<210> 24
<211> 653
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos Beta
<400> 24

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

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

ES 2 445 018 B1

Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Leu Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
 465 470 475 480
 Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser
 485 490 495
 Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
 500 505 510
 Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
 515 520 525
 Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
 530 535 540
 Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
 565 570 575
 Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
 580 585 590
 Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
 595 600 605
 Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu

ES 2 445 018 B1

610	615	620	
Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met			
625	630	635	640
Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro			
	645	650	
<210>	25		
<211>	1977		
<212>	DNA		
<213>	Secuencia Artificial		
<220>			
<223>	secuencia de nucleótidos ADiFL		
<400>	25		
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag			60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag			120
ggcaccacga ccgccaagct gaaggtgacc aaggcgggcc cctgcccctt cgccctgggac			180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc			240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc			300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac			360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag			420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc			480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc			540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg			600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc			660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc			720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc			780
atggaggggt ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc			840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc			900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc			960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg			1020
aacttcgagg acggcgggtt ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg			1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag			1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt accccgcga cggcgtgctg			1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc			1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc			1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc			1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccggc gggagcggat cctccggatt cgacaacca			1440
agatggattg gacgacacaa gcatatgttc aatttccttg atgtcaacca caatggaaaa			1500

atctctcttg acgagatggt ctacaaggca tctgatattg tcatcaataa ccttggagca 1560
acacctgagc aagccaaacg acacaaagat gctgtggaag ctttcttcgg aggagctgga 1620
atgaaatatg gtgtggaaac tgattggcct gcatttattg aaggatggaa aaaattggct 1680
actgatgaat tggagaaata cgccaaaaac gaaccaaccc tcatccgcat ctgggggtgat 1740
gctttgtttg atatcgttga caaagatcaa aatggagcta ttacactgga tgaatggaaa 1800
gcatacacca aagctgctgg tatcatccaa tcatcagaag attgcgagga aacattcaga 1860
gtgtgcgata ttgatgaaag tggacaactc gatgttgatg agatgacaag acagcatctg 1920
ggatttttgt acaccatgga tcctgcttgc gaaaagctct acggtggagc tgtcccc 1977

<210> 26
<211> 659
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos ADiFL
<400> 26

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val

ES 2 445 018 B1

165								170				175			
Glu	Phe	Lys	Thr	Ile	Tyr	Met	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Gln	Leu	Pro	Gly
			180					185					190		
Tyr	Tyr	Tyr	Val	Asp	Thr	Lys	Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	His	Asn	Glu	Asp
		195					200					205			
Tyr	Thr	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ser	Glu	Gly	Arg	His	His	Leu
	210					215					220				
Phe	Leu	Gly	His	Gly	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr
225					230					235					240
Ala	Ser	Ser	Glu	Asp	Asn	Asn	Met	Ala	Val	Ile	Lys	Glu	Phe	Met	Arg
				245					250					255	
Phe	Lys	Val	Arg	Met	Glu	Gly	Ser	Met	Asn	Gly	His	Glu	Phe	Glu	Ile
			260					265					270		
Glu	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Arg	Pro	Tyr	Glu	Gly	Thr	Gln	Thr	Ala	Lys
		275					280					285			
Leu	Lys	Val	Thr	Lys	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	Ala	Trp	Asp	Ile	Leu
	290					295					300				
Ser	Pro	Gln	Phe	Met	Tyr	Gly	Ser	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	His	Pro	Ala
305					310					315					320
Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Phe	Lys	Trp
				325					330					335	
Glu	Arg	Val	Met	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Thr	Val	Thr	Gln
			340					345					350		
Asp	Ser	Ser	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Lys	Met	Arg
		355					360					365			
Gly	Thr	Asn	Phe	Pro	Pro	Asp	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	Thr	Met
	370					375					380				
Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Arg	Asp	Gly	Val	Leu
385					390					395					400
Lys	Gly	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Gly	His	Tyr
				405					410					415	
Leu	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Ile	Tyr	Met	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Gln	Leu
			420					425					430		
Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Asp	Thr	Lys	Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	His	Asn
		435					440					445			

Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
450 455 460

His Leu Phe Leu Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Phe Asp Asn Pro
465 470 475 480

Arg Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn
485 490 495

His Asn Gly Lys Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp
500 505 510

Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His
515 520 525

Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly
530 535 540

Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Phe Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala
545 550 555 560

