

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 541**

21 Número de solicitud: 201130852

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.05.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (65.0%)**

Serrano nº 117

28006 Madrid ES y

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (35.0%)

72 Inventor/es:

SERRANO DELGADO, Aurelio;

HERNÁNDEZ LÓPEZ, Agustín y

PÉREZ CASTIÑEIRA, José Román

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **USO DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS QUE CODIFICAN PIROFOSFATASAS
TRANSLOCADORAS DE PROTONES PARA PRODUCIR LEVADURAS, HONGOS Y CÉLULAS
ANIMALES RESISTENTES A FÁRMACOS CITOTÓXICOS Y FUNGICIDAS Y MÉTODO PARA
PRODUCIRLAS.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos de origen vegetal o microbiano que codifica para una secuencia de aminoácidos correspondiente a una pirofosfatasa translocadora de protones (H⁺-PPasa, miembro de una familia de proteínas con código identificativo PF03030 de la base de datos Pfam), la cual es usada para transformar o transfectar una célula de levadura (p.e. *Saccharomyces cerevisiae*), fúngica o animal que naturalmente no contienen esta clase de proteínas, con la finalidad de producir resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos y a fungicidas.

ES 2 403 541 A1

DESCRIPCIÓN

5 Uso de secuencias nucleotídicas que codifican pirofosfatasas translocadoras de protones para producir levaduras, hongos y células animales resistentes a fármacos citotóxicos y fungicidas, y método para producirlas.

10 La invención concierne a la biomedicina (medicina clínica, industria biomédica), y a los sectores farmacéutico, biotecnológico (en los ámbitos agroalimentario, químico, petroquímico, bioenergías) y medioambiental. La invención genera productos biológicos aplicables en medicina regenerativa y cirugía (trasplantes; producción de órganos, tejidos y células animales modificados), en biotransformaciones industriales (producción de antibióticos, agroquímicos, biocombustibles, medicamentos, petroquímicos, plásticos) y agroalimentarias
15 (bebidas alcohólicas, conservación de alimentos), en descontaminación y reciclaje, así como en cualesquiera otras aplicaciones que impliquen transformaciones por cultivos de células animales o microorganismos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

20 El pirofosfato inorgánico (PPi) es un componente celular producido por todos los organismos vivos que se genera en muchas reacciones anabólicas de biosíntesis de polímeros y metabolitos. Su hidrólisis es esencial para que esas reacciones discurren en la dirección correcta y se regenere el Pi necesario para las
25 reacciones de fosforilación. La hidrólisis del PPi es, por tanto, una reacción bioquímica universal que se ha mantenido a lo largo de la evolución, aunque las proteínas enzimáticas que la catalizan (pirofosfatasas inorgánicas, PPasas, EC 3.6.1.1) difieren considerablemente en su secuencia de aminoácidos, estructura y mecanismo catalítico.

30 Las PPasas se dividen en dos grandes grupos: las solubles (sPPasas; 20-30 kDa) citosólicas o de organelos, que hidrolizan el PPi generando calor y las PPasas translocadoras de protones (H⁺-PPasas, 70 kDa), proteínas integrales de membrana que utilizan la energía de hidrólisis del PPi -un compuesto rico en

energía química, igual que el ATP- para generar un gradiente electroquímico de protones a través de membranas biológicas, una forma de energía muy versátil y útil para la energética celular (Baltscheffsky y col. 1999; Pérez-Castiñeira y col. 2001a y b, y 2002; Serrano y col. 2004 y 2007). Las H⁺-PPasas son, por tanto, 5 bombas primarias de protones que se encuentran en la membrana plasmática de procariotas y en las membranas endocelulares (sistema Golgi, lisosomas, vacuolas) de eucariotas, por lo que está implicada en la homeostasis de iones y otros procesos relacionados con el tráfico intracelular de membranas. Se han identificado H⁺-PPasas en muchas bacterias (p.e., la bacteria fotosintética 10 *Rhodospirillum rubrum*), arqueas, protistas (eucariotas unicelulares) y en todos los vegetales analizados hasta la fecha (algas, musgos, helechos y plantas mono- y di-cotiledóneas) (Pérez-Castiñeira y col. 2001a). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de genes que codifican para H⁺-PPasas en levaduras u otros hongos, ni en metazoos (animales multicelulares).

15

La acidificación de los compartimentos endocelulares delimitados por una única membrana (retículo endoplasmático, sistema Golgi, endosomas, lisosomas y vacuolas) impulsa un tráfico intracelular de membranas y proteínas que es vital para todas las células eucarióticas (Hernández y col, 2010). En levaduras, hongos 20 y animales esta acidificación está promovida por la ATPasa translocadora de H⁺ vacuolar (V-ATPasa), una compleja bomba de protones formada por múltiples subunidades cuya funcionalidad es esencial para estos organismos (Hernández y col, 2010). En la membrana vacuolar (tonoplasto) y otras endomembranas de plantas superiores, algas y muchos protistas (eucariotas unicelulares) se localiza 25 también la H⁺-PPasa (Maeshima 2000), la cual al acoplar el bombeo de H⁺ a la hidrólisis del PPi citosólico genera una fuerza protón-motriz, con un potencial positivo en el lumen, de magnitud similar al generado por la V-ATPasa localizada en las mismas endomembranas. Estos organismos poseen, por tanto, dos tipos de bombas de H⁺ que realizan funciones aparentemente redundantes, aunque 30 con sustratos energéticos diferentes (Rea y col. 1992; Maeshima 2000, Pérez-Castiñeira y col. 2001a). El hecho de que los niveles celulares de adenilatos sean muy sensibles a condiciones desfavorables, mientras que los de PPi apenas se alteran, estaría de acuerdo con el papel propuesto para la H⁺-PPasa en una bioenergética de estrés (Serrano y col. 2007). Los hongos y metazoos son

excepciones a este respecto al carecer naturalmente de H⁺-PPasas, hidrolizando el PPI citosólico mediante una sPPasa que debe ser inactivada para asegurar la funcionalidad de las H⁺-PPasas en el sistema de expresión heterólogo fúngico o animal (Pérez-Castiñeira y col. 2002).

5

Las H⁺-PPasas son proteínas hidrofóbicas relativamente grandes, con 15-17 segmentos alfa-hélice transmembranales y de unos 750-800 residuos de aminoácidos. Su N-terminal se prevé en el lumen vacuolar, mientras que el C-terminal se cree que se localiza en el citosol. Bioquímicamente se clasifican en dos grandes grupos, dependiente de si su actividad catalítica es estimulada o no por potasio (Maeshima 2000, Drozdowicz y Rea 2001; Pérez-Castiñeira y col 2001a y b). Varios residuos ácidos son importantes para la función de la H⁺-PPasa de la planta *Arabidopsis thaliana* y la bacteria *Streptomyces coelicolor*. Algunas plantas, protistas y procariontes poseen isoformas de H⁺-PPasa estrechamente relacionadas (Pérez-Castiñeira y col 2001a; Drozdowicz y Rea 2001).

Las H⁺-PPasas son proteínas de origen ancestral que conforman la clase de bombas primarias de iones más sencilla estructuralmente descrita hasta ahora, siendo in vivo proteínas homodiméricas (Maeshima 2000, Drozdowicz y Rea 2001). La comparación de las secuencias de nucleótidos de los genes de H⁺-PPasas de plantas y microorganismos (bacterias, arqueas y protistas) y de sus correspondientes secuencias de aminoácidos ha mostrado un alto grado de conservación entre proteínas homólogas de todos estos organismos, evolutivamente muy alejados. Esto ha permitido definir inequívocamente a la clase o familia de proteínas denominadas "pirofosfatasas translocadoras de protones" o "H⁺-pirofosfatasas", a la cual se le han asignado códigos identificativos en las principales bases de datos de proteínas como Pfam (PF03030); InterPro (IPR004131), o en la base de datos de Transportadores Proteínicos (TC#3.A.10) (Serrano y col. 2007). De esta forma, cualquier secuencia proteínica que, tras ser analizada a primera vista o por métodos bioinformáticos, sea asignada a esta familia, se puede considerar con un alto grado de seguridad que corresponde a una "bona fide" H⁺-PPasa, y es por tanto susceptible de ser utilizada en esta invención.

El uso biotecnológico de las H⁺-PPasas se ha circunscrito hasta la fecha a la producción de cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) o plantas transgénicas con mayor tolerancia a condiciones ambientales de estrés abiótico (salinidad, desecación) (Gaxiola y col. 1999; Gaxiola y col. 2001). Existen varias patentes similares en relación a esta temática tecnológica, un ejemplo representativo de ellas es la siguiente:

Patent application title: Transgenic plants overexpressing a plant vacuolar Pyrophosphatase

10

Inventors: Gerald R. Fink Roberto A. Gaxiola Seth L. Alper

Agents: HAMILTON, BROOK, SMITH & REYNOLDS, P.C.

Assignees: University of Connecticut

Origin: CONCORD, MA US

15

IPC8 Class: AC12N1582FI

USPC Class: 800278

Patent application number: 20090288222

Sin embargo, no se ha diseñado hasta la fecha ningún procedimiento para producir células fúngicas o animales con tolerancia o resistencia a fármacos antibióticos y/o a fungicidas mediante la expresión de H⁺-PPasas de origen vegetal o microbiano, capaces de sustituir funcionalmente a la V-ATPasa de las endomembranas de aquellos organismos. Este problema técnico es diferente en su naturaleza a la resistencia al estrés salino o hídrico descrita en las publicaciones y patentes citadas, no resultando la combinación de sus enseñanzas en la solución técnica aportada por la presente invención.

20

La expresión de H⁺-PPasas en hongos y células animales que naturalmente no poseen esta clase de bombas de protones debe afectar a la energética celular, de forma directa a los gradientes electroquímicos de las membranas vacuolisomales y consiguientemente al tráfico intracelular de membranas, que a su vez interesa a procesos celulares muy diversos (secreción, división celular, etc.). De esta forma, se trata de reproducir en levadura y células animales un escenario metabólico propio de los eucariotas fotosintéticos (Pérez-Castiñeira y col. 2001;

25

30

Serrano y col. 2007) y el aprovechamiento tecnológico derivado de las características fenotípicas diferenciales de las cepas transgénicas generadas, p.e. su posible resistencia a fármacos antibióticos de uso biomédico.

- 5 Se conocen diversas clases de compuestos químicos capaces de inhibir selectivamente, tanto *in vivo* como *in vitro*, la actividad V-ATPasa al interactuar con alguna subunidad de esta compleja bomba de protones. Entre ellos se encuentran los antibióticos plecomacrólidos, las benzolactona-enamidas, los archazólidos, las condropsinas y ciertos indoles. Ciertos macrólidos como las
- 10 bafilomicinas y concanamidas se utilizan como fármacos en la terapia de graves enfermedades (p.e. cáncer) debido a su efecto moderador de la proliferación celular, con el inconveniente de la elevada citotoxicidad derivada de su efecto inhibidor sobre la V-ATPasa (De Milito y Fais, 2005; Nikura 2006; Hernández y col. 2010). En consecuencia, la expresión de una H⁺-PPasa en hongos y células
- 15 animales podría generar resistencia a cualquier fármaco que interactúe de forma directa con la V-ATPasa nativa de estas células, aliviando así sus efectos citotóxicos.

La expresión de una H⁺-PPasa podría producir resistencia a otros xenobióticos que inhiben la actividad de la V-ATPasa por mecanismos indirectos, como son los

20 morfolinol, compuestos derivados de la morfolina que presentan analogía estructural con el colesterol (un componente importante de las membranas de las células fúngicas y animales), inhiben su biosíntesis y suplantán a los esterolés naturales con los que interactúa esta bomba de protones (Lafourcade y col

25 2008). Ciertos morfolino-derivados son fungicidas sistémicos muy utilizados (Dodemorf, Dimetomorf, Tridemorf) o tienen interés biomédico y farmacológico, p.e. para el tratamiento de graves enfermedades óseas (p.e. osteoporosis) (Farina y Gagliardi 2002).

30 Las levaduras, y los hongos en general, producen importantes fermentaciones y biotransformaciones (fermentación alcohólica, degradación de biopolímeros como celulosa y lignina, generación de metabolitos secundarios como vitaminas, hormonas y medicamentos, entre otras), tanto naturales o convencionales como biotecnológicamente modificadas. Por tanto, la obtención de nuevas estirpes

tolerantes a potentes antibióticos citotóxicos es de gran interés para prevenir y/o controlar contaminaciones fúngicas no deseadas en costosos procesos industriales o agroalimentarios, sin destruir las células que los llevan a cabo.

5 Como se describe en esta invención, la H⁺-PPasa, al ser capaz de sustituir funcionalmente a la V-ATPasa, confiere tolerancia a fármacos citotóxicos que, como los antibióticos macrólidos (p.e. bafilomicina A1 o concanamicina A), son inhibidores muy potentes y selectivos de la V-ATPasa (inhibición total in vivo a concentraciones 1-2 μ M, e in vitro a 5-10 nM) (De Milito y Fais, 2005; Nikura
10 2006). Este resultado es potencialmente de gran importancia biomédica y biotecnológica. Por una parte, se generan células con una característica fenotípica diferencial respecto a las silvestres (grado de sensibilidad a un fármaco específico); por otra, al ser la H⁺-PPasa capaz por sí misma de acidificar los sistemas endomembranales de levaduras y células animales (complementación
15 funcional) esto posibilitaría obtener líneas celulares mutantes carentes de V-ATPasa, algo que hasta ahora no se había logrado con células animales (Inoue y col. 2005); de esta forma se podrían estudiar también las funciones fisiológicas alternativas propuestas recientemente para la V-ATPasa animal. De hecho, la V-ATPasa se ha implicado en procesos tan diversos como el mantenimiento del pH
20 citosólico y extracelular (relación con malignidad y metástasis), endo- y exocitosis, apoptosis, neurotransmisión, estrés oxidativo, estabilidad génica y proliferación celular, entre otros (Hong y col. 2006; Liao y col. 2007; Manabe y col. 1993; Milgrom y col. 2007; Sun-Wada y col. 2004, Yoshimori y col. 1991). Es importante hacer notar a este respecto que los macrólidos se emplean en el
25 tratamiento de enfermedades tan relevantes como el cáncer y la osteoporosis, con el inconveniente de su elevada citotoxicidad debida a la inhibición de la V-ATPasa (De Milito y Fais, 2005), de ahí la importancia biotecnológica y biomédica de la tolerancia a fármacos promovida en células animales como consecuencia de su complementación funcional por H⁺-PPasas, como se describe en esta
30 invención. Estos fármacos, producidos naturalmente por bacterias del género *Streptomyces*, están en la actualidad disponibles comercialmente y se pueden usar, como esta invención describe, en un procedimiento directo y muy sencillo de selección fenotípica de líneas celulares resistentes a antibióticos citotóxicos (inducidas por H⁺-PPasas heterólogas), ya que el rango de concentraciones

inhibidoras del crecimiento de cultivos de células fúngicas y animales es muy bajo.

En resumen, esta invención podría revelarse de interés biotecnológico y biomédico como consecuencia de la capacidad de las H⁺-PPasas de complementar funcionalmente a la H⁺-ATPasa vacuolar de células fúngicas y animales, ya que esta bomba de protones desarrolla un papel relevante en el metabolismo energético de estas células, así como en el mecanismo molecular de importantes enfermedades como el cáncer o la osteoporosis (Beyenbach y Wieczorek, 2006; Stevens y col. 1997), para cuyo tratamiento terapéutico se emplean algunos de los fármacos y antibióticos usados en esta invención. No obstante, esta invención también se refiere a cualquier otro compuesto que inhiba específicamente a la H⁺-ATPasa vacuolar fúngica o animal. Como ejemplo, esta metodología permitiría obtener líneas de células humanas (tutipotentes o diferenciadas, adultas o embrionarias) expresoras de H⁺-PPasas y por ello resistentes a potentes fármacos/antibióticos citotóxicos, las cuales serían utilizadas en la restauración de tejidos y órganos “contaminados” con células patológicas sensibles a estos fármacos, p.e. células cancerosas o con graves deficiencias funcionales de origen genético o metabólico.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos de origen vegetal o microbiano que codifica para una secuencia de aminoácidos correspondiente a una pirofosfatasa translocadora de protones (H⁺-PPasa, miembro de una familia de proteínas con código identificativo PF03030 de la base de datos Pfam), la cual es usada para transformar o transfectar una célula de levadura (p.e. *Saccharomyces cerevisiae*), fúngica o animal, que naturalmente no contienen esta clase de proteínas.

30

Dicha secuencia de ADN codificante, natural o modificada por ingeniería genética, se utiliza en esta invención para producir resistencia a diversos fármacos o antibióticos citotóxicos y a ciertos fungicidas, los cuales tienen en común ser potentes inhibidores de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) propia de la célula

fúngica o animal que expresa la H⁺-PPasa codificada por dicha secuencia. Esta resistencia es consecuencia de la capacidad de la H⁺-PPasa heteróloga de acidificar los compartimentos endomembranales de las células transgénicas fúngicas o animales, siendo así capaz de sustituir funcionalmente a las V-ATPasas nativas, como se describe en esta invención. Pero para que se manifieste la tolerancia a estos compuestos es necesario, según se describe también en esta invención, que el gen que codifica para la sPPasa citosólica de la célula transgénica fúngica o animal (*IPP1* y *PPA1*, respectivamente) sea inactivado mediante técnicas bien conocidas por los expertos en biología molecular - p.e. inactivación génica por mutagénesis insercional en el ADN genómico, o silenciamiento génico post-transcripcional, p.e. por un ARN interferente (ARNi) - evitándose así su competencia con la H⁺-PPasa por el sustrato energético PPI.

La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 usada en esta invención (Figura 1) corresponde a la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de *Arabidopsis thaliana*, planta modelo utilizada en numerosos procesos biotecnológicos, pero otras H⁺-PPasas de diferentes organismos pueden realizar la misma función que AVP1 y, por tanto, sustituir a la citada proteína vegetal en la invención. La secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1 también incluye las secuencias del promotor y el terminador del gen *PMA1* de *S. cerevisiae*, necesarias para obtener una alta expresión de AVP1 en la levadura (Figura 1). No obstante, otras secuencias de ADN recombinante aptas también para la realización de esta invención contienen otras secuencias promotoras y terminadoras adecuadas para la célula fúngica o animal en la que se requiera expresar el gen que codifica para una H⁺-PPasa.