Thr Asp Glu Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg
565 570 575

Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly
580 585 590

Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile
595 600 605

Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile
610 615 620

Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu
625 630 635 640

Gly Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly
645 650 655

Ala Val Pro

<210> 27
<211> 1959
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos ADiF

<400> 27
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag

ES 2 445 018 B1

```

ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag      120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac      180
atcctgtccc cccagttcat gtacgggtcc aaggcgtagc tgaagcacc cgcgcacatc      240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcggt gatgaacttc      300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgacccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac      360
tacaagggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag      420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc      480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggccact acctggtgga gttcaagacc      540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg      600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc      660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc      720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc      780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc      840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcgggccccct gcccttcgcc      900
tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc      960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgcgtgatg     1020
aacttcgagg acggcgggtc ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg     1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag     1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg     1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc     1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc     1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc     1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac     1440
aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcaac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg     1500
gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttgag caacacctga gcaagccaaa     1560
cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa     1620
actgattggc ctgcatttat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa     1680
tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggt atgctttgtt tgatatcggt     1740
gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct     1800
ggtatcatcc aatcatcaga agattgagc gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa     1860
agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacagcatc tgggattttg gtacaccatg     1920
gatcctgctt gcgaaaagct ctacggtgga gctgtcccc      1959

```

```

<210> 28
<211> 653
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

```

<220>

<223> secuencia de aminoácidos ADiF

<400> 28

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
165 170 175

Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
180 185 190

Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
195 200 205

Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
210 215 220

Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
225 230 235 240

Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
245 250 255

Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
 260 265 270
 Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
 275 280 285
 Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
 465 470 475 480
 Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser
 485 490 495
 Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
 500 505 510
 Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
 515 520 525

ES 2 445 018 B1

Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
530 535 540

Ala Phe Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
545 550 555 560

Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
565 570 575

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
580 585 590

Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
595 600 605

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
610 615 620

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
625 630 635 640

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645 650

<210> 29
<211> 1959
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos ADN

<400> 29
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacga ccgccaagct gaaggtgacc aaggcgggcc ccctgccctt cgcttgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgctg gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840

tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
 tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
 gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggct tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
 aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
 ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
 aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
 aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagtcc 1260
 aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
 aagctggaca tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
 gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac 1440
 aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcgac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg 1500
 gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttgag caacacctga gcaagccaaa 1560
 cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa 1620
 actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa 1680
 tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggtg atgctttgtt tgatatcggt 1740
 gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct 1800
 ggtatcatcc aatcatcaga agattgagc gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa 1860
 agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacagcatc tgggattttg gtacaccatg 1920
 gatcctgctt gcgaaaagct ctacgggtgga gctgtcccc 1959

<210> 30
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos ADN
 <400> 30

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

ES 2 445 018 B1

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

ES 2 445 018 B1

355						360						365					
Gly	Thr	Asn	Phe	Pro	Pro	Asp	Gly	Pro	Val	Met	Gln	Lys	Lys	Thr	Met		
370						375					380						
Gly	Trp	Glu	Ala	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Arg	Asp	Gly	Val	Leu		
385					390					395					400		
Lys	Gly	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Gly	Gly	His	Tyr		
				405					410					415			
Leu	Val	Glu	Phe	Lys	Thr	Ile	Tyr	Met	Ala	Lys	Lys	Pro	Val	Gln	Leu		
			420					425					430				
Pro	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Asp	Thr	Lys	Leu	Asp	Ile	Thr	Ser	His	Asn		
		435					440					445					
Glu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ser	Glu	Gly	Arg	His		
	450					455					460						
His	Leu	Phe	Leu	Ser	Gly	Phe	Asp	Asn	Pro	Arg	Trp	Ile	Gly	Arg	His		
465					470					475					480		
Lys	His	Met	Phe	Asn	Phe	Leu	Asp	Val	Asp	His	Asn	Gly	Lys	Ile	Ser		
				485					490					495			
Leu	Asp	Glu	Met	Val	Tyr	Lys	Ala	Ser	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Asn	Leu		
			500					505					510				
Gly	Ala	Thr	Pro	Glu	Gln	Ala	Lys	Arg	His	Lys	Asp	Ala	Val	Glu	Ala		
		515					520					525					
Phe	Phe	Gly	Gly	Ala	Gly	Met	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	Thr	Asp	Trp	Pro		
	530					535					540						
Ala	Tyr	Ile	Glu	Gly	Trp	Lys	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Glu	Leu	Glu	Lys		
545					550					555					560		
Tyr	Ala	Lys	Asn	Glu	Pro	Thr	Leu	Ile	Arg	Ile	Trp	Gly	Asp	Ala	Leu		
				565					570					575			
Phe	Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Asp	Gln	Asn	Gly	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu		
			580					585					590				
Trp	Lys	Ala	Tyr	Thr	Lys	Ala	Ala	Gly	Ile	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp		
		595					600					605					
Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	Arg	Val	Cys	Asp	Ile	Asp	Glu	Ser	Gly	Gln	Leu		
	610					615					620						
Asp	Val	Asp	Glu	Met	Thr	Arg	Gln	His	Leu	Gly	Phe	Trp	Tyr	Thr	Met		
625					630					635					640		

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645 650

<210> 31
<211> 1959
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos ADQ

<400> 31
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gtttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcctgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgt gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccacg gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccggctact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggaggggt ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcacccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgaggggt tcaagtggga gcgctgatg 1020
aacttcgagg acggcggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc ccgacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac 1440
aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcaac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg 1500
gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttggag caacacctga gcaagccaaa 1560
cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa 1620

actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa 1680
 tacgccaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctgggggtg atgctttgtt tgatatcggt 1740
 gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct 1800
 ggtatcatcc aatcatcaga agattgcgag gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa 1860
 agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacgacatc tgggattttg gtacaccatg 1920
 gatcctgctt gcgaaaagct ctacggtgga gctgtcccc 1959

<210> 32
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos ADQ

<400> 32

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys
 35 40 45

Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro
 50 55 60

Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg
 85 90 95

Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser
 100 105 110

Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr
 115 120 125

Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp
 130 135 140

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

Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val
 165 170 175

Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly
 180 185 190

Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp
 195 200 205
 Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu
 210 215 220
 Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly Thr
 225 230 235 240
 Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg
 245 250 255
 Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile
 260 265 270
 Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys
 275 280 285
 Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460

ES 2 445 018 B1

His Leu Phe Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
 465 470 475 480
 Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser
 485 490 495
 Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
 500 505 510
 Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
 515 520 525
 Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
 530 535 540
 Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
 565 570 575
 Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
 580 585 590
 Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
 595 600 605
 Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
 610 615 620
 Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
 625 630 635 640
 Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
 645 650

<210> 33
 <211> 1959
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos ADNQ

<400> 33
 atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
 ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
 ggcacccaga ccgccaagct gaaggtgacc aagggcgggc ccctgccctt cgcttgggac 180
 atcctgtccc cccagttcat gtacgggtcc aaggcgtacg tgaagcacc cgccgacatc 240
 cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
 gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360

tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
 accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480
 gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
 atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg 600
 gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
 cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
 gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
 atggagggct ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
 tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
 tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
 gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggtt tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
 aacttcgagg acggcggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcagc 1080
 ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
 aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
 aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
 aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
 aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
 gagggccgcc accacctgtt cctgtccgga ttcgacaacc caagatggat tggacgacac 1440
 aagcatatgt tcaatttcct tgatgtcgac cacaatggaa aaatctctct tgacgagatg 1500
 gtctacaagg catctgatat tgtcatcaat aaccttgag caacacctga gcaagccaaa 1560
 cgacacaaag atgctgtgga agccttcttc ggaggagctg gaatgaaata tgggtgtggaa 1620
 actgattggc ctgcatatat tgaaggatgg aaaaaattgg ctactgatga attggagaaa 1680
 tacgcaaaaa acgaaccaac cctcatccgc atctggggtg atgctttgtt tgatatcggt 1740
 gacaaagatc aaaatggagc tattacactg gatgaatgga aagcatacac caaagctgct 1800
 ggtatcatcc aatcatcaga agattgcgag gaaacattca gagtgtgcga tattgatgaa 1860
 agtggacaac tcgatgttga tgagatgaca agacgacatc tgggattttg gtacaccatg 1920
 gatcctgctt gcgaaaagct ctacggtgga gctgtcccc 1959

<210> 34
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos ADNQ

<400> 34

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

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

ES 2 445 018 B1

Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu
 290 295 300
 Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp
 325 330 335
 Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln
 340 345 350
 Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg
 355 360 365
 Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met
 370 375 380
 Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr
 405 410 415
 Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu
 420 425 430
 Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn
 435 440 445
 Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His
 450 455 460
 His Leu Phe Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His
 465 470 475 480
 Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asp His Asn Gly Lys Ile Ser
 485 490 495
 Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu
 500 505 510
 Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala
 515 520 525
 Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro
 530 535 540
 Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu

ES 2 445 018 B1

565 570 575

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
580 585 590

Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
595 600 605

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
610 615 620

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
625 630 635 640

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
645 650

<210> 35
<211> 1344
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos CITA

<400> 35

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca ctttcggcta cggcctgatg tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcgga tcacatgggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagggg	720
accgagctgt acaagtccgg cgggagcgga tccggcggcc agtccggact cagatctgtc	780
aaacttacat cagacttcga caacccaaga tggattggac gacacaagca tatgttcaat	840
ttccttgatg tcaaccacaa tggaaaaatc tctcttgacg agatgggtcta caaggcatct	900
gatattgtca tcaataacct tggagcaaca cctgagcaag ccaaacgaca caaagatgct	960
gtggaagccc tcttcggagg agctggaatg aaatatggtg tggaaactga ttggcctgca	1020
tatattgaag gatggaaaaa attggctact gatgaattgg agaaatacgc caaaaacgaa	1080
ccaaccctca tccgcatctg ggggtgatgct ttgtttgata tcgttgacaa agatcaaaat	1140

ggagccatta cactggatga atggaaagca tacaccaaag ctgctggtat catccaatca 1200
 tcagaagatt gcgaggaaac attcagagtg tgcgatattg atgaaagtgg acaactcgat 1260
 gttgatgaga tgacaagaca gcatctggga ttttgggtaca ccatggatcc tgcttgcgaa 1320
 aagctctacg gtggagctgt cccc 1344