Otras H⁺-PPasas de diversos organismos, y cuyas secuencias aminoacídicas tienen una identidad de entre 98 y 30 % con la proteína AVP1, se consideran también objeto de esta invención y se pueden utilizar en la misma. Las secuencias nucleotídicas que codifican para estas H⁺-PPasas proceden de organismos pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos de los tres grandes dominios del árbol de la vida incluyendo, pero sin limitarse, a: 1) **Eucariotas**, como los Alveolados (Dinoflagelados, Apicomplejos, Ciliados), Estramenópilos o Heterocontos (Bicoseócidos, Labirintúlidos, Oomicetos, así como Diatomeas,

Crisofitas, Feofitas y otras Ocrofitas), Rizarios (como los Cercozoos), Halocrobios (como las Haptofitas y Criptofitas, entre otros), Amebozoos (como los Tubulíneos o Amebas Lobosas, entre otros), Excavados (Euglenozoos, Kinetoplástidos, Amebas heterolobosas, entre otros), *Malawimonas* spp., Radiolarios, Heliozoos, 5 Coanoflagelados, Nucleáridos, y todos los Arqueoplástidos o Viridiplantae (Glaucófitas, Rodofitas, Clorofitas, Prasinofitas, Ulvofitas, Charofitas, Briofitas o musgos, Pteridofitas o helechos y Embriofitas o plantas superiores, Angiospermas y Gimnospermas); 2) **Bacterias**, como Bacteroidetes, Dictyoglomi, Chlamydiae, Acidobacterias, Thermotogae, Fusobacterias, Elusimicrobia, Gemmatimonadetes, 10 Deferribacteres, Actinobacterias, Proteobacterias (alfa-, beta-, gamma-, delta- y epsilon-proteobacterias), Planctomycetes, Lentisphaerae, Spirochaetes, Chloroflexi, Firmicutes, Synesgistetes, Chlorobi, Verrucomicrobia, entre otros grupos; y 3) **Arqueas**, como Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota y Thaumarchaeota.

15

La secuencia aminoacídica de la proteína SEQ ID NO: 2 usada también en esta invención (Figura 2) corresponde a una proteína quimérica codificada por una fusión traduccional de la región nucleotídica 3' del gen para la H⁺-PPasa del protista kinetoplástico *Trypanosoma cruzi* y la secuencia nucleotídica del gen para 20 la H⁺-PPasa AVP1 de *Arabidopsis thaliana*, obtenida mediante métodos de ingeniería de proteínas bien conocidos por los expertos. La proteína resultante denominada TcAVP1 se expresa a niveles mayores y su actividad es más elevada que AVP1 en *S. cerevisiae* o líneas celulares animales. Otras H⁺-PPasas de vegetales (musgos, helechos, plantas superiores), protistas (eucariotas 25 unicelulares fotosintéticos y heterótrofos), bacterias y arqueas que tienen una identidad de entre 98 y 30 % con la proteína AVP1 se pueden utilizar en esta realización de la invención.

La secuencia aminoacídica de la proteína SEQ ID NO: 3 usada también en esta 30 invención (Figura 3) corresponde a una proteína quimérica codificada por una fusión traduccional de la región nucleotídica 3' del gen para la H⁺-PPasa del protista kinetoplástico *Trypanosoma cruzi* con una secuencia nucleotídica del gen de la proteína verde fluorescente GFP de *Aequorea victoria* y la secuencia nucleotídica del gen para la H⁺-PPasa AVP1 de *Arabidopsis thaliana*, obtenida

mediante métodos de ingeniería genética bien conocidos por los expertos. La proteína resultante denominada TcGFP_{AVP1} se expresa a niveles mayores y su actividad es más elevada que AVP1 en *S. cerevisiae* o líneas celulares animales y su localización subcelular se puede observar *in vivo* mediante técnicas de

5 microscopia de fluorescencia bien conocidas por los expertos. Otras H⁺-PPasas de vegetales (musgos, helechos, plantas superiores), protistas (eucariotas unicelulares fotosintéticos y heterótrofos), bacterias y arqueas que tienen una identidad de entre 98 y 30 % con la proteína AVP1 se pueden utilizar en esta realización de la invención.

10

La aplicación del uso de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 de la presente invención en diferentes células fúngicas o animales, hace que dichas células muestren características nuevas como la tolerancia a diversos fármacos o antibióticos citotóxicos y a ciertos fungicidas, lo cual representa un

15 fenotipo ventajoso desde el punto de vista biotecnológico y/o biomédico respecto a las células fúngicas o animales que no comprendan una proteína de la familia de las H⁺-PPasas, según se describe en la presente invención.

20

Otro aspecto más de la presente invención consiste en que el gen que codifica para la pirofosfatasa soluble (sPPasa) citosólica del genoma de la célula fúngica o animal -*IPP1* y *PPA1*, respectivamente- debe estar inactivado, de forma que la H⁺-PPasa vegetal o microbiana expresada en las células transgénicas pueda disponer de suficiente sustrato PPI y se manifieste, en consecuencia, el fenotipo de resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos y fungicidas que se describe

25 en esta invención.

30

Según se describe en la Figura 4, la inactivación permanente del gen *IPP1* de *Saccharomyces cerevisiae* se consigue mediante inserción por recombinación homóloga en el ADN del cromosoma II de la levadura de la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 4 usada en esta invención, la cual incluye las secuencias promotora (410 nt) y codificante (864 nt) del gen *IPP1* flanqueando a la que codifica para la casete de expresión del gen *HIS3* (1773 nt), según se muestra en el esquema inferior. Esta inactivación génica permanente por mutagénesis insercional (gene knock-out) se puede llevar a cabo en cualquier célula fúngica

(de hongos Ascomicetos, Basidiomicetos o Zygomycetos) mediante técnicas bien conocidas por los expertos en Biología Molecular.

Alternativamente, según se describe en la Figura 5 y en la sección de Ejemplos de esta invención, se consigue una inactivación condicional (dependiendo de las condiciones de cultivo) del gen *IPP1* de *Saccharomyces cerevisiae* mediante inserción por recombinación homóloga en el ADN del cromosoma II de la levadura de la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 5, usada en esta invención para sustituir a la región promotora natural (410 nt) del gen *IPP1* de la levadura por la secuencia promotora regulable reprimible por glucosa del gen *GAL1* (808 nt), con la introducción simultánea de la casete de expresión del gen *HIS3* (1773 nt) entre las secuencias promotoras referidas. Esta inactivación génica condicional por mutagénesis insercional se puede llevar a cabo en cualquier célula fúngica (de hongos Ascomicetos, Basidiomicetos o Zygomycetos) mediante técnicas bien conocidas por los expertos en Biología Molecular.

Otro aspecto de la presente invención consiste en la inactivación del gen *PPA1* que codifica para la sPPasa citosólica humana (cromosoma 10; No. acceso NCBI NM_021129) (ver Figura 6), o de su homólogo de cualquier otra especie animal, mediante diferentes técnicas bien conocidas por los expertos en Biología Molecular, como la transfección con vectores lentivirales y silenciamiento génico por ARN interferente (ARNi) descrita en la sección de Ejemplos de esta invención o el “knockout” de *PPA1* mediante la tecnología de Nucleasas de Dedos de Zinc, entre otras, con la finalidad, como se ha indicado anteriormente, de que se manifieste el fenotipo de resistencia a fármacos citotóxicos y fungicidas en las células que expresan H⁺-PPasas como se describe en esta invención.

Otro aspecto más de la presente invención consiste en la introducción de genes que codifican H⁺-PPasas mediante transfección de células de diversas líneas celulares humanas y de animales, tanto si son de crecimiento rápido como si son quiescentes, de células embrionarias o adultas, de células madre o diferenciadas. Algunos ejemplos de líneas celulares utilizables en esta invención son, entre otras, HEK 293 , riñón embrionario humano; NB9, neuroblastoma humano; MCF-7 y MCF-7/HER2, células tumorales de cáncer de mama humana (la línea MCF-

7/HER2, tiene integrada una construcción que sobreexpresa el gen HER2); A293T, células de origen renal embrionario humano; HeLa, células tumorales de epitelio de cuello de útero humano; HCT116 y HCT116/p53^{-/-}, líneas celulares de cáncer de colon humano (la línea HCT116/p53^{-/-} posee las dos copias cromosómicas del gen TP53 inactivado por recombinación homóloga); INIH/3T3, fibroblastos de ratón (modelo de mamífero).

En consecuencia, el primer aspecto de la presente invención es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 40 % de identidad con las codificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 para producir tolerancia a diversos fármacos y antibióticos citotóxicos y a fungicidas que son inhibidores de las V-ATPasas de células fúngicas o animales. Los fármacos y antibióticos hacia los que, según se describe en esta invención, la expresión de una H⁺-PPasa confiere resistencia o tolerancia en una célula fúngica o animal se clasifican en, pero no se limitan a, los siguientes grupos (Hernández y col. 2010):

1) **Plecomacrólidos** (Bafilomicinas, Concanamicinas, Iejimalides, Palmerolides, Apoptolidina). Compuestos muy similares estructuralmente que consisten en grandes anillos de lactonas macrocíclicas por lo que se clasifican en el grupo de los macrólidos, y se denominan generalmente plecomacrólidos. La Bafilomicina A fue el primer inhibidor específico descrito para la V-ATPasa, seguido poco después por la Concanamicina A. Son producidos de forma natural por varias especies de bacterias del género *Streptomyces*, cuando crecen como micelios. Son inhibidores muy potentes de la V-ATPasa fúngica o animal, con valores de IC₅₀ del orden de nanomolar. En medicina clínica, se utilizan en terapia anticancerosa (inhiben la proliferación de células tumorales) y diversas osteopatías. Los Iejimalides A y B, y el Palmerolide A, plecomacrólidos similares a las Bafilomicinas aislados de ciertos tunicados marinos (*Eudistoma cf. rigida*, *Synoicum adareanum*) son potentes inhibidores de la V-ATPasa animal y tienen una potente actividad antileucémica, así como efectos citostáticos y proapoptóticos en células tumorales, pero son muy citotóxicos.

2) **Benzolactona enamidas** (Salicylihalimidas, Lobatamidas y Apicularenos). Forman una familia de inhibidores de la actividad V-ATPasa descritos poco después que los plecomacrólidos, siendo su mecanismo de inhibición de esta bomba de H⁺ diferente al de los plecomacrólidos. El primero de estos compuestos
 5 (Salicylihalimida) se obtuvo de esponjas del género *Haliclona* sp; las lobatamidas y los Apicularenos se aislaron del tunicado *Aplidium lobatum* (de ahí su nombre) y de mixobacterias del género *Chondromyces*, respectivamente. Todos estos compuestos tienen en común un núcleo de benzolactona enamida y muestran un perfil de citotoxicidad similar a los plecomacrólidos en tests celulares. Las
 10 benzolactona enamidas son inhibidores muy potentes de la V-ATPasa animal pero no de la V-ATPasa fúngica, y exhiben una potente actividad antitumoral en células de mamífero.

3) **Chondropsinas**. Son macrólidos poliketido-derivados muy complejos formados
 15 por 33-37 anillos que integran un gran anillo lactónido con largas extensiones de poliketidos. Fueron inicialmente aislados de esponjas de los géneros *Chondropsis* y *Siliquariaspongia*. Inducen muerte celular y son potentes inhibidores de la V-ATPasa (preferentemente la fúngica) en tests celulares y ensayos in vitro.

20 4) **Archazolidos**. Son antibióticos macrolactónidos relacionados estructuralmente con los plecomacrólidos que contienen además un anillo tiazol en una cadena lateral. Fueron aislados por vez primera de la mixobacteria *Archangium gephyra*. Archazolido A es un potente inhibidor de la V-ATPasa de *Manduca sexta* (IC₅₀ = 20nM) así como de la acidificación de los compartimentos intracelulares de
 25 células de mamífero.

5) **Indoles**. Diez años después del descubrimiento de la Bafilomicina, el conocimiento de su mecanismo de inhibición de la V-ATPasa dio lugar a la producción de una nueva clase de compuestos inhibidores más simples y fáciles
 30 de sintetizar, caracterizados por un núcleo indólico con residuos laterales atractores de electrones (p.e. cloro) en las posiciones 5 y 6, y un residuo amino tras una cadena espaciadora de 3-4 átomos de carbono (Hernández y col. 2010). Al igual que los plecomacrólidos, estos indol-derivados se unen a la subunidad c de la V-ATPasa.

6) **Imidazoles.** Un caso especial es el Omeprazol y derivados, como lanzoprazol o Pantoprazol, denominados en conjunto PPI (Proton Pump Inhibitors). Estos compuestos son derivados del imidazol con un átomo de azufre tricoordinado en una estructura piramidal. Se usan ampliamente como inhibidores de la H⁺/K⁺-ATPasa gástrica y otras P-ATPasas (interaccionan con un residuo Cys del sitio activo), de ahí su denominación PPI. En altas concentraciones inhiben la V-ATPasa incrementando así la sensibilidad de las células tumorales hacia otros agentes quimioterapéuticos usados contra el cáncer, por lo que se consideran agentes antitumorales.

10

En este sentido, otro aspecto de la presente invención es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica con al menos un 40 % de identidad con las codificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 para producir en células de levaduras y otros hongos o en células animales tolerancia a **fungicidas morfolinos** (aldimorph, benzamorph, carbamorph, dimethomorph, dodemorph, fenpropimorph, flumorph, tridemorph), derivados de la morfolina que actúan inhibiendo las V-ATPasas fúngica y animal al impedir la síntesis de los esteroides que interaccionan con esta bomba de protones en la membrana. Estos compuestos son utilizados como fungicidas sistémicos en agricultura, biotecnología e industria, y tienen un interés biomédico creciente como agentes virostáticos, coccidiostáticos y citostáticos (antitumorales).

20

Todos los compuestos citados tienen en común que actúan como inhibidores de la actividad translocadora de H⁺ de la V-ATPasa fúngica o animal (Hernández y col. 2010), a la que sustituye funcionalmente la H⁺-PPasa, según se describe en esta invención.

25

La secuencia SEQ ID NO: 1 comprende una secuencia aminoacídica codificada por una secuencia nucleotídica presente en el genoma de la planta *Arabidopsis thaliana*. El ácido nucleico aislado comprende al menos una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia con al menos un 30 % de identidad con la codificada por SEQ ID NO: 1 o bien que codifica para la de SEQ ID NO: 1. En estos aspectos de la presente invención, el ácido nucleico aislado puede ser la

30

secuencia nucleotídica codificante (ADNc), como es el caso de SEQ ID NO: 1, o secuencias nucleotídicas con o sin intrones, por tanto queda incluida la secuencia de ADN genómico que codifica para SEQ ID NO: 1 (en adelante se harán referencia a las secuencias nucleotídicas como secuencias nucleotídicas de la presente invención o de la invención). Es decir, incluyen secuencias de ácido nucleico cuyo producto de la transcripción, el ARN mensajero (ARNm) codifica para la misma secuencia de aminoácidos (en adelante, secuencia de aminoácidos de la presente invención o secuencia de aminoácidos de la invención). También se incluyen secuencias variantes degeneradas de las secuencias nucleotídicas de la invención, cuyo producto es una proteína con la misma función que la proteína codificada por la secuencia SEQ ID NO: 1. También se incluyen secuencias de aminoácidos que tengan modificaciones en su extremo N-terminal, C-terminal y/o en alguna posición aminoacídica interna (como las codificadas por SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3) de modo que la función de la proteína esté mejorada respecto de la que resulta de la traducción de la secuencia de ARNm transcrita a partir de la secuencia de nucleótidos de la invención que es idéntica al ARNm natural (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que de lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

Las secuencias aminoacídicas con al menos un 30 % de identidad con la codificada por SEQ ID NO: 1 son secuencias homólogas de *A. thaliana* u otros organismos donde la proteína que codifican tiene una función equivalente a la proteína codificada por el citado gen *AVP1* de origen vegetal. Las secuencias homólogas se refieren por lo general a secuencias de especies distintas que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y proceden de la duplicación de un mismo gen. En este aspecto de la presente invención, se consideran todas las secuencias homólogas, tanto

5 ortólogas como parálogas, que tienen, al menos, un 30 % de identidad con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1, sin perjuicio de que se consideren también objeto de la invención otras secuencias de H⁺-PPasas con niveles menores de identidad con *AVP1*. Del mismo modo, quedan incluidas todas aquellas secuencias cuyo producto de la transcripción es idéntico a la secuencia de aminoácidos de la presente invención.

10 La identidad de la secuencia aminoacídica codificada por SEQ ID NO: 1, procedente de *Arabidopsis thaliana* con respecto a secuencias aminoacídicas de otras plantas, como por ejemplo, pero sin limitarse a, *Nicotiana*, es de alrededor de un 95 %, por tanto, en esta realización de la presente invención se incluye cualquier ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica, procedente de una planta, con al menos un 90 % de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1.

15 Una realización preferida es el uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica de una planta, helecho, musgo o microorganismo con al menos un 30 % de identidad con la secuencia aminoacídica codificada por SEQ ID NO: 1.

20 Tal como se describe en el apartado de ejemplos de la presente invención, la tolerancia a fármacos citotóxicos y a fungicidas de células fúngicas o animales que han sido transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia de aminoácidos de la invención, incrementa significativamente respecto de células control que no contienen las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Por tanto, las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 confieren resistencia a fármacos citotóxicos y fungicidas. Preferiblemente las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se usan para conferir resistencia a fármacos citotóxicos y fungicidas en las células transgénicas, fúngicas o animales.

Otra realización preferida de la invención es el uso de las secuencias nucleotídicas SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 (o construcciones homólogas de origen fúngico) para transformar células de levaduras u otros hongos, y el uso de

un ARNi obtenido a partir de la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 6 (o de secuencias homólogas de células animales) por técnicas bien conocidas por los expertos en Biología Molecular para transfectar células de mamíferos, preferiblemente células humanas.

5

Otro aspecto más de la presente invención es el uso de un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de los aspectos anteriores (en adelante, vector de la invención) para conferir resistencia a fármacos citotóxicos y fungicidas en células animales y fúngicas.

10

El término "vector" se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias descritas según los aspectos anteriores que, fusionadas al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores lentivirales aptos para transformar o transfectar células fúngicas o animales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

15

20

Un aspecto más es el uso de una célula transformada o transfectada con el vector de la invención que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias aminoacídicas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (en adelante, célula de la invención) para conseguir resistencia a los citados antibióticos o fármacos citotóxicos y fungicidas.

25

30

El término "célula" tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. La célula puede ser una bacteria capaz de replicar un ADN ajeno transformado como por ejemplo cualquiera de las cepas de la especie *Escherichia coli*. Preferiblemente, la célula hace referencia a una célula eucariótica fúngica o animal. Así pues, en el caso de que la célula sea fúngica, el término célula comprende, al menos, una célula individual de una levadura, o de un micelio de un hongo filamentoso, u otra célula fúngica de cualquier tipo,

germinal (espora) o vegetativa, diferenciada o indiferenciada. En el caso de célula animal puede ser de cualquier línea celular, normal o tumoral, de cualquier tejido u órgano, adulta o embrionaria, pluripotente (desdiferenciada) o diferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula fúngica que carece de pared celular).

El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia en células eucarióticas animales. El término “transformación” se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células eucarióticas fúngicas.

Una realización preferida es el uso de la célula de la invención que comprende cualquier producto de la expresión del ácido nucleico aislado que codifica para las secuencias aminoacídicas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos según cualquiera de los aspectos anteriores. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida.

Otra realización preferida es el uso según cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores donde el ácido nucleico aislado está unido funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.

El ácido nucleico de la presente invención se une por su extremo 3' a una secuencia reguladora de la expresión génica. En la presente invención, el término “secuencia reguladora de la expresión génica” hace referencia a una secuencia

de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad de la secuencia de ácido nucleico de la invención en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de la secuencia de ADN o al inicio de traducción de la secuencia de ARN u otras secuencias no descritas. A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones.