<210> 36
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos Cita
 <400> 36

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

ES 2 445 018 B1

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

<210> 37
 <211> 2058
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos mitoAD1

<400> 37

atgtccgtcc	tgacgccgct	gctgctgcgg	ggcttgacag	gctcggccccg	gcgggtccca	60
gtgccgcgcg	ccaagatcca	ttcgttgaag	cttgccacca	tggtgagcaa	gggcgaggag	120
gtcatcaaag	agttcatgcg	cttcaagggtg	cgcatggagg	gctccatgaa	cggccacgag	180
ttcgagatcg	agggcgagg	cgagggccgc	ccctacgagg	gcaccagac	cgccaagctg	240
aaggtgacca	agggcgcccc	cctgcccttc	gcctgggaca	tcctgtcccc	ccagttcatg	300
tacggctcca	aggcgtacgt	gaagcacccc	gccgacatcc	ccgattacaa	gaagctgtcc	360
ttccccgagg	gcttcaagtg	ggagcgcgtg	atgaacttcg	aggacggcgg	tctggtgacc	420
gtgaccagc	actcctccct	gcaggacggc	acgtgatct	acaaggtgaa	gatgcgcggc	480
accaacttcc	ccccgacgg	ccccgtaatg	cagaagaaga	ccatgggctg	ggaggcctcc	540
accgagcgc	tgtacccccg	cgacggcgtg	ctgaaggcg	agatccacca	ggcctgaag	600
ctgaaggacg	gcggccacta	cctggtggag	ttcaagacca	tctacatggc	caagaagccc	660
gtgcaactgc	ccggctacta	ctacgtggac	accaagctgg	acatcacctc	ccacaacgag	720
gactacacca	tcgtggaaca	gtacgagcgc	tccgagggcc	gccaccacct	gttcctgggg	780
catggcaccg	gcagcaccgg	cagcggcagc	tccggcaccg	cctcctccga	ggacaacaac	840
atggccgtca	tcaaagagtt	catgcgcttc	aaggtgcgca	tggagggtc	catgaacggc	900
cacgagttcg	agatcgagg	cgagggcgag	ggccgcccct	acgagggcac	ccagaccgcc	960
aagctgaagg	tgaccaagg	cggccccctg	cccttcgcct	gggacatcct	gtccccccag	1020
ttcatgtacg	gctccaagg	gtacgtgaag	caccccgccg	acatccccga	ttacaagaag	1080
ctgtccttcc	ccgagggtt	caagtgggag	cgctgatga	acttcgagga	cggcggctctg	1140
gtgaccgtga	cccaggactc	ctccctgcag	gacggcacgc	tgatctacaa	ggtgaagatg	1200
cgcggcacca	acttcccccc	cgacggcccc	gtaatgcaga	agaagaccat	gggctgggag	1260
gcctccaccg	agcgcctgta	ccccgcgac	ggcgtgctga	agggcgagat	ccaccaggcc	1320
ctgaagctga	aggacggcgg	ccactacctg	gtggagtta	agaccatcta	catggccaag	1380
aagcccgtgc	aactgcccgg	ctactactac	gtggacacca	agctggacat	cacctccac	1440
aacgaggact	acaccatcgt	ggaacagtac	gagcgtccg	agggccgcca	ccacctgttc	1500
ctgtccggat	tcgacaaccc	aagatggatt	ggacgacaca	agcatatgtt	caatttcctt	1560
gatgtcaacc	acaatggaaa	aatctctctt	gacgagatgg	tctacaaggc	atctgatatt	1620
gtcatcaata	accttggagc	aacacctgag	caagccaaac	gacacaaaga	tgctgtggaa	1680
gccttcttcg	gaggagctgg	aatgaaatat	ggtgtggaaa	ctgattggcc	tgcatatatt	1740
gaaggatgga	aaaaattggc	tactgatgaa	ttggagaaat	acgcaaaaa	cgaaccaacc	1800
ctcatccgca	tctggggtga	tgctttgttt	gatatcgttg	acaaagatca	aaatggagct	1860
attacactgg	atgaatggaa	agcatacacc	aaagctgctg	gtatcatcca	atcatcagaa	1920
gattgcgagg	aaacattcag	agtgtgcgat	attgatgaaa	gtggacaact	cgatgttgat	1980

gagatgacaa gacagcatct gggattttgg tacacatgg atcctgcttg cgaaaagctc 2040
 tacggtggag ctgtcccc 2058