Según una realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica forma parte de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

10

La secuencia reguladora de la expresión génica de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 hace referencia a la secuencia del promotor del gen *PMA1* de *S. cerevisiae*, que produce una expresión constitutiva del gen al que precede en cualquier célula eucariótica fúngica. Esta secuencia provoca que el gen que precede sea expresado eficientemente en las células fúngicas. En otras realizaciones la secuencia reguladora de la expresión génica en hongos puede ser cualquier secuencia promotora de otros genes constitutivos de origen fúngico que codifican para proteínas con altos niveles de expresión (p.e. PGK, GAPDH) y que son funcionales en las células fúngicas transformadas.

20

Según otra realización preferida, la célula fúngica a la que se hace referencia según cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores, pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Según otra realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica puede ser cualquier secuencia de origen vírico (virus SV40 o CMV) o de promotores de genes constitutivos que codifiquen proteínas abundantes en células animales (p.e, globinas) y que sea funcional en las células animales transfectadas, preferentemente células eucarióticas de mamífero, y más preferentemente células humanas (*Homo sapiens*). Esta secuencia provoca que el gen al que precede sea expresado en células humanas y de otros mamíferos.

30

Otro aspecto de la presente invención es una célula aislada transfectada con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica

una secuencia aminoacídica con al menos un 30 % de identidad con la secuencia codificada por SEQ ID NO: 1.

5 El término “transfección” hace referencia a la introducción de material genético externo en células mediante plásmidos, vectores víricos (en este caso también se habla de transducción) u otras herramientas para la transferencia. El término transfección para métodos no-virales es usado en referencia a células eucarióticas de mamífero, mientras que el término transformación se prefiere para describir las transferencias no-virales de material genético en bacterias y células
10 eucariotas no animales, como levaduras y otros hongos. En el caso de la presente invención, el término transfección es equivalente al término transformación.

Según una realización preferida, la célula fúngica o animal también comprende una secuencia nucleotídica cromosómica modificada de manera que el gen que
15 codifica para su sPPasa citosólica (*IPP1* o *PPA1*, respectivamente) esté inactivado permanentemente (p.e. SEQ ID NO: 4) o pueda ser inactivado discrecionalmente (p.e. SEQ ID NO: 6), o bien la célula contenga una secuencia de ARNi que permita el silenciamiento de dicho gen. Alternativamente el gen *PPA1* de células humanas se puede inactivar permanentemente (knock-out)
20 mediante la técnica de la Nucleasa de Dedos de Zinc.

Otra realización preferida es una célula aislada fúngica o animal transfectada con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para una H⁺-PPasa.
25

En adelante, se hará referencia a las células anteriores como las células de la invención o las células de la presente invención.

El término “célula aislada” hace referencia a una célula que se obtiene de
30 cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo, pero sin limitarse, *E. coli*) o de micelios de hongos o de tejido animal. Preferiblemente la célula es una célula eucariótica de levadura o de mamífero. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula que carece de pared

celular). La célula expresa las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 de forma estable o de forma transitoria.

Otro aspecto más de la presente invención es un tejido u órgano que comprende la célula de la invención. Según una realización preferida, el tejido u órgano pertenece a una especie animal, preferiblemente a una especie de mamífero, y más preferiblemente a *Homo sapiens*. Según otra realización preferida la célula pertenece a una especie de hongo, bien unicelular o formador de micelios.

10 Teniendo en cuenta que las proteínas H⁺-PPasas codificadas por las secuencias de la presente invención sustituyen funcionalmente a las V-ATPasas de *S. cerevisiae* y células humanas, es de suponer, que la transferencia e inserción, en el lugar adecuado, de las secuencias de la invención a cualquier especie fúngica o animal donde el producto obtenido de las secuencias anteriores tenga la misma
15 secuencia aminoacídica, origine como resultado células fúngicas o animales que expresan de forma funcional estas secuencias que desempeñan la misma función que su V-ATPasa nativa.

Las células de la invención pueden contener cualquiera de las secuencias de la
20 invención en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

Las células de la invención pueden conseguirse por transformación genética de células fúngicas o animales mediada por nucleofección, electroporación, biolística, liposomas, o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las
25 secuencias de la invención en el ADN de la células receptoras, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial seguida de un programa de regeneración in vitro adecuado a las características y necesidades de la especie transformada. Los métodos para conseguir la célula o tejido de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo. Asimismo también se
30 incluye que la célula de la presente invención exprese los genes transfectados de forma estable o de forma transitoria.

En la presente invención se tiene en cuenta la transmisión de los caracteres genéticos y fenotípicos obtenidos. De este modo se consigue un organismo

(hongo o animal) que comprende cualquiera de las secuencias de la presente invención y, tras los respectivos cruces y/o selecciones, se puede obtener una progenie en la que la secuencia se integra de forma estable (aunque también pueden expresarse de forma transitoria) y en un número de copias adecuado para
5 obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

El término “progenie” hace referencia al resultado de la reproducción, es decir, el individuo o individuos producidos mediante la intervención de uno o más individuos parentales. La progenie puede ser también cualquier célula resultante
10 de la fusión de cualquier contenido celular, plasto, compartimento celular, ADN o cualquiera de sus combinaciones. En los procesos de división celular (como por ejemplo en el cultivo in vitro) la progenie son las células resultantes de la división.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula
15 fúngica de la invención, que comprende:

a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier
20 otra H⁺-PPasa natural o modificada) en un vector,

b. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (a)

c. Insertar en un vector las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 (o
25 secuencias homólogas de origen fúngico) destinadas a inactivar el gen de la sPPasa citosólica *IPP1* (o cualquier homólogo fúngico) mediante inserción por recombinación homóloga en la región cromosómica correspondiente

d. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (c) y

30 e. seleccionar la célula doblemente transformada según los apartados (b) y (d) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) y cuyo gen *IPP1* está inactivado, preferentemente de modo permanente.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula fúngica de la invención, caracterizado porque las etapas de dicho método se suceden en el siguiente orden: c), d), a), b), y e), del siguiente modo:

5

c. Insertar en un vector las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 (o secuencias homólogas de origen fúngico) destinadas a inactivar el gen de la sPPasa citosólica *IPP1* (o cualquier homólogo fúngico) mediante inserción por recombinación homóloga en la región cromosómica correspondiente,

10

d. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (c),

a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) en un vector,

15

b. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (a), y

e. seleccionar la célula doblemente transformada según los apartados (b) y (d) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) y cuyo gen *IPP1* está inactivado, preferentemente de modo condicional, tal y como se ha empleado en los ejemplos para generar las estirpes de *S. cerevisiae* YPC3, YPC4 y SAH6.

25

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula animal, preferiblemente de mamífero, de la invención, que comprende:

a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) en un vector,

30

b. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (a)

c. Insertar en un vector la secuencia de ARNi diseñada para el silenciamiento génico del gen de la sPPasa citosólica *PPA1* humana (o cualquier homólogo animal)

5 d. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (b)

e. seleccionar la célula doblemente transfectada según los apartados (b) y (d) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para
10 cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) y cuyo gen *PPA1* está inactivado, preferentemente de modo permanente.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula animal de la invención, caracterizado porque las etapas de dicho método se
15 suceden en el siguiente orden: c), d), a), b), y e), del siguiente modo:

c. Insertar en un vector la secuencia de ARNi diseñada para el silenciamiento génico del gen de la sPPasa citosólica *PPA1* humana (o cualquier homólogo animal)

20

d. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (c)

a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier
25 otra H⁺-PPasa natural o modificada) en un vector,

b. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (a)

e. seleccionar la célula doblemente transfectada según los apartados (b) y (d)
30 que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 (o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada) y cuyo gen *PPA1* está inactivado, preferentemente de modo condicional, bajo un promotor regulable en células animales.

La inserción de cualquiera de las secuencias de la invención en un vector se puede llevar a cabo por medio de los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte de las secuencias y el vector con
5 enzimas de restricción y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre la secuencia de la invención seleccionada. El vector ha sido definido en un párrafo anterior.

La selección del vector que comprende la secuencia de la invención escogida,
10 puede llevarse a cabo mediante técnicas como;

- Selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos, otros fármacos bioactivos al medio de cultivo, o la remoción de determinados nutrientes (p.e. aminoácidos) del mismo. La resistencia
15 de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector. La capacidad de crecimiento en ausencia de un nutriente está producida por la síntesis de moléculas (proteínas) codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector que puede o no integrarse en el ADN cromosómico de la
20 célula transformada.

- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento de alguna de las secuencias de la invención insertada en el vector.

- Detección de un gen indicador presente en el vector de transformación, cuya presencia en la célula transformada indica la presencia de las secuencias de la
25 invención.

La célula se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli*) o cultivos de hongos o células animales.

30 La transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, nucleofección, electroporación, transformación genética mediada por biolística, virus, liposomas, o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la célula. Mediante estas técnicas

se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose. También se incluyen las células que comprenden cualquiera de las secuencias de la invención de forma transitoria.

La célula transformada con un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico (en este caso se suele insertar una secuencia de ADNt que contiene, entre otras secuencias, cualquiera de las secuencias de la invención), o, permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos u otros fármacos bioactivos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas, o por la remoción de determinados nutrientes (p.e. aminoácidos) del medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos, o la capacidad de sintetizar determinados nutrientes, está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector o del ADNt del vector. También se puede seleccionar la célula que comprende secuencias que codifican para H⁺-PPasas mediante cualquier otra técnica que permita discriminar su presencia o ausencia y/o su expresión.

Otro aspecto de la presente invención es un método para obtener un tejido u organismo de la invención que comprende:

- a. regenerar al menos un tejido u organismo procedente de la célula obtenida según el apartado (e) de los métodos anteriores,
- b. seleccionar uno o varios tejidos u organismos regenerados según el apartado (a) que expresa, al menos, la secuencia nucleotídica que codifica para una H⁺-PPasa y tiene su gen cromosómico para la sPPasa citosólica inactivado, y

c. seleccionar uno o varios tejidos u organismos obtenidos según el apartado (b) que presentan resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos o a fungicidas, según se describió en apartados anteriores de la invención.

5 Las células seleccionadas, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual, tras la desdiferenciación de las mismas mediante una combinación adecuada de hormonas y otros compuestos, se da lugar a tipos celulares específicos (células musculares, nerviosas, epiteliales, etc.) que formen tejidos u órganos y que contengan las características fenotípicas de
10 resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos o a fungicidas) de esta invención. Una vez que se ha regenerado el tejido u órgano, se lleva a cabo un análisis de la presencia y/o de la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica para la H⁺-PPasa o de cualquier otra secuencia de la presente invención (secuencia promotora, etc...).

15

Según otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para las secuencias codificantes de H⁺-PPasas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 está unida funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica apropiada que hace que las H⁺-PPasas de origen vegetal o microbiano de
20 la invención se expresen en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o en cualquier otra célula fúngica.

Según otra realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica para las secuencias codificantes de H⁺-PPasas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID
25 NO: 3 está unida funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica apropiada que hace que las H⁺-PPasas de origen vegetal o microbiano de la invención se expresen en células animales, preferiblemente de mamíferos, y más preferentemente humanas (*Homo sapiens*).

30 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. Las siguientes figuras y ejemplos se

proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

FIGURA 1. Muestra la Secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 1 usada en esta invención que incluye las regiones promotora y terminadora del gen *PMA1* de levadura flanqueando la que codifica para la secuencia aminoacídica de la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de la planta *Arabidopsis thaliana* (2313 nt), según se muestra en el esquema inferior.

10

FIGURA 2. Muestra la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 2 usada en esta invención que incluye las regiones promotora y terminadora del gen *PMA1* de levadura flanqueando la que codifica para la secuencia aminoacídica quimérica TcAVP1 que comprende la región N-terminal de la H⁺-PPasa del protista kinetoplástico *Trypanosoma cruzi* (84 nt) y la secuencia de la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de la planta *A. thaliana* (2313 nt), según se muestra en el esquema inferior.

15

FIGURA 3. Muestra la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 3 usada en esta invención que incluye las regiones promotora y terminadora del gen *PMA1* de levadura flanqueando la que codifica para la secuencia aminoacídica quimérica TcGFP AVP1 que comprende la región N-terminal de la H⁺-PPasa del protista kinetoplástico *T. cruzi* (84 nt), y las secuencias de la proteína verde fluorescente GFP de *Aquarea victoria* (717 nt) y la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de la planta *A. thaliana* (2313 nt), según se muestra en el esquema inferior.

20

25

FIGURA 4. Muestra la inactivación permanente del gen *IPP1* de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la inserción por recombinación homóloga en el ADN del cromosoma II de la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 4, usada en esta invención, y que incluye las secuencias promotora (368 nt) y codificante (864 nt) del gen *IPP1* flanqueando a la que codifica para la casete de expresión del gen *HIS3* (1773 nt), según se muestra en el esquema inferior.

30

FIGURA 5. Muestra la secuencia nucleotídica artificial SEQ. ID NO. 5, usada en esta invención para sustituir la región promotora natural (368 nt) del gen *IPP1* de *S. cerevisiae* por la secuencia promotora regulable del gen *GAL1* (808 nt) mediante inserción por recombinación homóloga en el ADN del cromosoma II, y que incluye la casete de expresión del gen *HIS3* (1773 nt) entre las secuencias promotoras referidas, según se muestra en el esquema inferior. Este procedimiento permite la inactivación condicional del gen *IPP1* fúngico por las condiciones de cultivo (en este caso por la presencia de un nutriente, la glucosa).

FIGURA 6. Muestra la secuencia nucleotídica SEQ. ID NO. 6 del ARNm del gen *PPA1* del cromosoma 10 humano (LOCUS NM021129, 1316 nt), que codifica para la secuencia aminoacídica de la PPasa soluble citosólica, usada en esta invención para diseñar una estrategia de silenciamiento génico con ARNi con el fin de inactivar el gen *PPA1*.

15

FIGURA 7. A. Muestra la esquema de uno de los plásmidos multicopia lanzadera (para transformar tanto *E. coli* como levadura) utilizado para transformar *S. cerevisiae* estirpe YPC3 (con su gen *IPP1* bajo el control del promotor regulable *GAL1*), conteniendo un gen quimérico (*TcGFP**AVP1*) que incluye la secuencia nucleotídica para la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de la planta *A. thaliana*. B. Muestra la inmunodetección por Western blot (con anticuerpos específicos anti-H⁺-PPasa) de la H⁺-PPasa AVP1 y las proteínas quiméricas derivadas de AVP1 descritas en la invención, en preparaciones de membranas de diversas estirpes de *S. cerevisiae*; control (sin expresar H⁺-PPasa) y expresoras de dichas H⁺-PPasas de origen vegetal. El anticuerpo anti-H⁺-PPasa reconoce bandas de proteínas con las masas moleculares esperadas (aprox. 72-75 kDa para AVP1 y TcAVP1, y 120 kDa para TcGFP*AVP1*).

FIGURA 8. Muestra la inducción de tolerancia al fármaco citotóxico bafilomicina A1 (macrólido) en la estirpe YPC3 de la levadura *S. cerevisiae* por la expresión de las secuencias nucleotídicas que codifican para H⁺-PPasas usadas en esta invención (SEQ. ID NO. 1, SEQ. ID NO. 2, SEQ. ID NO. 3), demostrada mediante determinación del crecimiento de cultivos por el método de goteo (Drop test).

FIGURA 9. Muestra la inducción de tolerancia al fungicida morfolino-derivado Tridemorph (Trid) en las estirpes YPC3 y SAH6 de la levadura *S. cerevisiae* por la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la H⁺-PPasa quimérica derivada de AVP1 TcGFP/AVP1 usada en esta invención (SEQ. ID NO. 3),
 5 demostrada mediante determinación del crecimiento de cultivos por el método de goteo (Drop test). Sólo las cepas que expresan la H⁺-PPasa presentan crecimiento en presencia de concentraciones del fungicida morfolino que impiden el crecimiento de cultivos control obtenidos al transformar las cepas originales con el vector conteniendo la secuencia nucleotídica que codifica para la sPPasa IPP1.

10

BIBLIOGRAFÍA

- Baltscheffsky, M., Schultz, A., Baltscheffsky, H. (1999) H⁺-PPases: a tightly membrane-bound family. FEBS Lett. 457, 527-33.
- 15 Beyenbach KW, Wieczorek H. (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. J Exp Biol. 209, 577-589.
- De Milito A, Fais S. (2005) Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. Expert Opin Pharmacother. 6, 1049-1054.
- Drozdowicz, Y.M., Rea, P.A. (2001) Vacuolar H⁺-pyrophosphatases: from the
 20 evolutionary backwaters into the mainstream. Trends Plant Sci. 6, 206-11.
- Farina C, Gagliardi S (2002) Selective inhibition of osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. Curr Pharm Des. 8, 2033-2048.
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999) The
 25 *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(4):1480-5.
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 11444-11449.
- Hernández, A, Serrano, G, Herrera-Palau, R, Pérez-Castiñeira, JR, Serrano, A
 30 (2010) Intraorganellar Acidification by V-ATPases: A target in cell proliferation and cancer therapy. Rec. Pat. Anti-Cancer Drug Disc. 5, 88-98.
- Hong J, Nakano Y, Yokomakura A, Ishihara K, Kim S, Kang YS, Ohuchi K. (2006) Nitric oxide production by the vacuolar-type (H⁺)-ATPase inhibitors bafilomycin A1

and concanamycin A and its possible role in apoptosis in RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 319, 672-681.

Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A, Forgac M. (2005) Structure and regulation of the V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr.* 37, 393-398.

5 Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG (2008) Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One.* 3:e2758.

Liao C, Hu B, Arno MJ, Panaretou B. (2007) Genomic screening in vivo reveals the role played by vacuolar H⁺ ATPase and cytosolic acidification in sensitivity to

10 DNA-damaging agents such as cisplatin. *Mol Pharmacol.* 71, 416-425.

Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 37-51.

Manabe T, Yoshimori T, Henomatsu N, Tashiro Y. (1993) Inhibitors of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase suppresses proliferation of cultured cells. *J Cell Physiol.* 157,

15 445-452.

Milgrom E, Diab H, Middleton F, Kane PM. (2007) Loss of vacuolar proton-translocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stress. *J Biol Chem.* 282, 7125-7136.

Niikura K. (2006) Vacuolar ATPase as a drug discovery target. *Drug News*

20 *Perspect.* 19, 139-144.

Perez-Castiñeira JR, Gomez-Garcia R, Lopez-Marques RL, Losada M, Serrano A. (2001a) Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? *Int Microbiol.* 4, 135-142.

25 Pérez-Castiñeira, J.R., López-Marqués, R.L., Losada, M., Serrano, A. (2001b) A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett.* 496, 6-11.

Pérez-Castiñeira, J.R., López-Marqués, R.L., Villalba, J.M., Losada, M., Serrano, A. (2002) Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by

30 bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15914-15919.

Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R.J., Rea, P.A. (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89,1775-1779.

Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J.R., Baltscheffsky, H., Baltscheffsky, M. (2004) Proton-pumping inorganic pyrophosphatases in some archaea and other extremophilic prokaryotes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 127-133.

5 Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J.R., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. (2007) H⁺-PPases: yesterday, today and tomorrow. *IUBMB Life* 59, 76-83.

Stevens TH, Forgac M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 779-808.

10 Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. (2004) Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta.* 1658, 106-114.

15 Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem.* 266, 17707-17712.

EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

A continuación se ilustrará la invención mediante algunos ejemplos experimentales que describen la obtención de las secuencias nucleotídicas que codifican para las secuencias aminoacídicas presentadas en las figuras SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, el método para la producción de células 30 fúngicas y animales que las expresan, así como el uso de dichas secuencias para que dichas células exhiban resistencia a fármacos y antibióticos citotóxicos, y a fungicidas.

EJEMPLO 1

Inactivación del gen *IPP1* y expresión de genes para H⁺-PPasas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

5

La Figura 7A muestra un esquema de uno de los plásmidos multicopia lanzadera (para transformación tanto de *E. coli* como de levadura) utilizado para transformar estirpes de *S. cerevisiae* con su gen *IPP1* bajo el control del promotor regulable *GAL1*, y conteniendo genes nativos y quiméricos que incluyen la secuencia nucleotídica que codifica para la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 de la planta *A. thaliana* (véanse Figuras 1-3).

10

Estirpes de S. cerevisiae utilizadas para la expresión de H⁺-PPasas

- Estirpe silvestre W303. Haploide (*MATa*, *leu2-3*, *tryp1-1*, *can1-100*, *ura3-1*,
15 *ade2-1*, *his3-11*). Posee su sPPasa citosólica nativa (gen de copia única *IPP1*).

- Estirpe YPC3. Deriva de W303. Posee el gen *IPP1* bajo el control del promotor modulable *GAL1*. Al carecer de sPPasa en presencia de glucosa tiene un fenotipo letal condicional por fuente de carbono (es inviable en presencia de este azúcar).

20

Esta estirpe fue usada por los inventores para demostrar la complementación funcional de la actividad sPPasa de levadura por H⁺-PPasas de plantas y microorganismos, siendo la primera demostración directa de la capacidad de hidrólisis de PPi in vivo por estas bombas de iones (Pérez-Castiñeira y col. PNAS 2002).

25

- Estirpe YPC4. Deriva del mutante YPC3, en ella el gen *VMA1* que codifica una subunidad catalítica de la V-ATPasa ha sido mutado insercionalmente. Esta estirpe, obtenida por el grupo de investigación, presenta un fenotipo letal condicional (no crece a pH superior a 7, y es sensible a cationes divalentes, como
30 Ca y Zn) además del citado para la sPPasa, lo que permite una fácil selección de complementantes funcionales por expresión ectópica de los transgenes.

- Estirpe SAH6. Deriva del mutante YPC3, en ella una isoforma vacuolar (gen *VHP1*) que codifica la subunidad a de la V-ATPasa ha sido mutado

insercionalmente, con lo que se inactiva únicamente la V-ATPasa localizada en la vacuola, y no la localizada en otras endomembranas (p.e. sistema Golgi). Esta estirpe, obtenida por el grupo de investigación, presenta un fenotipo letal condicional similar al de YPC4 (no crece a pH superior a 7, y es sensible a Ca y Zn) además del citado para la sPPasa, lo que permite una fácil selección de complementantes funcionales por expresión ectópica de los transgenes.

Estas estirpes se transforman por el método TRAF0 de alta eficiencia usando plásmidos autónomos multicopia derivados del plásmido pRS699.

10 **Genes de H⁺-PPasas**

Como consecuencia de su actividad investigadora, los inventores disponen de una colección de clones bien de ADN genómico o de ADNc que contienen secuencias codificantes de H⁺-PPasas de distintos organismos, las cuales se utilizan en la invención y pertenecen a las dos clases bioquímicas en que se dividen estas bombas de protones, clase I, estimuladas por potasio, y clase II, independientes de potasio (véase Tabla adjunta). Estos genes se expresan desde plásmidos autónomos multicopia bajo el control de promotores constitutivos potentes apropiados al organismo receptor (de los genes *PMA1* o *IPP1* en levadura; CMV de citomegalovirus en líneas celulares humanas), lo que resulta en altos niveles de expresión ectópica. Alguno de dichos genes y sus números de acceso en bases de datos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Números de acceso de proteínas H⁺-PPasas seleccionadas

| Organismo/proteína | No. Acceso NCBI |
|--|-----------------|
| Plantas | |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | |
| AVP1, clase I | AB015138 |
| 30 AVP2, clase II | AF182813 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | |
| TVP5, clase I | S61422 |
| <i>Hordeum vulgare</i> (HVP1, clase I) | BAB18681 |
| <i>Oriza sativa</i> (OVP1, clase I) | BAA08232 |
| Microalgas | |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (clase I) | AJ304836 |
| <i>Ostreococcus tauri</i> | |
| clase I | XP_003074398 |
| clase II | XP_003078917 |
| 40 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> | BAE19660 |
| (clase II, termofílica) | |

Protistas no fotosintéticos*Trypanosoma cruzi* (clase I) AAF80381*Toxoplasma gondii* (TVP1, clase I) AAK38076**Bacterias**5 *Thermotoga maritima*
(clase I, hipertermofílica) AAD35267*Rhodospirillum rubrum* (clase II) AAC38615*Chloroflexus aurantiacus*
(clase II, termofílica) ABY3453410 *Streptomyces coelicolor* (clase II) BAD36743*Carboxydotherrnus hydrogenoformans*
(clase I) YP_359158**Arqueas**15 *Pyrobaculum aerophilum* (clase II) AF182812

La detección de H⁺-PPasas nativas y modificadas por ingeniería genética se realizó por técnicas inmunoquímicas (Western blots utilizando anticuerpos específicos antiH⁺-PPasa y contra ciertas regiones (“tags”) de las proteínas recombinantes) y otras técnicas estándar de análisis de proteínas y actividad enzimática, tras la separación de las distintas fracciones subcelulares (membranas, fracción de proteínas solubles citosólicas, etc) mediante centrifugación diferencial y en gradientes de densidad.

25 La Figura 7B muestra la inmunodetección de la H⁺-PPasa AVP1 mediante Western blots de preparaciones de membranas de distintas cepas de *S. cerevisiae*: cepas control y expresoras de AVP1 y dos proteínas H⁺-PPasas quiméricas (TcAVP1 y TcGFPVP1) derivadas de dicha proteína vegetal.

30 EJEMPLO 2

Resistencia al macrólido Bafilomicina A1 en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan H⁺-PPasas de origen vegetal.

35 La Figura 8 presenta la inducción de tolerancia al fármaco citotóxico bafilomicina A1 (macrólido) en la levadura *S. cerevisiae* por la expresión de secuencias nucleotídicas que codifican para H⁺-PPasas usadas en esta invención (SEQ. ID NO. 1, SEQ. ID NO. 2, SEQ. ID NO. 3), demostrada mediante determinación del crecimiento de cultivos por el método de goteo (Drop test). Las células que expresan AVP1 y H⁺-PPasas quiméricas derivadas de AVP1 muestran

5 crecimiento en presencia de bafilomicina A1 en condiciones en la que una V-ATPasa activa es requerida para el crecimiento (pH neutro o alcalino; presencia de Ca²⁺ o Zn²⁺) y en las que la estirpe control (células transformadas con el vector pRS699b sin inserto) que no expresa ninguna H⁺-PPasa no muestra crecimiento.

EJEMPLO 3

10 **Resistencia al fungicida morfolino Tridemorph en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan H⁺-PPasas de origen vegetal.**

15 La Figura 9 muestra la inducción de tolerancia al fungicida morfolino-derivado Tridemorph (Trid) en las estirpes YPC3 y SAH6 de la levadura *S. cerevisiae* por la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la H⁺-PPasa quimérica derivada de AVP1 TcGFP_{AVP1}) usada en esta invención (SEQ. ID NO. 3),
20 demostrada mediante determinación del crecimiento de cultivos por el método de goteo (Drop test). Sólo las cepas que expresan la H⁺-PPasa presentan crecimiento en presencia de concentraciones del fungicida morfolino que impiden el crecimiento de cultivos control obtenidos al transformar las cepas originales con un vector conteniendo la secuencia nucleotídica que codifica para la sPPasa citosólica IPP1.

EJEMPLO 4

25 **Inactivación del gen *PPA1* y expresión de genes para H⁺-PPasas en líneas celulares de mamíferos, preferiblemente humanas.**

30 La inactivación de la actividad sPPasa citosólica en células de mamífero se realizará utilizando sistemas lentivirales y silenciamiento por ARNi. Este tipo de virus están especialmente diseñados para la introducción de DNA recombinante en células de mamífero, ya que son capaces de infectar todo tipo de líneas celulares, tanto si son de crecimiento rápido como si son quiescentes. El vector a utilizar es el denominado pTRIPZ shRNAmir. Este vector, se puede utilizar tanto en conjunción con los plásmidos pGAG y pEnv, codificantes de la polimerasa viral

y las proteínas de la envuelta, respectivamente, sobre células A293T (transfección de triple vector) o directamente sin otros plásmidos. En el caso de utilizar sólo el plásmido pTRIPZ shRNAmir, la transfección da lugar a expresión transitoria de los insertos de RNAi; esto es especialmente adecuado en el caso de líneas celulares sobre las que se desee obtener resultados rápidamente y estas líneas resulten de fácil transfección. Por otro lado, el sistema triple vírico sobre células A293T permite obtener partículas víricas infectivas que puedan ser utilizados sobre tipos celulares de difícil transfección y/o para casos en los que se pretenda integrar fácilmente la construcción de silenciamiento en el genóma del tipo celular. Para todo ello, el plásmido pTRIPZ shRNAmir consta de los siguientes elementos clave (entre otros):

- marcadores de resistencia a puromicina en mamíferos situados tras un elemento IRES. Este permite la expresión de dos ORF a partir de un mismo DNA.
- Un shRNA diseñado específicamente para el silenciamiento posttranscripcional del gen *PPA1* humano (Fig. 6), localizado aguas arriba del elemento IRES y tras la ORF de la turboRFP, una proteína fluorescente roja que permite visualizar células que expresan el shRNA
- Promotor inducible por doxíciclina que permite la expresión regulada del conjunto anteriormente mencionado.

Lineas celulares utilizables, entre otras, son:

- HEK 293 , riñón embrionario humano;
- NB9, neuroblastoma humano; MCF-7 y MCF-7/HER2, células tumorales de cáncer de mama humana (la línea MCF-7/HER2, tiene integrada una construcción que sobreexpresa el gen HER2); A293T, células de origen renal embrionario humano; HeLa, células tumorales de epitelio de cuello de útero humano; HCT116 y HCT116/p53-/-, líneas celulares de cáncer de colon humano (la línea HCT116/p53-/- posee las dos copias cromosómicas del gen TP53 inactivado por recombinación homóloga);
- MCF-7 y MCF-7/HER2: células tumorales de cáncer de mama humana. La línea MCF-7/HER2, tiene integrada una construcción que sobreexpresa el gen HER2
- A293T: células de origen renal embrionario humano
- HeLa: células tumorales de cuello de útero humano

HCT116 y HCT116/p53^{-/-}: líneas celulares de cáncer de colon humano, la línea HCT116/p53^{-/-} posee las dos copias cromosómicas del gen TP53 inactivado por recombinación homóloga.

NIH/3T3, fibroblastos de ratón (modelo de mamífero).

5

Las células se transfectan utilizando lipofectemina 2000. Las construcciones de DNA con las secuencias de H⁺-PPasas se clonan en el plasmido pcDNA 3.1 (Invitrogen) que contiene un promotor viral *CMV* (citomegalovirus), entre otros

10

vectores adecuados para la expresión de proteínas heterólogas en células animales. Los transfectantes estables se obtienen mediante selección con Neomicina u otros anitibióticos. Como método alternativo, se realiza una transfeccion directa de proteínas H⁺-PPasas recombinantes purificadas. Las proteínas ya expresadas en bacterias o levaduras con un tag, se purificarían con una columna que une Histidina o GST, y se transfectan directamente con el kit

15

Pro-Ject (Pierce).

Las células de mamífero expresas de H⁺-PPasas de forma permanente o transitoria, y con su sPPasa PPA1 inactivada, se cultivan en presencia y ausencia de Bafilomicina A1 (u otros macrólidos) y se compara su crecimiento con el de células control mediante citometría de flujo y otras técnicas estándar de Biología Celular. El crecimiento de las células de mamífero expresas de H⁺-PPasas no se afecta por concentraciones del macrólido que inhiben el crecimiento de las células control.

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica de una pirofosfatasa translocadora de protones (H⁺-PPasa) con al menos un 30 % de identidad con las secuencias codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 para producir en células fúngicas y animales tolerancia a fármacos y antibióticos citotóxicos inhibidores de la ATPasa translocadora de H⁺ vacuolar (V-ATPasa), y a fungicidas morfolinos.
2. Uso de un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según las reivindicación 1.
3. Uso de una célula fúngica o animal transformada o transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 2.
4. Uso de la célula según la reivindicación 3 que comprende cualquier producto de la expresión del ácido nucleico aislado.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el ácido nucleico aislado está unido funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.
6. Uso según la reivindicación 5 donde la secuencia reguladora de la expresión génica es la utilizada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o cualquier otra apropiada para expresar proteínas en células fúngicas o animales.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la célula transformante es una célula fúngica.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la célula transformante es una célula animal.

9. Una célula fúngica aislada obtenida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 conteniendo las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 ó 3, transformada o no con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o secuencias homólogas
5 conteniendo otros genes *IPP1* de origen fúngico.
10. Una célula animal aislada obtenida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 conteniendo las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 ó 3, transfectada o no con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica de ARNi
10 derivada de SEQ ID NO: 6, o secuencias homólogas conteniendo otros genes *PPA1* de origen animal.
11. Un tejido, órgano u organismo fúngico o animal que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10.
- 15 12. Un organismo según la reivindicación 11 que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* u otra especie de hongo.
13. El organismo según la reivindicación 11 que pertenece a una especie
20 animal, preferiblemente de mamífero.
14. Una progenie o parte del organismo que procede de cualquiera de los organismos según las reivindicaciones 11 a 13.
- 25 15. Un método para la obtención de la célula fúngica según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende:
- 30 a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada, en un vector,
- b. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (a)
- 35 c. Insertar en un vector las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o secuencias homólogas de origen fúngico, destinadas a inactivar el gen de la sPPasa citosólica *IPP1* o cualquier homólogo fúngico, mediante inserción por
40 recombinación homóloga en la región cromosómica correspondiente

- d. transformar una célula con el vector obtenido según el apartado (c) y
- e. seleccionar la célula doblemente transformada según los apartados (b) y (d) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada, y cuyo gen *IPP1* está inactivado, y que presenta resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos y a fungicidas.
- 5
16. El método para la obtención de la célula fúngica según la reivindicación 10 15, caracterizado porque las etapas de dicho método se suceden en el siguiente orden: c), d), a), b), y e).
17. Un método para la obtención de la célula animal según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende:
- 15 a. insertar las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada, en un vector,
- b. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (a)
- c. Insertar en un vector la secuencia de ARNi diseñada para el silenciamiento génico del gen de la sPPasa citosólica *PPA1* humana o cualquier homólogo animal,
- 20 d. transfectar una célula con el vector obtenido según el apartado (c)
- e. seleccionar la célula doblemente transfectada según los apartados (b) y (d) que comprende la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas heterólogas codificadas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o para cualquier otra H⁺-PPasa natural o modificada, y cuyo gen *PPA1* está inactivado, y que presenta resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos.
- 25 30
18. El método para la obtención de la célula animal según la reivindicación 17, caracterizado porque las etapas de dicho método se suceden en el siguiente orden: c), d), a), b), y e).
- 35
19. Un método para obtener un tejido u organismo fúngico o animal según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 que comprende:
- 40

- a. regenerar al menos una planta procedente de la célula obtenida según el apartado (e) de las reivindicaciones 15 a 18,
- b. seleccionar uno o varios tejidos u organismos regenerados según el apartado (a) que expresa, al menos, la secuencia nucleotídica que codifica para una H⁺-PPasa y tiene su gen cromosómico para la sPPasa citosólica inactivado, y
- c. seleccionar uno o varios tejidos u organismos obtenidos según el apartado (b) que presentan resistencia a fármacos o antibióticos citotóxicos o a fungicidas, como se indica en reivindicaciones anteriores.

10

20. El método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 donde la secuencia nucleotídica que codifica para una H⁺-PPasa en SEQ ID NO: 1, 2 o 3 o secuencias homólogas están unidas funcionalmente a una secuencia reguladora de la expresión génica.