<210> 38
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos mitoAD1

<400> 38

Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu Lys Leu Ala
 20 25 30

Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe
 35 40 45

Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu
 50 55 60

Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu
 65 70 75 80

Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser
 85 90 95

Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp
 100 105 110

Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu
 115 120 125

Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp
 130 135 140

Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly
 145 150 155 160

Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly
 165 170 175

Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys
 180 185 190

Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu
 195 200 205

Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro

ES 2 445 018 B1

210	215	220
Gly Tyr Tyr Tyr Val 225	Asp Thr Lys Leu Asp 230	Ile Thr Ser His Asn Glu 235 240
Asp Tyr Thr Ile Val 245	Glu Gln Tyr Glu Arg 250	Ser Glu Gly Arg His His 255
Leu Phe Leu Gly His 260	Gly Thr Gly Ser 265	Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly 270
Thr Ala Ser Ser Glu 275	Asp Asn Asn Met 280	Ala Val Ile Lys Glu Phe Met 285
Arg Phe Lys Val Arg 290	Met Glu Gly Ser Met 295	Asn Gly His Glu Phe Glu 300
Ile Glu Gly Glu Gly 305	Glu Gly Arg Pro Tyr 310	Glu Gly Thr Gln Thr Ala 315 320
Lys Leu Lys Val Thr 325	Lys Gly Gly Pro 330	Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile 335
Leu Ser Pro Gln Phe 340	Met Tyr Gly Ser 345	Lys Ala Tyr Val Lys His Pro 350
Ala Asp Ile Pro Asp 355	Tyr Lys Lys Leu Ser 360	Phe Pro Glu Gly Phe Lys 365
Trp Glu Arg Val Met 370	Asn Phe Glu Asp 375	Gly Gly Leu Val Thr Val Thr 380
Gln Asp Ser Ser Leu 385	Gln Asp Gly Thr 390	Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met 395 400
Arg Gly Thr Asn Phe 405	Pro Pro Asp Gly 410	Pro Val Met Gln Lys Lys Thr 415
Met Gly Trp Glu Ala 420	Ser Thr Glu Arg 425	Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val 430
Leu Lys Gly Glu Ile 435	His Gln Ala Leu 440	Lys Leu Lys Asp Gly Gly His 445
Tyr Leu Val Glu Phe 450	Lys Thr Ile Tyr 455	Met Ala Lys Lys Pro Val Gln 460
Leu Pro Gly Tyr Tyr 465	Tyr Val Asp Thr 470	Lys Leu Asp Ile Thr Ser His 475 480
Asn Glu Asp Tyr Thr 485	Ile Val Glu Gln Tyr 490	Glu Arg Ser Glu Gly Arg 495

His His Leu Phe Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg
500 505 510

His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile
515 520 525

Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn
530 535 540

Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu
545 550 555 560

Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp
565 570 575

Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu
580 585 590

Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala
595 600 605

Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp
610 615 620

Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu
625 630 635 640

Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln
645 650 655

Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr
660 665 670

Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
675 680 685

<210> 39
<211> 2058
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos mitoADNQ

<400> 39
atgtccgtcc tgacgccgct gctgctgctg ggcttgacag gctcggcccg gcggctccca 60
gtgccgcgcg ccaagatcca ttcgttgaag cttgccacca tggtagagcaa gggcgaggag 120
gtcatcaaag agttcatgcg cttcaagggtg cgcatggagg gtcctatgaa cgccacagag 180
ttcgagatcg agggcgaggg cgagggccgc ccctacgagg gcacccagac cgccaagctg 240
aaggtgacca agggcgggccc cctgcccttc gcctgggaca tcctgtcccc ccagttcatg 300

ES 2 445 018 B1

```

tacggctcca aggcgtacgt gaagcacccc gccgacatcc ccgattacaa gaagctgtcc      360
ttccccgagg gcttcaagtg ggagcgcgtg atgaacttcg aggacggcgg tctggtgacc      420
gtgacccagg actcctccct gcaggacggc acgctgatct acaagggtgaa gatgcgcggc      480
accaacttcc ccccgacgg ccccgtaatg cagaagaaga ccatgggctg ggaggcctcc      540
accgagcgcc tgtacccccg cgacggcgtg ctgaagggcg agatccacca ggccctgaag      600
ctgaaggacg gcggccacta cctggtggag ttcaagacca tctacatggc caagaagccc      660
gtgcaactgc ccggctacta ctacgtggac accaagctgg acatcacctc ccacaacgag      720
gactacacca tcgtggaaca gtacgagcgc tccgagggcc gccaccacct gttcctgggg      780
catggcaccg gcagcaccgg cagcggcagc tccggcaccg cctcctccga ggacaacaac      840
atggccgtca tcaaagagtt catgcgcttc aaggtgcga tggagggctc catgaacggc      900
cacgagttcg agatcgaggg cgagggcgag ggccgcccct acgagggcac ccagaccgcc      960
aagctgaagg tgaccaaggg cggccccctg cccttcgcct gggacatcct gtccccccag     1020
ttcatgtacg gctccaaggg gtacgtgaag caccgcccga acatccccga ttacaagaag     1080
ctgtccttcc ccgagggcct caagtgggag cgcgtgatga acttcgagga cggcgggtctg     1140
gtgaccgtga cccaggactc ctccctgcag gacggcacgc tgatctacaa ggtgaagatg     1200
cgcggcacca acttcccccc cgacggcccc gtaatgcaga agaagaccat gggctgggag     1260
gcctccaccg agcgcctgta ccccgcgac ggcgtgctga agggcgagat ccaccaggcc     1320
ctgaagctga aggacggcgg ccactacctg gtggagtcca agaccatcta catggccaag     1380
aagcccgtgc aactgcccgg ctactactac gtggacacca agctggacat cacctccac     1440
aacgaggact acaccatcgt ggaacagtac gagcgtccg agggccgcca ccacctgttc     1500
ctgtccggat tcgacaaccc aagatggatt ggacgacaca agcatatgtt caatttcctt     1560
gatgtcgacc acaatggaaa aatctctctt gacgagatgg tctacaaggc atctgatatt     1620
gtcatcaata accttggagc aacacctgag caagccaaac gacacaaaga tgctgtggaa     1680
gccttcttcg gaggagctgg aatgaaatat ggtgtggaaa ctgattggcc tgcatatatt     1740
gaaggatgga aaaaattggc tactgatgaa ttggagaaat acgcaaaaaa cgaaccaacc     1800
ctcatccgca tctgggggtg tgctttgttt gatatcgttg acaaagatca aaatggagct     1860
attacactgg atgaatggaa agcatacacc aaagctgctg gtatcatcca atcatcagaa     1920
gattgcgagg aacattcag agtgtgcgat attgatgaaa gtggacaact cgatgttgat     1980
gagatgacaa gacgacatct gggatttttg tacaccatgg atcctgcttg cgaaaagctc     2040
tacggtggag ctgtcccc                                     2058

```

```

<210> 40
<211> 686
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos mitoADNQ

```

<400> 40

Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu Lys Leu Ala
20 25 30

Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe
35 40 45

Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu
50 55 60

Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu
65 70 75 80

Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser
85 90 95

Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp
100 105 110

Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu
115 120 125

Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp
130 135 140

Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly
145 150 155 160

Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly
165 170 175

Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys
180 185 190

Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu
195 200 205

Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro
210 215 220

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

Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His
245 250 255

Leu Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser Ser Gly
260 265 270

Thr Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met
 275 280 285
 Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu
 290 295 300
 Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala
 305 310 315 320
 Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile
 325 330 335
 Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro
 340 345 350
 Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys
 355 360 365
 Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr
 370 375 380
 Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met
 385 390 395 400
 Arg Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr
 405 410 415
 Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val
 420 425 430
 Leu Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His
 435 440 445
 Tyr Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln
 450 455 460
 Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His
 465 470 475 480
 Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg
 485 490 495
 His His Leu Phe Leu Ser Gly Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg
 500 505 510
 His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asp His Asn Gly Lys Ile
 515 520 525
 Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn
 530 535 540

Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu
545 550 555 560

Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp
565 570 575

Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu
580 585 590

Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala
595 600 605

Leu Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp
610 615 620

Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu
625 630 635 640

Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln
645 650 655

Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Arg His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr
660 665 670

Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
675 680 685

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptido espaciador 1
<400> 41

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptido espaciador 2
<400> 42

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly
1 5

<210> 43
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 22aa-L-1, oligonucleótido sentido de un enlazador de 22 aminoácidos para generar el clon b12

<400> 43
 ccgggggtggc agtggaagtg gtcaaagtgg ttccggtagt ggaggccaga gtggtagtgg 60
 aagtggccaa tcc 73

<210> 44
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 22aa-L-2, oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 22 aminoácidos para generar el clon b12

<400> 44
 caccgtcacc ttcaccagtt tcaccaaggc catcacctcc ggtctcacca tcaccttcac 60
 cggttagggg cc 72

<210> 45
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 13aa-L-1, oligonucleótido sentido de un enlazador de 13 aminoácidos para construir el clon a1

<400> 45
 ccggggtagt ggaggccaga gtggtagtgg aagtggccaa tcc 43

<210> 46
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 13aa-L-2, oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 13 aminoácidos para construir el clon a1

<400> 46
 ccatcacctc cgggtctcacc atcaccttca ccggttaggg gcc 43

<210> 47
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 6aa-L-1, oligonucleótido sentido de un enlazador de 6 aminoácidos para generar el clon ADiFL

<400> 47
 ccggcggcag cggtagct 18

<210> 48
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> 6aa-L-2, oligonucleótido anti-sentido de un enlazador de 6 aminoácidos para generar el clon ADiFL

 <400> 48
 gccgtcgcca tcgaggcc 18

 <210> 49
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> YG-SG, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para generar clones A3, AW, AE, AD1, Alfa

 <400> 49
 ctgttcctgt ccggaatgga cgagctgtac 30

 <210> 50
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> LF-SG-1, oligonucleótido mutagénico en sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para construir clones B2 y BW (1ª ronda de mutagénesis)