FIG. 2

GAATTCAGGCTTCCTGAAAACGGAGAAAACATAAAGCAGCATTCTGGGATCACCCATACATC
 ACTCTGTTTCTCCGACCTTTTCGGTAATTTGAAAACCAACCCGGCTCGAAGGGGAT
 CCGGCGATAATTCGGCAGAAATAAACCCATACAGGACGCTAGAACCCGCGCATGGC
 CGGAGAAACTCTCCGGAGAAATTCGTAACCTCGCGCGCATTCGATCTGATTTCTTAATGC
 GGCACTCCAGGCTCGATCGAGACCGTTTCCATTCGTTTTTTGTGCTTTTTCCCTC
 GTTCACAGAACTCTGAAGAAGCTATAGTAGAATATGAGCTTTTTTTGTGCTTTTTCC
 TTTTTTTTTTTTACCTCTGGGAAATGTTACTCTCAGACTCTTAGTCTGTTGTTG
 TTTCTTTTTCGAAATTCAGCGGTGAGAAACCGTCTGATGTTGGTTCGCTTATGC
 FCCCCCTCATTAGTTTCGATATATAAAGGCCAAATATTGATATTTTCAAATGCTCT
 ATCATTATGCTAAACATCTAATTTCTCTTAAATTTTTCTCTTTCTTCTATAACACCA
 ATAGTGAATACTTTTTCTCTCTATACTCAAAACCTTTTTTTCTATCAACCTCGTT
 GATAAATTTTTCTTAAACATCGTTAATAATAAATAAATGGAAAAAATCAACATTTTTCT
 CTCTTTTATACACATTCAAAAGAAAAGAAAAAATATACCCGACCTCGACATTTGGG
 M
 TGACATGAAGGTTTCATCGTGGCGGTGCGGGCGGTGTTTACTCGCAGCCCGTCTCG
 DMKRFIVAVAAVCLLAATV
 CGCCACCGCGGGGTCGACAAATGTTGGCGCTGCTTTGTTACCGGAGCTCGGACGG
 AAPAGVDKMMVAPALLPELWT
 AGATCCTTGACCGATTTTGGGGTATGGTATCGCTTTTCGCTTTTCAATGGTACGT
 ELLVPCRAVIGSAAFLQWYV
 TGTACTCGCTGAAACTCACTCTGACCTCGCGGCTGCTCTCGCGTGGAGTAACAAT
 VSRVKLTSDDLGAASSSGGANN
 GGAAGATGGATACGGTATTATCTAATCGAAGAGGAGGTTTAAATGACAGAGTG
 GKNGYGDYLIEEEEEGVNDQS
 TGTGCTAAGTGGCTGAGATTTCAGACTGCTATTTCGAAAGGTGCACTTATCTCTATT
 VVAKSEIQFAATSEATSTFF
 CACGGATGACAAATATGTTGCTCTTCATGATTTCTTGGCTGCTGATCTTTGTTT
 TEYKYVGVFMIFFAAVIVFV
 CTCGGCTCTGTGAGGATTCAGACTGATAACAAGCTTGTACTTCGACACCACGAA
 LGSVEGEGFSTDNKPCCTYDTR
 CCGAAGCTGCATTGGCTACTGACGCTTCAGTACATTGCTTTTCGCTTGGTCTGT
 TCKEALATAAATSTAVLDGAV
 TACTCTGCTTACTTCGCTCTCTGATGACAGATTGCTCACTACCTTAAGCTAGGACC
 TSVLSGFLGMKIAITYANART
 ACTTTGAGGCGAGAAAGGTGGAAAGCGCTTCAATGTCATTGAGTCTGCTGCTGT
 TLEARKGVGKAFIVAFRSGA
 TGAATGGTTTCCTTTCGAGGAGTGGCTTATGGTTCATTAATCTACTATCAATGTT
 VMGFLLAASGLLVLYTLLNV
 CAGATCTTACGGGATGCTCGGAGACTTTTGGAGCTTTTACTGATCTGATGGTCT
 KIYVGDDEGLEEAITGVGL
 GGTGGCTTCCATGGCTCTCTTTGGCGGTGGTGGGATCTACCTAAGGCTGCTG
 GSSSMALFGRVGGGIYTKAA
 ATGTCGGCGCTGACCTTGTCTGTAATAATGAGAGAAATTCAGAGGATGATCCAAAGAA
 DVGADLVGKIEERNIPEDDFRN
 CCGAGTCTTACGGGATGCTCGGAGACTTTGGGAGACTTTGAGATCTGATGATGAGCTG
 PAVVADNVGDNVGDIAAGMG
 GATCTTTGGATCATATGCTGAAGCATCATGCGCTGCTTGTGTTGCTCGATCTCAT
 DLFGSYAEASCAALVVASIS
 CTTTGGAAATCAACCGACTTCACTGCACTGCTACCACTGCTCATGTTCAATGGG
 SFGINHDFTAMCYPLLLISSMG
 AATCTGGTGTGTTGATCAGACTGCTCTGCGACGATGCTCTCTGAGATTAAGCTGCT
 ILVCLTTLFATDFFELV
 AAGGATGAACGACTTGAAGAACGCTTATCTCAACTGTATTATGACTGTTG
 KEIEPALKNQLIISTVIMTV
 GTATTGCTATTGCTGATGGTGGCTTACCGACTCTTACCATCTCAACTTTGGAAC
 GIAIVSWVGLPETSFTIFNFGT
 ACAAAAGTTTCAGAACTGGCAGCTATTCCTTGGTGGTGGCTTTGGGCTGGA
 QKRVKRWGLCVGLVHNS
 CTCATTATGGTTCGCTACTGACTACTACTAGTAACGCTACAGCCCTGTGCAAGATG
 LIIGFVTEYYTNSAYSVPVQD
 TTGCAGATCATGCAAGCTGGTGCAGTACCAATGTATCTTCGCGCTTGTCTTGGTAA
 VADSCRTGAATNVIFGLALGLY
 CAAATCGCTATTTCAACTTTGCTTATGCTATCAGTATTTCTGTTAGCTTCAGCTTT
 KSVIIPAFAPAFAPAFAPAF
 GCTGCTATGATGGTGTGCTGCTGCTGCTTGGTATGCTCAGTACCATGCGACTGTT
 AAMYGVAVAAALGLMLSTIATG
 TGGCAATGATGCTTATGGTCCCATGCAATGCTGGTGGTATTGCTGAAATGGCTGG
 LAIDA YGPISDNAGGIAEMAG
 AATGAGCCCGCATCGTGAAGAACTGATGCTTGTGCGGCTGGAAACCACTGCT
 MSHHRETDALDAGHTT
 GCTATGGAAGGATTTGCAATGGCTCTGCGGCTGCTCTCTGCTGCTCTTGGTGTG
 AIGKGF AIGS AALVSLALFG
 CCTTGTGAGCGGTGAGGATCCACCGTATGATTTTGGCCCTAAAGTTATCATGG
 AFVSRAGIHTVDVLTPEKVIIG
 GCTCCTTGTGGTCCATGCTTCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 LLVGARNLDFWFSANTHKEV
 AGTGCAGCTCTTAAATGTTGAAGAGTTCGAGGAGTCAACACCATCCCTGGACTTA
 SAALKMVEEVR RQFNTIFGL
 TGAAGSAAACCGAAAACAGACTACGCCACATGCTCAAGATCTCCACGATGCTCCAT
 MEGTAKPFDYATC V K I S T D A S I
 CAAGAAATGATACCTCGGTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 K E M T P F G C L V M L T P L V G F F
 TTTGGATGAGACCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 F G V E T L S G V L A G S L V S G V Q I
 CGATACAGCATCTACACTGTTGGTGGCTGGGCAACGCGAAATAATACATCGAGGCTGG
 A I S A S N T G G A W D N A K K Y I E A G
 TGTATCAGAGCCGAAAGAGCTTGGACCAAGGGTTCAGAGCCACACAGGCGACTGTG
 V S E R A R S L G F K G S E P R K A A V
 ATGGAGCACAAATGGAGCCATGAGGATGCTCAGGACCTCATGAGACTCTCA
 I G D T I G D P L K D T S G P S L N I L
 TCAAGCTCATGGCTGATGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 I K L M A V E S L V F A P P F A T H G G I
 CTTTTCAGACTCTAATCTAGTGGCGGCTGCAAGTTCGAGGACTTTTCTTTCTTT
 L P K Y F
 TTTCTTGGTATTTTCCATTTTAAATTAAGAACGACAAAGTCAATATTTCTAA
 TAGAGCAAAATCACAAACGCAATTTCACTTTAATTTTTTGAAGCACTTTATTT
 AGCTAATCTTAAATTTAATATAATGACACACACTAATTTATCAATTTATTTT
 TATTGATGAGATTTGAAATATTTGGTATCTTTGCAAGATTTTGTATAGAGGCAAAAG
 AATCGTCTTATTTAGGTCAAGGCTTACGCTAATAATGTTCTTCCGCGACTCTCTATAA
 TACTTTAAGATCTCTCTGTTGCTCAATTTGGAAGTCTCGTTAGCTTTATGCGGCCA
 TACAGACTCAAGATACACTCTCATGACATACAAATTTACTACACTACTCTGAA
 ATATGAACCAAGTACATATTAAGACGATGATTCGATGATGGAAGCGCCCTCGCG
 AATACCTTACTGATTTTGGCGGTTAATCGCATGAAATTTCTTCGCAAGAAGCAAA
 CAAATCGCCAGGCACTTACCAATTTCTTTCTTATGAAGATGTAAGACTACTAACC
 CACATTACTAGATGACTGATTTAGTCTGACCTTCTATACTATAACTACCTGGCGTA
 TGAATGAGCGGTTCTTTATTCGGAAACGAAATTCGGGACCGCGAAATTTGGCCG
 GTTGTGCGAAACCGGCTCATGAGCGGCTCAATGATGATGAAATCTATTTAAACG
 CAGAACTTAACTCACTCATACGCTGTTCGCGTAATTTCTCAAAATCTAAGCAGTC
 AACAAATTAAGAAATTTGAAATTTGACAGTTTTTGTGCTCATGATTTTATTTATTTG
 CTGTTTTAATCATGTTTTACACTCCATCCAAGGTTCAAGAACTCTTTACGATAAGGTTT
 TGAATGACATGTTGCTCATGATGAAATGTTCTTTTTTGTGTATATCGACAGACA
 CTTGGTCTAAGATCACTCTCCAGACTT

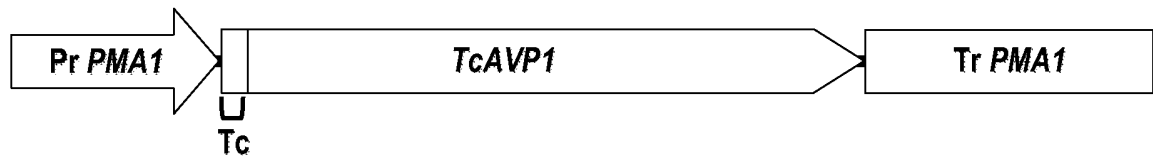


FIG. 3

```

GAATTCAAGCTTCTCGAAACGGAGAAACATAAACAGGCATTGCTGGGATCACCCATACATCACT
TGTTTGCCTGACCTTTCCGGTAATTTGAAACAAACCCGGTCTCGAAGCGGAGATCCGGCGG
AAATTCGCCAGAAATAACCCATACACAGAGAGCTAGAACCCGCCACATGGCCGGAGAACTC
TCCGAGATTTCGTAAGCTGGCCGCTATGCTCCCTCCGATGATTTCCGTAAGGAGAAATAACCC
GATCGAGACCGTTATCCATTCTTTTGTGCTTTTCCCTCGTCCACAGAAAGTCTGAAG
AGCTATAGTAGAATGAGCTTTTGTGTTTCTGTTTCTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTG
AAATGTTACTCTCACACTCTTAGTTCGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
CGAAGCTGTCATGGGTATGCTTTATGCTCCCTCCGATGATTTGCGATATATAAAG
CCAAATATTGATATTTTCAAATGCTCATATGCTCAACATCTAATTTCTCTTAAAT
TTCTCTTTCTTCTATAACCAATAGTGAAATCTTTTCTTCTATACTCAAAAACT
TTTTTCTATCAACTCGTTGATAAATTTTCTTTTAAACATCGTTAATAAATAAATTAATG
AAATAACCATTTTCTCTCTTTTATACACATTTCAAAGAAAGAAATAAATAACCCAGC
TCGCATTTAGGCTTACATGAGAGGTTTCATCGTGGCGGCTGGCGGTTGTTTCTCGCAGCC
M G D M K R F I V A V A V C L L A A
ACCCTGCGCCGACCCGGGGGTTGCTCTAAAGTGAAGAATTATCACTGGTGTGTCCC
T V S A A F A G V M S K E E L F T G V P
AATTTTGGTGAATAGATGGTGTATGATGACAAATTTCTGCTCCGGTGAAGTGA
I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E
GTGATGCTACTACGTTAAATGACCTTAAATTTTGTACTACTGTTAAATGCCAGTTC
G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P
TGGCAGCTTATGCTACTCTTGGTATGGTGTTCAGATTTTCTGATAGTACCCAGTAT
W P T L V T T F G Y G V Q C F A R Y P D H M
GAAACACATGACTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAAGTTATGTCAGAAAGAACTATTTT
K O H D F F K S A M P E G Y V O E R T I F
TCAAAGTGAAGCTTACTACAGACAGCTGAAGCTCAAGTTTGAAGTGAATCCCTAGTTA
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N
AGAATCGAATTAAGGTATTGATTTAAAGAAAGTGAACATTTTAGTTCACAAATTTGAAR
R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y
CAATATACTCAACATGTTTACAGCTGACAGCAAGAAAGATGATCAAGTTAE
N Y N S H N V Y I M A D A K O R N G I K V N
TCAAATAGACACAACTGAAGTGGTCTGTTCAATAGCTGACCATATCAACAAAATAE
F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q O N T
CAAATGGTATGCTCCAGTCTGTTACAGACACCATTACTTACCTCAATCGCTTAE
P I G D G P V L L P D N M V L S T O S L S
CAAAGATCAAACGAAAGAGAGACACATGCTTGTGATGATTTGTTACTGCTGCTGAT
K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I
CCGATGGTATGATGATGTTCAAACTCGACAGATGGTGGCGCTGTTTGTACCCGAGCT
T H G M K D L M V L S D L S A S S G A N N
TGGACGAGATCCTTGTACCGATTGTGGGTGATGGTATCGCCTTTTCCGCTTTCCAAATG
W T E I L V P I C A V I G I A F S L F Q W Y
CGTTGTCTCGCGTAACTCACTCTGACTCGCGGCTGCTTCCGGTGGAGCTAACAA
V V S R V K L S D L S A S S G A N N
GGAAGAATGGATCGGTATGATCAATCGAGAAAGGAAAGTGTAAAGCAGAGTGTG
G K N G Y G D Y L I E E E E G V N D O S V V
GCTAAGTCCGCTAGATTCAGACTGCTATTTCCGAGGTGCAACTTCTTCTTCCAGGAG
A K K G A E I S T E A T F E I
CAAATATGTTGCTCTCATGATTTCTTGTGCTGTTATCTTTGTTTCTCGGCTGCTG
K Y V G V F M I F F A A V I F V F L G S V
AGGATTCAGCACTATAACAGCTTGTACTTACGACACCCAGAACTCGAAGCTGCTG
E C F T Y D T R D C K F L
GCTACTGCAGCTTCACTACCATGCTTCTGCTGCTGCTGCTTACCTCTGCTCTATCTGGT
A T A A F S T I A F V L G A V T S V L S G F
CCTTGGATGAAGTTCATACATACGCTATGCTAGACCACTTTGGAGCGAGGAAGGTG
L G M R I A T A N A T I E A R K G V
GAAGGCTTCAATTTGCTTCACTGCTGCTGCTGATGGGTTTCTTCTTCCAGGATG
G K A F I V A F R S G A V M G F L L A A S G
CTATTGTTGCTTACTACTATCAATGTTCAAGATCTATTACGAGATGACTGGGAAGTE
L L V L I T I N V F K I Y G D D W E G L
TTTTGGCTTACTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
F E A I T G Y G L G G S S M A L F G R V G
GTGGATCTACAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
G G I Y T K A A D V G A D L V G K I E R N I
CAGAGATGATGACAGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
P E D D P R N P A V I A D N V G D N V G D I
TGCTGATGGGATGCTGCTGCTTGGATCATGCTGAAGCATATGCTGCTGCTGCTGCTG
A G M G S D L F G S Y A B A S C A A L V V
CCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
A S I S S F G I N H D E F T A M C Y P L I S
TCAATGGGAACTTGGTGTGTTGATCACAACCTCTTTCGCCACTGACTTCTTGGATTAAG
S M G I L V C L I T T L F A T D F F E I K L
TGCTGAAGATGACAGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
V K E I E P A L K N Q L I S T V I N T V
GATTGCTATTGCTCATGGTGGCTTACCAGCTCCTTACCATCTTCAACTTGGAAACA
G I A I V S V G L P T S E T I F N F G T O
AAATGTTCAAGCTGCGACTTATCCCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
P L V V K N W O F L V C V L C V I W I
TGGTTCGCTCAGTACTACACTAGTAAAGCTTACAGCCCTGCGAAGATGTTGAGATTCE
G F V T E Y Y T S N A Y S P V Q D V A D S
CGAGAACTGGCAGTACCAATGTTTCTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
C R T G L A L V F L V K S V I
CCAACTTTGCTATTGCTATCAGTATTCGTTAGCTTACGCTTGTGCTGCTATGTTGTTG
P I F A I A I S I F V S E S F A A M Y G V A
TGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
V R A I T G L I A T G L I D A Y G P
TCAGTGAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
I S D N A G G I A E M A G M S H R I R E R T
GATGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
D A L D A N T A I G K G F F I S S A
TCCCTAGTCTCCTTGGCTCTTGGTCTTGTGAGCCGCTGAGGGATCCACCCGCTAGAS
A L V S L A L F G A F V S R A G I H T V D
TTTTGACCCATAAATATATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
V I T F K V T L V S A N L F V F S A
ATGACAAATGAAGGCTGGGAGCTGCTTAAAGTGGTGAAGAGTTCGACGCACTTCA
M T M K S V G S A A L K M V E E V R R Q F N
CACCATCCCTGACTTATGGAAGAACCGCAACAGACTAGCCACATGCTCAAGATCCE
T I F G L H E S T A K F D Y A T C V K I S
CCGAGCTTCCATCAAGGAATGATACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
T D A S I K E M I P P G C L V M L T P L I V
GGTTCTTCTTGGAGTGGACCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
G F F F G V E T L S G V L A G S L V S G V Q
GATCCCATATCAGTATCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
I A I S A S N T G G A W D N A K K Y I E A
GTGTATCAGACCGCAAGAGCCTTGGACCAAGGTTTCAAGCCACACAGGCACTGTGAT
G V S E H A K S L G P K G S E P R K A A V I
GGAGACAAATGAGAGCCCTGAGAGATCTGAGACCTTCTATGAACTCTCATCAG
G D T I G D D P L K D T S G P S L N I L I K L
CATGGCTTGGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
M A V E S L V F A P F F A T H G G I L F K
ACTTCTAGTGGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
Y P
TTCCATTTAAATATGAACGCCACAAAGTCAATATTCTAATAGAGCACAATTCACAAR
CGCAGATTCACATTAATATTTTGAAGACATTTATTTAGCTAATTTCTAATTTTAAE
TATATATGACACACTAATTTATCTAATTTTATTTAGTGAAGATTTGAAATTTG
TACTTTCGAAGTSTTTGATAGAGGCAAAAGATGCTTATTATGCTCAAGCTTAC
CAATAAGTTCCTGCCAGCTCTTATAACTTTAAAGATCTCTCTGCTTGTCTCATTG
AAGTCTGCTTACGTTTATGCGCCATACAGACACTCAAGATACACACTTACATGAACATAE
AATTTACTAACACTCTGAAATATGAACCACTACATCATATGAGCCTGATTTGATG
TTCGAGGCTTCCGACACTTCTGAGATTTTCCGCTAATCCGCAAGTCTCTG
CACAGAAAGCAAACTCCGAGGCTTCTACAGATTTCTCTTCTTATGAGATGAAR
CTACTAACCGCACATTACTTAGATGACTCAGTTAGTCTGACTTCTATACTATACTCC
CGCTATGATGATGAGCGGTTCTTTATTCGGAACGAAATTCGCGGACCGGCAATTTGC
CGTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GACTTACTACTCATCAGCTGTTCCGCTGAATTTTCTCAAAATATCTAAGCAGTCAACA
TATAAAGAAATGAAATTTGACAGTTTTTGTGCTATCGATTTTATTTATTTGCTGTTTAA
TCATGTTTACTCTCCATCCAGGTTCCAAGACTCTTACGATAAGGTTTTGATGACATGT
GCTCTCAGATGAAATGCTTCTTTTGTGATATCGACAGCACTGGTCTGTAAGTGC
CTTCCAGACTT
    
```