 <400> 50
 ccgccaccac ttgggcctgt acggcatgga cg 32

 <210> 51
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> LF-SG-2, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para construir clones B2 y BW (2ª ronda de mutagénesis)

 <400> 51
 ccgccaccac tccggactgt acggcatgga cg 32

 <210> 52
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> DN-SG-1, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para generar clones A3 y B2 (1ª ronda de mutagénesis)

 <400> 52
 cttacatcag acttcgccag accaagatgg attggacg 38

 <210> 53
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

<223> DN-SG-2, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido para generar clones A3 y B2 (2ª ronda de mutagénesis)

<400> 53
tacatcagac ttctccggac caagatggat tggac 35

<210> 54
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SD-SG, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para construir el clon AD1

<400> 54
gatctgtcaa acttacatcc ggattcgaca acccaagatg 40

<210> 55
<211> 40
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SV-SG, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para construir el clon AE

<400> 55
cagtccggac tcagatccgg aaaacttaca tcagacttcg 40

<210> 56
<211> 37
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> G-D, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para construir el clon Alfa

<400> 56
ccacctgttc ctgtccgact tcgacaaccc aagatgg 37

<210> 57
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> F224L, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido para generar el clon Alfa

<400> 57
gagggccgcc accacctgct gctgtccgga ttcgacaac 39

<210> 58
<211> 47
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N26D, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para generar el clon ADN y ADNQ

<400> 58
gttcaatttc cttgatgtcg accacaatgg aaaaatctct cttgacg 47

<210> 59
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Y82F, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para generar el clon ADiF y ADiFL

<400> 59
gtggaaactg attggcctgc atttattgaa ggatggaaaa aattg 45

<210> 60
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Q168R, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para generar el clon ADQ y ADNQ

<400> 60
gatgttgatg agatgacaag acgacatctg ggatttttgt acacc 45

<210> 61
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> HIII-out, oligonucleótido mutagénico sentido y fosforilado en el 1er nucleótido, para la eliminación del 1er sitio HindIII en mitotdTA

<400> 61
ctatagggag acccaagcta ggtaccgagc tcg 33

<210> 62
<211> 2055
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencia de nucleótidos tdTomato-Aeq, tdTA

<400> 62
atggtgagca agggcgagga ggtcatcaaa gagttcatgc gcttcaaggt gcgcatggag 60
ggctccatga acggccacga gttcgagatc gagggcgagg gcgagggccg cccctacgag 120
ggcaccacga ccgccaagct gaagggtgacc aaggcgggcc ccctgccctt cgcttgggac 180
atcctgtccc ccagttcat gtacggctcc aaggcgtagc tgaagcacc cgccgacatc 240
cccgattaca agaagctgtc cttccccgag ggcttcaagt gggagcgcgat gatgaacttc 300
gaggacggcg gtctggtgac cgtgaccag gactcctccc tgcaggacgg cacgctgac 360
tacaaggtga agatgcgcgg caccaacttc cccccgacg gccccgtaat gcagaagaag 420
accatgggct gggaggcctc caccgagcgc ctgtaccccc gcgacggcgt gctgaagggc 480

ES 2 445 018 B1

```

gagatccacc aggccctgaa gctgaaggac ggcgggcact acctggtgga gttcaagacc 540
atctacatgg ccaagaagcc cgtgcaactg cccgggtact actacgtgga caccaagctg 600
gacatcacct cccacaacga ggactacacc atcgtggaac agtacgagcg ctccgagggc 660
cgccaccacc tgttcctggg gcatggcacc ggcagcaccg gcagcggcag ctccggcacc 720
gcctcctccg aggacaacaa catggccgtc atcaaagagt tcatgcgctt caaggtgcgc 780
atggaggggt ccatgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgagggcga gggccgcccc 840
tacgagggca cccagaccgc caagctgaag gtgaccaagg gcggccccct gcccttcgcc 900
tgggacatcc tgtcccccca gttcatgtac ggctccaagg cgtacgtgaa gcaccccgcc 960
gacatccccg attacaagaa gctgtccttc cccgagggtt tcaagtggga gcgcgtgatg 1020
aacttcgagg acggcgggtct ggtgaccgtg acccaggact cctccctgca ggacggcacg 1080
ctgatctaca aggtgaagat gcgcggcacc aacttcccc cgcacggccc cgtaatgcag 1140
aagaagacca tgggctggga ggcctccacc gagcgctgt acccccgca cggcgtgctg 1200
aagggcgaga tccaccaggc cctgaagctg aaggacggcg gccactacct ggtggagttc 1260
aagaccatct acatggccaa gaagcccgtg caactgccc gctactacta cgtggacacc 1320
aagctggaca tcacctcca caacgaggac tacaccatcg tggaacagta cgagcgctcc 1380
gagggccgcc accacctgtt cctgtacggc atggacgagc tgtacaaggg taccgagctg 1440
tacaagtccg gcgggagcgg atccggcggc cagtccggac tcagatctgt caaacttaca 1500
tcagacttcg acaacccaag atggattgga cgacacaagc atatgttcaa tttccttgat 1560
gtcaaccaca atggaaaaat ctctcttgac gagatggtct acaaggcatc tgatattgtc 1620
atcaataacc ttggagcaac acctgagcaa gccaaacgac acaaagatgc tgtggaagcc 1680
ttcttcggag gagctggaat gaaatatggt gtggaaactg attggcctgc atatattgaa 1740
ggatggaaaa aattggctac tgatgaattg gagaaatacg caaaaaacga accaaccctc 1800
atccgcatct ggggtgatgc tttgtttgat atcgttgaca aagatcaaaa tggagctatt 1860
acactggatg aatggaaaagc atacacaaa gctgctggta tcatccaatc atcagaagat 1920
tgcgaggaaa cattcagagt gtgcgatatt gatgaaagtg gacaactcga tgttgatgag 1980
atgacaagac agcatctggg attttggtag accatggatc ctgcttgca aaagctctac 2040
ggtggagctg tcccc 2055