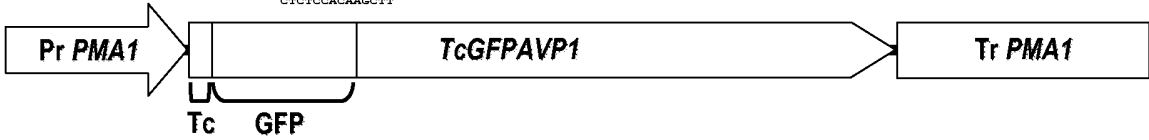


FIG. 4

```

gggccccgacgtgcgatgctccccggccgcccattggccgggggatGGATAATATCATGATTAGCCGCC
GAATTTTATGTAACATAAAAGGTTCTTGGGGGACTTTGAAGCCCAGGTAGAAGTGTTCATTACACAG
AAGGAGATGCCAATGTGCTATTATTATCCCTGTGTGGCCCACTATTCAAACGGATTTGACTGTCCT
GCAAAATATCGTCATCGCAGACGCTAAGGTTGTTGGGAGAAGCCACAGTCATTAGGTACGATAGTC
TCATGATGACTTTTTCTCGTTTTTTTTTCGACGTTTTAAAGTCCGCGTCGAAGTTAGGAAGGTTAGTT
CATTTACAACCTGTTTTTGAATACTTACTTTCTTAATCATCTATTTTGTATTGTTGTCCTTAGTTC
CTATAGAACAGGATAGCTCCACCGCGGTGGCGGCGCTCTAGAAGTGTGGATCCGCTGCACGGTTC
CTGTTCCCTAGCATGTACGTGAGCGTATTTCCTTTTAAACCACGACGCTTTGCTCTTATTCAACGT
TTCCCATTTGTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGAAAACTTATCGAAAGATGACGACTTTTCT
CTAATTTCTCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTTGAACACGGC
ATTAGTCAGGGAAGTCATAACACAGTCCCTTCCCGCAATTTCTTTTTCTATTACTCTGGCCTCC
CTAGTACACTCTATATTTTTTATGCTCGGTAATGATTTTCATTTTTTTTTTCCACCTAGCGG
TGACTCTTTTTTTTTCTTAGCGATTGGCATTATCACATAATGAATTATACATTATATAAATAAT
GTGATTTCTTGAAGAATATACTAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGCAAGATGACAGAG
CAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAATGAAACCAAGATTCAGATTGCGATCTCTTTAAAGGTT
GGTCCCTAGCGATAGACACTCGATCTTCCAGAAAAGAGGGCAGAAGCAGTAGCAGAACCGCC
ACCAAATCGCAAGTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGTTTCTGGACCATGATACATGATGCTC
GCCAAGCATCCGCGCTGGTCCGTAATCGTTGAGTGCATTGGTGACTTACATAGACGACCATCAG
ACCCTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGTCAGGCTTTTTAAAGAGGCCCTAGGGCCGCTGCGTGG
GTAAAAAGGTTTGGATCAGGATTTGCGCCTTTGGATGAGGCACCTTCCAGAGCGGTTGGTAGATCT
TCGAACAGGCGGTACGCACTGTGCAACTTGGTTGCAAGGGGAGAAGTAGGAGTCTCTCTTGC
GAGATGATCCCGCATTTCTTGAAGGCTTTGCAGAGGCTAGCAGAAATACCTCCACGTTGATTGT
CTGCGAGGCAAGAATGATCATCACCGTAGTGAGAGTGCCTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCCATAAGA
GAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACAGTGTTCCTCCACCAAGGTTCTTATGTAGTGACAC
CGATTATTTAAAGCTCAGCATACGATATATATACATGTGTATATATGATACCTATGAATGTCAG
TAAGTATGTATACGAACAGTATGATACTGAAGATGACAAGGTAATGCATCATTCTATCGCTCAT
TCTGAACGAGGCGCGCTTCTCTTTTTTCTTTTTGCTTTTTTCTTTTTTTTTTCTTCTTGAAGTTCGAGAA
AAAAATATAAAGAGATGGAGGAACGGGAAAAAGTTAGTTGTGGTATAGGTTGCCAAGTGGTATT
CCGTAAAGAACACAAGAAAAGCATTTCATATATGGCTGAAGTGAAGCAAGTGCAAAATTTAA
GCATCAACGACAACAACGAGAAATGTTATGTTCTTCTCACTTAAAGAGAAAACCAAGAAGTGC
GAATAACAGTAGCAACTACAATAACAACAACGCGCGCTACAACGGTGGCCGTTGGCGTGGCAGCT
TCTTTAGCAACAACCGTCTGGTGGTTACGGCAACGGTGGTTTTCTCGGTGGAACAACGGTGGCA
GCAGATCTAACGCGGTTCTGGTGGTAGATGGATCGATGGCAACATGTCACGAGTCCCAAGAAACG
AAAAGGCGGAGATCGCCATATTTGGTGTCCCGAGGATCCccccgggctgcaggattcgatGCC
GCCGCGCAATTTACTAATGACCTACACTACCAGACAAATGGTGCCAAGAACACCTTGGAAATACAA
M T Y T T R Q I G A K N T L E Y K
AGTTTATATCGAGAAGGATGGTAAGCCAGTTTCTGCTTCCACGACATTCCCTTGTACGCTGACAA
V Y I E K D G K P V S A F H D I P L Y A D K
GGAAAACAACATTTTCAACATGGTTGTGAAATCCACGTTGGACCAACGCCAAGTTAGAAATCAC
E N N I F N M V V E I P R W T N A K L E I T
CAAGGAAGAACTTTGAACCAATCATCCAAGACACCAAGAAGGCCAAGTTGAGATTTGTTAGAAA
K E E T L N P I I Q D T K K G K L R F V R N
CTGTTTCCCTACCATGGTTACATTCAACAATATGGTGTCTTCCACAAACTTGGGAAGACCCAAA
C F P H H G Y I H N Y G A F P Q T W E D P N
CGTAAGCCACCCAGAACTAAGGCAGTTGGTGACAACGATCCAATTGATGTGTGGAATTTGGTGA
V S H P E T K A V G D N D P I D V L E I G E
AATATTGCTTACACTGGTCAAGTCAAGCAGGTTAAGGCTCTAGGTATCATGGCTTTATTGGATGA
T I A Y T G Q V K Q V K A L G I M A L L D E
AGGTGAGCCGATTGGAAGTATTGGCATTGATATTAACGATCCATTAGCCCCAAATTTGAACGA
G E T D W K V I A I D I N D P L A P K L N D
CATTGAAGATGTTGAGAAATCTTCCAGGTTCTATTGAGGGCTACTAACGAATGGTTCCAGAAATTA
I E D V E K Y F P G L L R A T N E W F R I Y
CAAAATCCAGATGGTAAGCCAGAAAACCAATTTGCTTCTCCGGTGAAGCTAAGAACAAGAAGTA
K I P D G K P E N Q F A F S G E A K N K K Y
CGCTTTGGATATCATCAAGGAAACACATGACTCCTGGAAACAATTAATGCTGGTAAGTCTTCTGA
A L D I I K E T H D S W K Q L I A G K S S D
CAGCAAGGGTATTGATTGACCAATGTTACTTTGCTGACACCCCAACCTACTCCAAGGCTGCCCTC
S K G I D L T N V T L P D T P T Y S K A A S
TGATGCCATCCACAGCTTCTTAAAGGCAGATGCTCCAATGACAAGTCTATTGACAAGTGGTT
D A I P P A S L K A D A P I D K S I D K W F
CTTCATCTCCGTTCTGTTTTAAatcaactagtgccggccgctgcaggtcgac
F I S G S V *
    
```

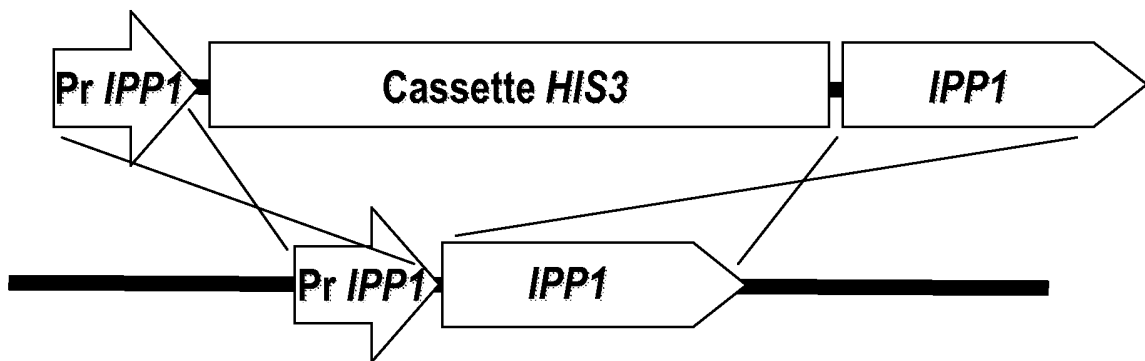


FIG. 5

```

gggccccgaqctgcaatgctcccgccgcccattggccggggatggataatatacatgatttagccgc
gaattttatgtaactaaaaggcttctgggggactttgaagccaggttagaagtgtttattcacag
aaggagatgccaatgtgctatttattatccctgtgtggcgcactattcaaacggattgactgtcct
gcaaaatattcgtatcgagcagctaaaggcttgggggagagccacagctatttagctacgatagct
tcattgatgactttttctgcttttttttcgagcttttaaggtcgccgtcgaagttaggaaagttatt
cattttacaacttgttttgaatacttactttcttaatcaatctatttttgattttgttgccttagct
ctatagAACAGGATAGCTCCACCGCGGTGGGGCCGCTAGAAGTACTGGATCCGCTGCACGGCT
CTGTTCCTTAGCATGTACTGAGCGCTATTCTCTTTAAACCCAGCAGCTTTGCTCTCATCAAGT
TTCCCAATGTTTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGAAAACCTTATCGAAAGATGAGCACTTTT
CTTAATCTCCTTTTAAAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTGAACAGCC
ATTAGTCAGGGAAGCTATAACACAGTCTTTCCCGCAATTTCTTTTTTCTATTACTCTTGGCCCT
TCTAGTACACTATATTTTTTATGCCCTCGGTAATGATTTTCATTTTTTTTTTCCACCTAGGG
ATGACTCTTTTTTTTTTCTTAGCGATTGGCATTATCACATAATGAATTATACATTATATAAAGT
GTGATTTCTTCGAAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGCAAGATGACAGG
CAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAATGAAACCAAGATTAGATTGCGATCTCTTTAAAGGT
GGTCCCTAGCGATAGAGCACTCGATCTTCCAGAAAAGAGGCAGAACAGTAGCAGAACAGGC
ACACAATCGCAAGTGATTAACGTCCACACAGGTATAGGGTTCTGGACCATATGATACATGCTCTG
GCCAAGCAATTCGGCTGGTTCGCTTAATCGTTGAGTGCAATGGTGACTTACACATAGACGACCATC
ACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGTCAAGCTTTTAAAGAGGCCCTAGGGGCGGTGGCTGA
GTAAAAAGGTTGGATCAGGATTGGCCCTTTGGATGAGGCACTTCCAGAGCGGTGGTAGATCTT
TGCAGACAGCGCTACGCACTGTGCAACTTGGTTTGCAGAGGAGAAAGTAGGAGATCTCTTTC
GAGATGATCCCGATTTCTTGAAGACTTTGCAGAGGCTAGCAGAAATACCTCCACCTGATGAT
CTGGGAGGCAAGATGATCATACCGTAGTGAGAGTGGCTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCCATAGA
GAAACCCTCGCCCAATGGTACCAACGATGTTCCCTCCACCAAGGTGTTCTATGTAGTGACAC
CGAATTTTAAAGCTGCAGCATAACGATATATATACATGTGTATATATGTATACCTATGAATGTG
TAATATGTATACGACAGTATGATACTGAAGATGACAAGGTAATGCATATCTTATACGTGTAT
TCTGAAGAGGCGCGCTTCTCTTTTTCTTTTTGCTTTTTCTTTTTTCTCTTGAACCTCGAAA
AAAAAATATAAAGAGATGGAGGAACGGGAAAAGTTAGTTGTGGTGATAGGTGGCAAGTGGTATT
CCGTAAAGACAACAAGAAAGCATTTCATATATGGCTGAACCTGAGCGAACAAAGTCAAAATTTBA
GCATCAACGACAACAACGAGAATGGTTATGTTCTCTCACTTAAGAGGAAAACCAAGAAAGTGCA
GAAATAACAGTAGCAACTACAATAACAACAACGGCGGTACAACGGTGGCGGTGGCGGTGGCAGT
TCTTTAGCAACAACCGCTGCTGGTGGTACGGCAACGGTGGTTCTTGGTGGAAACAACGGTGGCA
GCAGATCAACGGCGCTTCTGGTGGTAGATGGATCGATGGCAACATGTCCAGCTTCAAGAAAG
AAAAGCCGAGATCGCCATATTTGGTGTCCCGAGGATCCCCGGCTGCAGGAATTCGACAGGTT
ATCAGCAACAACAGCTATATCCATTCATATAGCTTACCACAGTGTGTGAACCAATGATACC
AGCACCACTGTAAACAAAACAATTTAGAAGTACTTCACTTTGTAAGTACTGAGCTGATTTAAT
TGAATTTTCAAAATTTCTACTTTTTTTGGATGGACGCAAGAAAGTTAATAATCATATATAGT
GGCATTACCACATATACATATCCATATCTAATCTTACTTATATGTGTGGAAATGTAAGAGGCC
CATTATCTTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGGAACCTTTCAGTAAATAGCCTTAACTGCTCATGCT
ATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCGAGCGGGGACAGCCCTCCGAGGAAGACTCTCCTCGT
GGCTCTGCTTCCAGCGCTCGGTCTCTGAACCGCAGTGTGCTCGCCCGCAGCTGCTCCGAC
AATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGTTTATGAAGAGGAAAATTTGGCAGTAACTGGCC
ACAAACCTTCAAATTAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGGGATAGCTTTTACCC
TTATTTCTGGGTAATTAATACCGAAGCGATGATTTTGCATCTATTAACAGATATATAAATGGA
AGCTGCATAAACCACTTAACTAATACTTTCAACATTTTCACTTTGTATACTCTTATTCAATG
TCATAAAGATCAACAAAATTTAATATACCTCTATACTTTAAGCTCAAGGAGAAAAACTA
TACTATGACCTACACTACCAGAAAATTTGGTCCCAAGAACCTTGGAAATACAAAGTTTATATGA

```

M T Y T T R Q I G A K N T L E Y K V Y I E

```

GAAGATGGTAAAGCCAGTTTCTGCCCTCCACGACATTCCTTGTACGCTGACAAGGAAAACAAGT
K D G K P V S A F H D I P L Y A D K E N N I
TTTCAACATGGTTGTTGAAATTCACGTTGGACCAACGCCAAGTTAGAAATACCAAGGAAGAAC
F N M V V E I P R W T N A K L E I T K E E T
TTTGAACCAATCATCCAAGACCAAGAAGGGCAAGTTGAGATTTGTTAGAACTGTTTCCCTKA
L N P I I Q D T K K G K L R F V R N C F P H
CCATGGTTACATTCAAACTATGGTCTTCCCAAAAATTTGGGAAGACCAAACTAAGCCACCC
H G Y I H N Y G A F P Q T W E D P N V S H P
AGAAACTAAGGCAGTTGGTGAACAGATCCAATTGATGTGTTGGAATTTGGTAAACTATTGCTTA
E T K A V G D N D P I D V L E I G E T I A Y
CACTGGTCAAGTCAAGCAGTTAAGGCTTAGGTATCATGGCTTTATTGGATGAAGGTGAGACGA
T G Q V K Q V K A L G I M A L L D E G E T D
TTGAAAGTTATTGCCATTGATATTAACGATCCATTAGCCCAAAATTTGAACGACATTGAAGAT
W K V I A I D I N D P L A P K L N D I E D V
TGAAATAACTTCCAGGCTTATTGAGGGCTACTAACGAATGGTTGAGAATTTACAAAATCCAGA
E K Y F P G L L R A T N E W F R I Y K I P D
TGTTAAGCCAGAAAACAATTTGCCCTTCTCGGTGAAGCTAAGAACAAAGATACGCTTTGGAT
G K P E N Q F A F S G E A K N K K Y A L D I
CATCAAGGAACACATGACTCTGGAAACAATTAATGCTGGTAAAGTCTTCTGACAGCAAGGTTAT
I K E T H D S W K Q L I A G K S S D S K G I
TGATTTGACCAATGTTACTTTGCTGACACCCCACTACTCCAAGGCTGCCCTGATGCCATCC
D L T N V T L P D T P T Y S K A A S D A I P
ACCAGCTTCTTAAAGGCAGATGCTCCAATTGACAAGTCTATTGACAAGTGGTTCTTCACTCGG
P A S L K A D A P I D K S I D K W F F I S G
TTCTGTTAAAttaactagtgcggccgctgcaggtegac

```

S V *

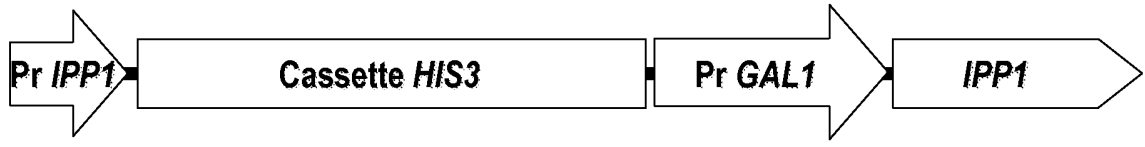


FIG. 6

ccggtccagtgctcgcagtgcgagggcgtggggctctctccttgtcagtcggcgccgctgcgggc
 tggtagctctgtggcagcggcgccggcaggactccggcactatgagcggcttcagcaccgaggagc
 M S G F S T E E R
 gcgcccgcgccttctccctggagtaccgagtccttctcaaaaatgagaaaggacaatatatctc
 A A P F S L E Y R V F L K N E K G Q Y I S P
 catttcatgatattccaatttatgcagataaggatgtggtttcacatggtagttgaagtaccagct
 F H D I P I Y A D K D V F H M V V E V P R W
 ggtctaattgcaaaaatggagattgctacaaaggaccctttaaacctattaacaagatgtgaaaa
 S N A K M E I A T K D P L N P I K Q D V K K
 aaggaaaacttcgctatggtgcaatttggctcccgataaaggatataatctggaactatggtgcc
 G K L R Y V A N L F P Y K G Y I W N Y G A I
 tccctcagacttgggaagaccaggcacaatgataaacataactggctggttggtgacaatgacc
 P Q T W E D P G H N D K H T G C C G D N D P
 caattgatgtgtgtgaaattggaagcaaggatgtgcaagaggatgaaataattggcgtgaaagttc
 I D V C E I G S K V C A R G E I I G V K V L
 taggcatattggctatgattgacgaaggggaaaccgactggaaagtcattgccattaatgtggatg
 G I L A M I D E G E T D W K V I A I N V D D
 atcctgatgcagccaattataatgatatcaatgatgtcaaacggctgaaacctggctacttagaag
 P D A A N Y N D I N D V K R L K P G Y L E A
 ctactgtggactgggtttagaaggataaaggttcctgatggaaaaccagaaaatgagtttgcgttta
 T V D W F R R Y K V P D G K P E N E F A F N
 atgcagaatttaagataaggactttgccattgatattattaaaagcactcatgaccattggaaag
 A E F K D K D F A I D I I K S T H D H W K A
 cattagtgactaagaaaacgaatggaaaaggaatcagttgcatgaatacaactttgtctgagagcc
 L V T K K T N G K G I S C M N T T L S E S P
 ccttcaagtgtgatcctgatgctgccagagccattgtggatgctttaccaccacctgtgaatctg
 F K C D P D A A R A I V D A L P P P C E S A
 cctgcacagtaccaacagacgtggataagtggttccatcaccagaaaaactaatgagatttctctg
 C T V P T D V D K W F H H Q K N * *
 gaatacaagctgatattgctacatcgtggttcctctggatgtattagaagtaaaagtagtagctttt
 caaagctttaaattttagaactcatctaactaaagtaaattctgctgtgactaatccaataact
 cagaatgttatccatctaaagcatttttcatatctcaactaagataacttttagcacatgcttaaa
 tatcaaagcagttgtcatttggagtcacttgtgaatagatgtgcaaggggagcacatattggatg
 tatatggtaccatattggttaggaaataaaattattttgctgaaacttggaaaaaaaaaaaaaa