```

<210> 63
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos tdTomato-Aeq, tdTA

<400> 63

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys
 1 5 10 15

ES 2 445 018 B1

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

ES 2 445 018 B1

290		295		300
Ser 305	Pro	Gln	Phe	Met 310
				Tyr 315
				Val
				Lys
				His
				Pro
				Ala 320
Asp	Ile	Pro	Asp	Tyr 325
				Lys
				Lys
				Leu
				Ser
				Phe 330
				Pro
				Glu
				Gly
				Phe
				Lys 335
				Trp
Glu	Arg	Val	Met 340	Asn
				Phe
				Glu
				Asp
				Gly 345
				Gly
				Leu
				Val
				Thr
				Val 350
				Thr
				Gln
Asp	Ser	Ser 355	Leu	Gln
				Asp
				Gly
				Thr 360
				Leu
				Ile
				Tyr
				Lys
				Val 365
				Lys
				Met
				Arg
Gly	Thr 370	Asn	Phe	Pro
				Pro
				Asp 375
				Gly
				Pro
				Val
				Met
				Gln 380
				Lys
				Lys
				Thr
				Met
Gly 385	Trp	Glu	Ala	Ser
				Thr 390
				Glu
				Arg
				Leu
				Tyr
				Pro 395
				Arg
				Asp
				Gly
				Val
				Leu 400
Lys	Gly	Glu	Ile	His 405
				Gln
				Ala
				Leu
				Lys
				Leu 410
				Lys
				Asp
				Gly
				Gly
				His 415
				Tyr
Leu	Val	Glu	Phe 420	Lys
				Thr
				Ile
				Tyr
				Met 425
				Ala
				Lys
				Lys
				Pro
				Val 430
				Gln
				Leu
Pro	Gly	Tyr 435	Tyr	Tyr
				Val
				Asp
				Thr 440
				Lys
				Leu
				Asp
				Ile
				Thr 445
				Ser
				His
				Asn
Glu	Asp 450	Tyr	Thr	Ile
				Val
				Glu 455
				Gln
				Tyr
				Glu
				Arg
				Ser 460
				Glu
				Gly
				Arg
				His
His 465	Leu	Phe	Leu	Tyr
				Gly 470
				Met
				Asp
				Glu
				Leu
				Tyr 475
				Lys
				Gly
				Thr
				Glu
				Leu 480
Tyr	Lys	Ser	Gly	Gly 485
				Ser
				Gly
				Ser
				Gly
				Gly 490
				Gln
				Ser
				Gly
				Leu
				Arg 495
				Ser
Val	Lys	Leu	Thr 500	Ser
				Asp
				Phe
				Asp
				Asn 505
				Pro
				Arg
				Trp
				Ile
				Gly 510
				Arg
				His
Lys	His	Met 515	Phe	Asn
				Phe
				Leu
				Asp 520
				Val
				Asn
				His
				Asn
				Gly 525
				Lys
				Ile
				Ser
Leu	Asp 530	Glu	Met	Val
				Tyr
				Lys 535
				Ala
				Ser
				Asp
				Ile
				Val 540
				Ile
				Asn
				Asn
				Leu
Gly 545	Ala	Thr	Pro	Glu
				Gln 550
				Ala
				Lys
				Arg
				His
				Lys 555
				Asp
				Ala
				Val
				Glu
				Ala 560
Phe	Phe	Gly	Gly	Ala 565
				Gly
				Met
				Lys
				Tyr
				Gly 570
				Val
				Glu
				Thr
				Asp
				Trp 575
				Pro

Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys
580 585 590

Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu
595 600 605

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu
610 615 620

Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp
625 630 635 640

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu
645 650 655

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met
660 665 670

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro
675 680 685