FIG. 7

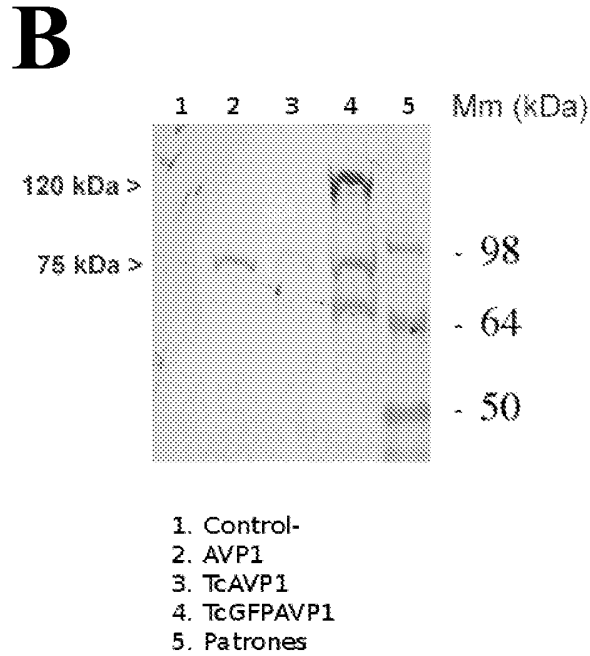
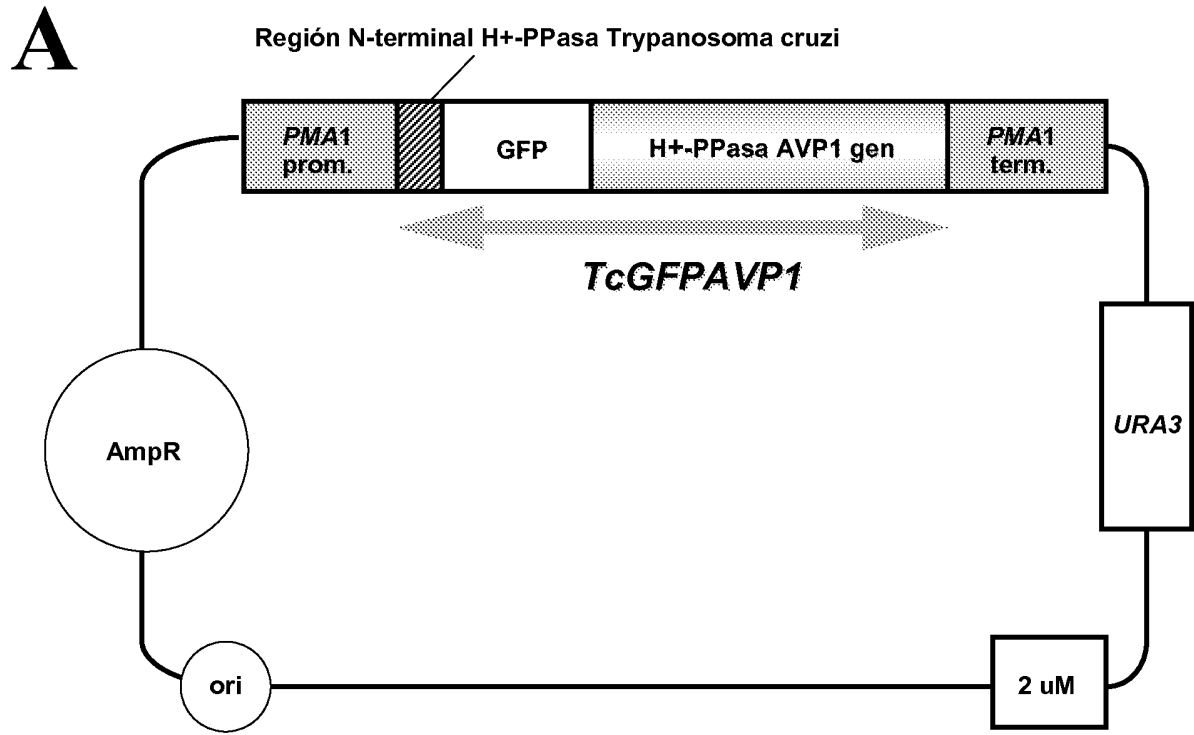


FIG. 8

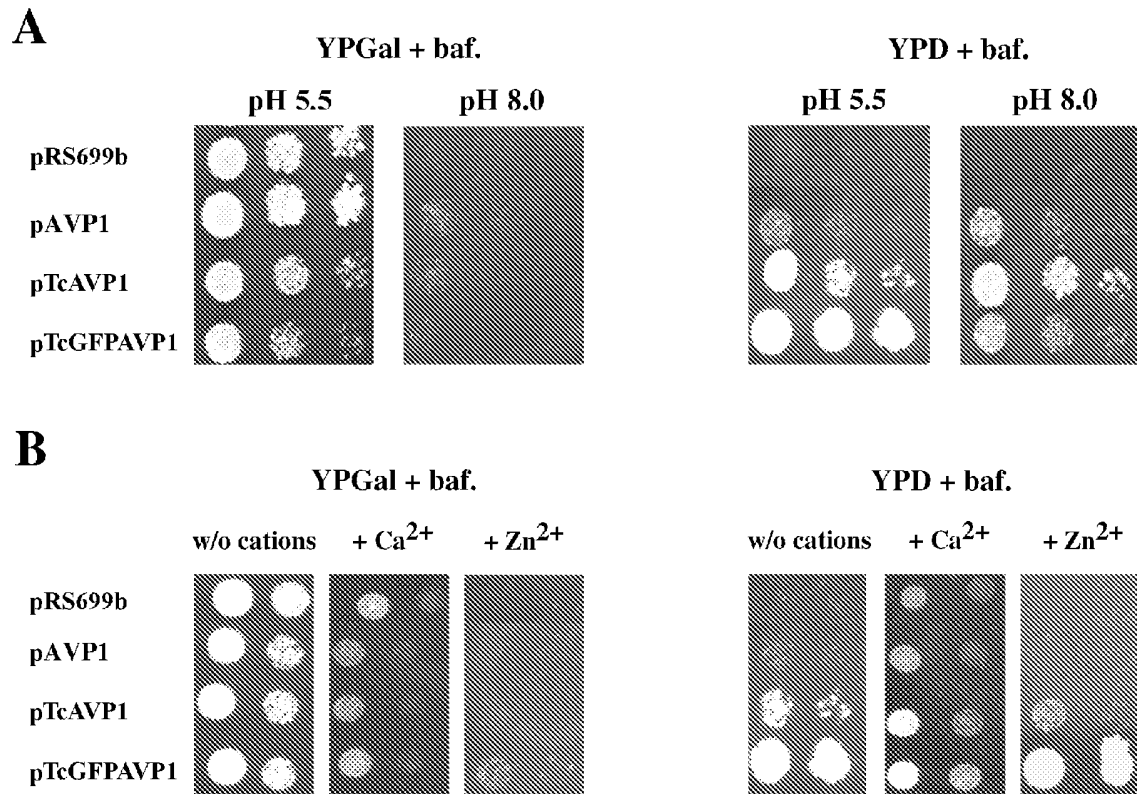
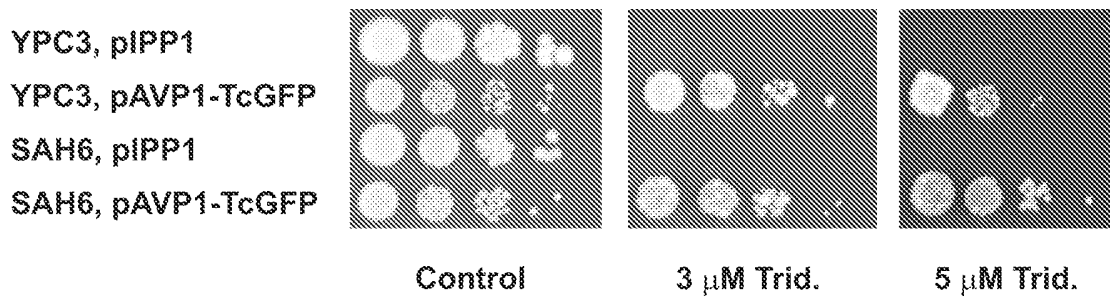


FIG. 9



LISTA DE SECUENCIAS

```

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
<120> USO DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS QUE CODIFICAN PIROFOSFATASAS
TRANSLOCADORAS DE PROTONES PARA PRODUCIR LEVADURAS, HONGOS Y CELULAS ANIMALES
RESISTENTES A FARMACOS CITOTOXICOS Y FUNGICIDAS, Y METODO PARA PRODUCIRLAS
<130> 5110111 AURELIO SERRANO
<160> 10
<170> BISSAP 1.0
<210> 1
<211> 4212
<212> DNA
<213> artificial sequences
<220>
<221> source
<222> 1..4212
<223> /mol_type="DNA"
      /note="construccion AVP1"
      /organism="artificial sequences"
<220>
<221> promoter
<222> 1..782
<223> /note="promotor PMA1"
<220>
<221> misc_feature
<222> 783..788
<223> /note="linker"
<220>
<221> C_region
<222> 789..3107
<223> /note="secuencia codificante de la H+-PPasa vacuolar de Arabidops
is thaliana"
<220>
<221> misc_feature
<222> 3108..3124
<223> /note="fragmento de p-GEM-T usado como vector en la clonación de
AVP1"
<220>
<221> terminator
<222> 3125..4212
<223> /note="terminador PMA1"
<400> 1
gaattcaagc ttctgaaac ggagaaacat aaacaggcat tgctgggatc acccatacat      60
cactctgttt tgcctgacct tttccggtaa ttgaaaaca aacccggctt cgaagcggag      120
atccggcgat aattaccgca gaaataaacc catacacgag acgtagaacc agccgcacat      180
ggccggagaa actcctgcga gaatttcgta aactcgcgcg cattgcatct gtatttccta      240
atgcggcact tccaggcctc gatcgagacc gtttatccat tgcttttttg ttgtcttttt      300
ccctcgttca cagaaagtct gaagaagcta tagtagaact atgagctttt tttgtttctg      360
ttttcctttt tttttttttt acctctgtgg aaattgttac tctcacactc tttagttcgt      420
ttgtttgttt tgttttattcc aattatgacc ggtgacgaaa cgtggtcgat ggtgggtacc      480

```

ES 2 403 541 A1

gcttatgctc ccctccatta gtttcgatta tataaaaagg ccaaatttg tattattttc 540
aatgtccta tcattatcgt ctaacatcta atttctctta aattttttct ctttctttcc 600
tataacacca atagtgaaaa tctttttttc ttctatatct acaaaaactt tttttttcta 660
tcaacctcgt tgataaattt tttctttaac aatcgttaat aattaattaa ttggaaaata 720
accatttttt ctctctttta tacacacatt caaaagaaag aaaaaaata taccagcc 780
tcgacaagat ggtggcgcct gctttgttac cggagctctg gacggagatc cttgtaccga 840
tttgtgcggt gattggtatc gccttttcgc ttttccaatg gtacgttgta tctcgcgtga 900
aactcacctc tgacctcggc gcatcgtctt cgggtggagc taacaatggg aagaatggat 960
acggtgatta tctaactcag gaagaggaag gtgtaaatga ccagagtgtt gtcgctaagt 1020
gcgctgagat tcagactgct atttccgaag gtgcaacttc attcctattc acggagtaca 1080
aatatgttgg tgtcttcatt atttctttg ctgctggtat ctttgttttc ctcggctctg 1140
ttgagggatt cagcactgat aacaagcctt gtacttacga caccaccaga acctgcaagc 1200
ctgcattggc tactgcagct ttcagtacca ttgctttcgt gcttggtgct gttacctctg 1260
ttctatctgg tttccttggg atgaagattg ctacatacgc taatgctagg accactttgg 1320
aggcgaggaa aggtgttggg aaggcgttca ttgttgatt caggctctgg gctgtgatgg 1380
gtttccttct tgcagcgagt ggtctattgg tgctttacat tactatcaat gtgttcaaga 1440
tctattacgg agatgactgg gaaggtcttt ttgaggctat tactgggtat ggtcttgggtg 1500
ggtcttccat ggctctcttt ggccgtgttg gtgggtggat ctacactaag gctgctgatg 1560
tcggcgctga ccttgtcggg aaaattgaga ggaatattcc agaggatgat ccaagaaacc 1620
cagctgtcat tgctgataat gtcggtgaca atgttgggtga cattgctggt atgggatctg 1680
atctctttgg atcatatgct gaagcatcat gcgctgctct tgttgttgcc tcgatctcat 1740
ctttcggaat caaccacgac ttcactgcca tgtgctacct attgctcatc agttcaatgg 1800
gaatcttggg ttgtttgatc acaactctct ttgccactga cttctttgag attaagcttg 1860
tcaaggagat tgaaccagca ttgaagaacc agctcattat ctcaactggt attatgactg 1920
ttggtattgc tattgtgtca tgggttggct taccgacctc ctttaccatc ttcaactttg 1980
gaacacaaaa agttgtcaag aactggcagc tattcctttg tgtttgtggt ggtctttggg 2040
ctggactcat tattggtttc gtcactgagt actacactag taacgcctac agccctgtgc 2100
aagatgttgc agattcatgc agaactgggtg cagctaccaa tgttatcttc ggccttgctc 2160
ttggttacia atccgtcatt attccaatct ttgctattgc tatcagtata ttcgtagct 2220
tcagctttgc tgctatgat ggtgttgctg ttgctgctct tggtatgctc agtaccattg 2280
ccactggttt ggcaattgat gcttatggtc ccatcagtga caatgctggt ggtattgctg 2340
aatggctgg aatgagccac cgcacccgtg aaagaactga tgctcttgat gccgctggaa 2400
acaccactgc tgctattgga aagggatttg ccattggctc tgctgcccta gtctccttgg 2460
ctctctttgg tgcctttgtg agccgtgcag ggatccacac cgtagatggt ttgacccta 2520
aagttatcat tgggtcctt gttggtgcca tgcttcctta ctggttctct gccatgacaa 2580

ES 2 403 541 A1

tgaagagtgt ggaagtgca gctcttaaga tggttgaaga agttcgcagg cagttcaaca 2640
 ccatccctgg acttatggaa ggaaccgcaa aaccagacta cgccacatgt gtcaagatct 2700
 ccaccgatgc ttccatcaag gaaatgatac ctcttggttg ccttgatcatg ctcacacctc 2760
 tcattggttg tttcttcttt ggagttgaga ccctctctgg tgcctcgcg ggatctcttg 2820
 tatccggtgt tcagatcgcc atatcagcat ctaacactgg tggcgcctgg gacaacgcca 2880
 agaaatacat cgaggctggt gtatcagagc acgcaaagag ccttggaacca aagggttcag 2940
 agccacacaa ggcagctggt attggagaca caattggaga ccattgaag gatacttcag 3000
 gaccttcatt gaacatcctc atcaagctca tggctggtga gtctcttctc tttgctcctc 3060
 tcttcgccac tcacggtggt atccttttca agtacttcta atctagtgcg gccgcctgca 3120
 ggtcgaggac tttttctttc tttttctttc ttggttattt tccattttaa aatatgaaac 3180
 gcacacaagt cataattatt ctaatagagc acaattcaca acacgcacat ttcaacttta 3240
 atattttttt agaaacactt tatttagtct aattcttaat ttttaataata tataatgcac 3300
 acacactaat ttattcatta attttttatt gagtaggatt tgaaaatatt tggatctttt 3360
 gcaagatggt tgtatagagg gacaaagaat cgtctttatt atgggtcaagg ctttacgtca 3420
 taatagttcc tgcccagctc ttctataata ctttaaagat ctcttctcgt ttgctccatt 3480
 tggaaagtctc gcttacgttt atgcgcccac acagacactc aagatacaca cttacatgaa 3540
 cgtatacaaa ttactaaca ctacttgaaa atatgaacca cagtacatca tattaagacg 3600
 tagtattcga tgattgaagg ccgcctccgc gaataccttt actgattttg ccggttaatc 3660
 gcatcgaaat ttcttcgtca caagaaagca aacaaatcgc caggccattc taccagtttc 3720
 cttttcttat gaagatgtaa aagctactaa ccgcacatta ctctagatga ctcagtttag 3780
 tctgaccttc tatactataa ctaccctggc gctatgatga tgagcggttc ttttattgcg 3840
 gaaacgaaaa ttccgggacc ggcgaaattt gcccggtttt gtcgtaaccg gttcatgag 3900
 tcggcttcaa tagtagttga atacttattt aacagcaga acttaactca ctcatcacgc 3960
 tgtttccgct gaattttctc aaaatatcta agcagtcaac aaatataaag aatattgaaa 4020
 tttgacagtt tttgtcgct atcgattttt attatttgct gttttaaatc atggtttaca 4080
 ctccatcaa gggccaaga actcttttacg ataaggtttt tgatgcacat gttgtccatc 4140
 aagatgaaaa tggttccttt ttgttgata tcgacagaca cttggttcat gaagtcacct 4200
 ctccacaagc tt 4212

<210> 2
 <211> 4302
 <212> DNA
 <213> artificial sequences
 <220>
 <221> source
 <222> 1..4302
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Construccion TcAVP1"
 /organism="artificial sequences"
 <220>

ES 2 403 541 A1

```

<221> promoter
<222> 1..782
<223> /note="promotor PMA1"

<220>
<221> misc_feature
<222> 783..788
<223> /note="linker"

<220>
<221> C_region
<222> 789..872
<223> /note="region N-terminal de la H+-PPasa de Trypanosoma cruzi"

<220>
<221> misc_feature
<222> 873..878
<223> /note="linker"

<220>
<221> C_region
<222> 879..3197
<223> /note="secuencia codificante de la H+-PPasa de Arabidopsis thaliana"

<220>
<221> misc_feature
<222> 3198..3214
<223> /note="fragmento de p-GEM-T vector de clonacion de AVP1"

<220>
<221> terminator
<222> 3213..4302
<223> /note="terminador PMA1"

<400> 2
gaattcaagc ttcctgaaac ggagaaacat aaacaggcat tgctgggatc acccatacat      60
cactctgttt tgctgacct tttccgtaa tttgaaaaca aaccgggtct cgaagcggag      120
atccggcgat aattaccgca gaaataaacc catacacgag acgtagaacc agccgcacat      180
ggccggagaa actcctgcga gaatttcgta aactcgcgcg cattgcatct gtatttccta      240
atgcggcact tccaggctc gatcgagacc gtttatccat tgcttttttg ttgtcttttt      300
ccctcgttca cagaaagtct gaagaagcta tagtagaact atgagctttt tttgtttctg      360
ttttcctttt tttttttttt acctctgtgg aaattgttac tctcacactc tttagttcgt      420
ttgtttgttt tgtttattcc aattatgacc ggtgacgaaa cgtggtcgat ggtgggtacc      480
gcttatgctc ccctccatta gtttcgatta tataaaaagg ccaaatttg tattattttc      540
aatgtccta tcattatcgt ctaacatcta atttctctta aattttttct ctttcttttc      600
tataacacca atagtgaaaa tctttttttc ttctatatct acaaaaactt tttttttcta      660
tcaacctcgt tgataaattt tttctttaac aatcgttaat aattaattaa ttggaaaata      720
accatthttt ctctctttta tacacacatt caaaagaaag aaaaaaata taccagcc      780
tcgacattat gggtgacatg aagaggttca tcgtggcggg cgcggcggtg tgtttactcg      840
cagccaccgt gtcggccgca ccggcggggg tcgacaagat ggtggcgcct gctttgttac      900
cggagctctg gacggagatc cttgtaccga tttgtgcggt gattggatc gccttttcgc      960
ttttcaatg gtacgttgta tctcgcgtga aactcacctc tgacctcggc gcatcgtctt     1020

```

ES 2 403 541 A1

ccggtggagc taacaatggg aagaatggat acggtgatta tctaatacgag gaagaggaag 1080
 gtgttaatga ccagagtgtt gtcgctaagt gcgctgagat tcagactgct atttccgaag 1140
 gtgcaacttc attcctattc acggagtaca aatatgttgg tgccttcatg attttctttg 1200
 ctgctgttat ctttgttttc ctcggctctg ttgagggatt cagcactgat aacaagcctt 1260
 gtacttacga caccaccaga acctgcaagc ctgcattggc tactgcagct ttcagtacca 1320
 ttgctttcgt gcttgggtgct gttacctctg ttctatctgg tttccttggg atgaagattg 1380
 ctacatacgc taatgctagg accactttgg aggcgaggaa aggtgttggg aaggcgttca 1440
 ttgttgcaatt caggtctggg gctgtgatgg gtttccttct tgcaagcagat ggtctattgg 1500
 tgctttacat tactatcaat gtgttcaaga tctattacgg agatgactgg gaaggtcttt 1560
 ttgaggctat tactggttat ggtcttggg ggtcttccat ggctctcttt ggccgtgttg 1620
 gtgggtgggat ctacactaag gctgctgatg tcggcgctga ccttgtcggg aaaattgaga 1680
 ggaatattcc agaggatgat ccaagaaacc cagctgtcat tgctgataat gtcggtgaca 1740
 atgttgggtga cattgctggg atgggatctg atctctttgg atcatatgct gaagcatcat 1800
 gcgctgctct tgttgttgcc tcgatctcat ctttcggaat caaccacgac ttcactgcca 1860
 tgtgctaccc attgctcatc agttcaatgg gaatcttggg ttgtttgatc acaactctct 1920
 ttgccactga cttctttgag attaagcttg tcaaggagat tgaaccagca ttgaagaacc 1980
 agctcattat ctcaactggt attatgactg ttggtattgc tatttgtca tgggttggtc 2040
 taccgacctc ctttaccatc ttcaactttg gaacacaaaa agttgtcaag aactggcagc 2100
 tattcctttg tgtttgtgtt ggtctttggg ctggactcat tatttggttc gtcactgagt 2160
 actacactag taacgcctac agccctgtgc aagatgttgc agattcatgc agaactggtg 2220
 cagctaccaa tgttatcttc ggccttgctc ttggttacia atccgtcatt attccaatct 2280
 ttgctattgc tatcagtata ttcgtagct tcagctttgc tgctatgtat ggtgttgctg 2340
 ttgctgctct tggatgctc agtaccattg cactgggtt ggcaattgat gcttatggtc 2400
 ccatcagtga caatgctggg ggtattgctg aatggctgg aatgagccac cgcacccgtg 2460
 aaagaactga tgctcttgat gccgctggaa acaccactgc tgctattgga aagggtttg 2520
 ccattggctc tgctgcccta gtctccttgg ctctctttgg tgcttttgag agccgtgcag 2580
 ggatccacac cgtagatggt ttgacccta aagttatcat tgggctcctt gttggtgcca 2640
 tgcttcctta ctggttctct gccatgacia tgaagagtgt ggggaagtga gctcttaaga 2700
 tggttgaaga agttcgcagg cagttcaaca ccatccctgg acttatggaa ggaaccgcaa 2760
 aaccagacta cgccacatgt gtcaagatct ccaccgatgc ttccatcaag gaaatgatac 2820
 ctctgggttg cttgtcatg ctcacacctc tcattgttgg tttcttcttt ggagttgaga 2880
 ccctctctgg tgcctcgcg gccatctctt tatccggtgt tcagatcgcc atatcagcat 2940
 ctaacactgg tgggtgcctgg gacaacgcca agaaatacat cgaggctggg gtatcagagc 3000
 acgcaaagag ctttgacca aagggttcag agccacacia ggcagctgtg attggagaca 3060
 caattggaga cccattgaag gatacttcag gaccttcat gaacatcctc atcaagctca 3120

ES 2 403 541 A1

tggctgttga gtctcttgc tttgctccct tcttcgccac tcacggtggt atccttttca 3180
 agtacttcta atctagtgcg gccgcctgca ggtcgaggac tttttctttc tttttctttc 3240
 ttggttatth tccattthaa aatatgaaac gcacacaagt cataattatt ctaatagagc 3300
 acaattcaca acacgcacat ttcaacttta atatthttttt agaaacactt tathttagtct 3360
 aattcttaat thtttaataa tataatgcac acacactaat ttattcatta atthttttatt 3420
 gagtaggatt tgaaaatatt tggatcttt gcaagatggt tgtatagagg gacaaagaat 3480
 cgtctthtatt atggatcaagg ctttacgtca taatagttcc tgcccagctc ttctataata 3540
 cthtaagat ctcttctcgt ttgctccatt tggaagtctc gcttacgtht atgctcccat 3600
 acagacactc aagatacaca cttacatgaa cgtatacaaa thtactaaca ctacttgaaa 3660
 atatgaacca cagtacatca tattaagacg tagtattcga tgattgaagg ccgcctccgc 3720
 gaatacctth actgathttg ccggttaatc gcatcgaaat thcttcgtca caagaaagca 3780
 aacaaatcgc caggccattc taccagthtc cthttcttat gaagatgtaa aagctactaa 3840
 ccgcacatta ctctagatga ctcagthtag tctgacctc tatactataa ctaccctggc 3900
 gctatgatga tgagcggthc thttattgct gaaacgaaaa thccgggacc ggcgaaatth 3960
 gcccgthttt gtcgtaaccg gcttcatgag tctgcttcaa tagtagthga atactthtth 4020
 aaacagcaga acttaactca ctcatcacgc tgthtccgct gaathttctc aaaatatcta 4080
 agcagthcaac aatataaag aatathgaaa thtgacagth thttgctcgt atcgaththt 4140
 aththttgct gththaaat atgthttaca ctccatccaa gggthcaaga actctthtacg 4200
 ataagthttt tgatgcacat gthgtccatc aagatgaaaa tggthcctth thgthgtata 4260
 tcgacagaca cthgthtcat gaagthcacct ctccacaagc th 4302

<210> 3
 <211> 5019
 <212> DNA
 <213> artificial sequences

<220>
 <221> source
 <222> 1..5019
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Construccion TCGFPAVP1"
 /organism="artificial sequences"

<220>
 <221> promoter
 <222> 1..782
 <223> /note="promotor PMA1"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 783..788
 <223> /note="linker"

<220>
 <221> C_region
 <222> 789..872
 <223> /note="N-terminal de la H+-PPasa de Trypanosoma cruzi"

<220>
 <221> C_region

ES 2 403 541 A1

```

<222> 873..1589
<223> /note="secuencia codificante de GFP de Aquarea victoria"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1590..1595
<223> /note="linker"

<220>
<221> C_region
<222> 1596..3914
<223> /note="secuencia codificante de H+-PPasa de Arabidopsis thaliana"

<220>
<221> misc_feature
<222> 3915..3931
<223> /note="fragmento del plásmido p-GEM-T empleado como vector de clonación de AVP1"

<220>
<221> terminator
<222> 3932..5019
<223> /note="terminador PMA1"

<400> 3
gaattcaagc ttctgaaac ggagaaacat aaacaggcat tgctgggatc acccatacat      60
cactctgttt tgcctgacct tttccggtaa ttgaaaaca aaccgggtct cgaagcggag      120
atccggcgat aattaccgca gaaataaacc catacacgag acgtagaacc agccgcacat      180
ggccggagaa actcctgcga gaatttcgta aactcgcgcg cattgcatct gtatttccta      240
atgcggcact tccaggcctc gatcgagacc gtttatccat tgcttttttg ttgtcttttt      300
ccctcgttca cagaaagtct gaagaagcta tagtagaact atgagctttt tttgtttctg      360
ttttcctttt tttttttttt acctctgtgg aaattgttac tctcacactc tttagttcgt      420
ttgtttgttt tgtttattcc aattatgacc ggtgacgaaa cgtggtcgat ggtgggtacc      480
gcttatgctc ccctccatta gtttcgatta tataaaaagg ccaaatattg tattattttc      540
aaatgtccta tcattatcgt ctaacatcta atttctctta aattttttct ctttctttcc      600
tataacacca atagtgaaaa tctttttttc ttctatatct acaaaaactt tttttttcta      660
tcaacctcgt tgataaattt tttctttaac aatcgttaat aattaattaa ttggaaaata      720
accatttttt ctctctttta tacacacatt caaaagaaag aaaaaaata taccagcc      780
tcgacattat gggtgacatg aagaggttca tcgtggcggg cgcggcgggtg tgtttactcg      840
cagccaccgt gtcggccgca ccggcggggg tcatgtctaa aggtgaagaa ttattcactg      900
gtgttggtccc aattttgggt gaattagatg gtgatgtaa tggtcacaaa ttttctgtct      960
ccggtgaagg tgaaggatg gctacttacg gtaaattgac cttaaaattt atttgtacta     1020
ctggtaaatt gccagttcca tggccaacct tagtcactac tttcggttat ggtgttcaat     1080
gttttgctag ataccagat catatgaaac aacatgactt tttcaagtct gccatgccag     1140
aaggttatgt tcaagaaaga actatttttt tcaaagatga cggtaactac aagaccagag     1200
ctgaagtcaa gtttgaaggt gataccttag ttaatagaat cgaattaaaa ggtattgatt     1260
ttaaagaaga tggtaacatt ttaggtcaca aattggaata caactataac tctcacaatg     1320
tttacatcat ggctgacaaa caaagaatg gtatcaaagt taacttcaaa attagacaca     1380

```

ES 2 403 541 A1

acattgaaga tggttctggt caattagctg accattatca acaaaatact ccaattggtg 1440
 atggtccagt cttgttacca gacaaccatt acttatccac tcaatctgcc ttatccaaag 1500
 atccaaacga aaagagagac cacatggtct tgttagaatt tgttactgct gctggtatta 1560
 cccatggtat ggatgaattg tacaaactcg acaagatggt ggcgcctgct ttgttaccgg 1620
 agctctggac ggagatcctt gtaccgattt gtgcggtgat tggatcgc ttttcgcttt 1680
 tccaatggta cgttgatctt cgcgtgaaac tcacctctga cctcggcgca tcgtcttccg 1740
 gtggagctaa caatgggaag aatggatacg gtgattatct aatcgaggaa gaggaaggtg 1800
 ttaatgacca gagtgttgc gctaagtgcg ctgagattca gactgctatt tccgaaggtg 1860
 caacttcatt cctattcacg gagtacaaat atgttgggtg cttcatgatt ttctttgctg 1920
 ctgttatctt tgttttcctc ggctctggtg agggattcag cactgataac aagccttgta 1980
 cttacgacac caccagaacc tgcaagcctg cattggctac tgcagctttc agtaccattg 2040
 ctttcgtgct tgggtgctgt acctctgttc tatctggttt ccttgggatg aagattgcta 2100
 catacgctaa tgctaggacc actttggagg cgaggaaagg tgttgaaag gcgttcattg 2160
 ttgcattcag gtctggtgct gtgatgggtt tccttcttgc agcgagtggg ctattggtgc 2220
 ttacattac tatcaatgtg ttcaagatct attacggaga tgactgggaa ggtctttttg 2280
 aggctattac tggttatggt cttggtgggt cttccatggc tctctttggc cgtgttgggtg 2340
 gtgggatcta cactaaggct gctgatgctg gcgctgacct tgcggtaaa attgagagga 2400
 atattccaga ggatgatcca agaaaccag ctgtcattgc tgataatgtc ggtgacaatg 2460
 ttggtgacat tgctggtatg ggatctgatc tctttggatc atatgctgaa gcatcatgcg 2520
 ctgctcttgt tgttgctcg atctcatctt tcggaatcaa ccacgacttc actgccatgt 2580
 gctaccatt gctcatcagt tcaatgggaa tcttggttt tttgatcaca actctctttg 2640
 ccactgactt ctttgagatt aagcttgtca aggagattga accagcattg aagaaccagc 2700
 tcattatctc aactgttatt atgactgttg gtattgctat tgtgtcatgg gttggcttac 2760
 cgacctcctt taccatctc aactttggaa cacaaaaagt tgtcaagaac tggcagctat 2820
 tcctttgtgt ttgtgttgg ctttgggctg gactcattat tggtttcgct actgagtact 2880
 aactagtaa cgcctacagc cctgtgcaag atgttgcaga ttcattgcaga actggtgcag 2940
 ctaccaatgt tatcttcggc cttgctcttg gttacaaatc cgtcattatt ccaatctttg 3000
 ctattgctat cagtatattc gttagcttca gctttgctgc tatgtatggt gttgctggtg 3060
 ctgctcttgg tatgctcagt accattgcca ctggtttggc aattgatgct tatggtccca 3120
 tcagtgacaa tgctggtggt attgctgaaa tggctggaat gagccaccgc atccgtgaaa 3180
 gaactgatgc tcttgatgcc gctggaaaca ccactgctgc tattggaaag ggatttgcca 3240
 ttggctctgc tgccctagtc tccttggtc tctttggtgc ctttgtgagc cgtgcagga 3300
 tccacaccgt agatgttttg acccctaaag ttatcattgg gtccttgtt ggtgccatgc 3360
 ttccttactg gttctctgcc atgacaatga agagtgtggg aagtgcagct cttaatgatg 3420
 ttgaagaagt tcgcaggcag ttcaacacca tccctggact tatggaagga accgcaaac 3480

ES 2 403 541 A1

cagactacgc cacatgtgtc aagatctcca ccgatgcttc catcaaggaa atgatacctc 3540
ctggttgcct tgtcatgtc acacctctca ttgttggttt cttctttgga gttgagaccc 3600
tctctggtgt cctcgccgga tctcttgat ccggtgttca gatcgccata tcagcatcta 3660
aactggtg tgctgggac aacgccaaga aatacatcga ggctggtgta tcagagcacg 3720
caaagagcct tggaccaaag ggttcagagc cacacaaggc agctgtgatt ggagacacaa 3780
ttggagaccc attgaaggat acttcaggac cttcattgaa catcctcatc aagctcatgg 3840
ctggtgagtc tcttgtcttt gctcccttct tcgccactca cggtggtatc cttttcaagt 3900
acttctaadc tagtgccggc gcctgcaggc cgaggacttt ttctttcttt ttctttcttg 3960
gttttttcc attttaaaat atgaaacgca cacaagtcac aattattcta atagagcaca 4020
attcacaaca cgcacatttc aactttaata tttttttaga aacactttat ttagtctaata 4080
tcttaatttt taatatatat aatgcacaca cactaattta ttcattaatt ttttattgag 4140
taggatttga aatattttgg tatctttgca agatgtttgt atagagggac aaagaatcgt 4200
ctttattatg gtcaaggctt tacgtcataa tagttcctgc ccagctcttc tataataactt 4260
taaagatctc ttctcgtttg ctccatttgg aagtctcgtc tacgtttatg cgccataca 4320
gacactcaag atacacactt acatgaacgt atacaaattt actaacacta cttgaaaata 4380
tgaaccacag tacatcatat taagacgtag tattcgatga ttgaaggccg cctccgcaa 4440
tacctttact gattttgccg gttaatcgca tcgaaatttc ttcgtcacia gaaagcaaac 4500
aaatcgccag gccattctac cagtttcctt ttcttatgaa gatgtaaaag ctactaacccg 4560
cacattactc tagatgactc agtttagtct gaccttctat actataacta ccctggcgct 4620
atgatgatga gcggttcttt tattgaggaa acgaaaattc cgggaccggc gaaatttgcc 4680
cggttttgtc gtaaccggct tcatgagtcg gcttcaatag tagttgaata cttattttaa 4740
cagcagaact taactcactc atcacgctgt ttccgctgaa ttttctcaaa atatctaagc 4800
agtcaacaaa tataaagaat attgaaattt gacagttttt tgctcgctatc gatttttatt 4860
atgtgctggt ttaaatcatg gtttactc catccaaggg tccaagaact ctttacgata 4920
aggtttttga tgcacatggt gtccatcaag atgaaaatgg ttcctttttg ttgtatatcg 4980
acagacactt gtttcatgaa gtcacctctc cacaagctt 5019

<210> 4
<211> 3082
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..3082
<223> /mol_type="DNA"
/note="Inactivacion permanente del gen IPP1"
/organism="artificial sequences"

<220>
<221> promoter
<222> 1..368
<223> /note="promotor del gen IPP1 del cromosoma II de Saccharomyces ce

ES 2 403 541 A1

revisiae"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 369..403
 <223> /note="fragmento del plasmido pBluescript"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 404..2176
 <223> /note="Cassette de expresion HIS3"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2177..2217
 <223> /note="fragmento del plasmido pBluescript"

<220>
 <221> C_region
 <222> 2218..3082
 <223> /note="secuencia codificante del gen IPP1 del cromosoma II de Sac charomyces cerevisiae"

<400> 4
 ggataatatc atgatttagc cgccgaattt tatgtaacta aaaggttctt gggggacttt 60
 gaagcccagg tagaagtgtt tcattcacag aaggagatgc caatgtgcta ttattatccc 120
 tgtgtggcgc actattcaaa cggatttgac tgtcctgcaa aatatcgtca tcgcagacgc 180
 taaggttggt gggagaagcc acagtcatta ggtacgatag tctcatgatg actttttctc 240
 gttttttttc gacgttttaa ggtcgcgctc aagttaggaa ggttagtcca tttacaactt 300
 gtttttgaat acttactttc ttaatcatct attttgattt gttgtccctt aggtctatag 360
 aacaggatag ctccaccgcg gtggcggccg ctctagaact agtggatccg ctgcacggtc 420
 ctgttcccta gcatgtacgt gagcgtattt ctttttaaac cacgacgctt tgtcttcatt 480
 caacgtttcc cattgttttt ttctactatt gctttgctgt gggaaaaact tatcgaaga 540
 tgacgacttt ttcttaattc tcgttttaag agcttggtga gcgctaggag tctactgccag 600
 gtatcgtttg aacacggcat tagtcaggga agtcataaca cagtcctttc ccgcaatttt 660
 ctttttctat tactcttggc ctctctagt acactctata tttttttatg cctcggtaat 720
 gattttcatt ttttttttc cacctagcgg atgactcttt ttttttcta gcgattggca 780
 ttatcacata atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta 840
 aaaaatgagc aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag 900
 cgtattacaa atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg 960
 atagagcact cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa 1020
 tcgcaagtga ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg 1080
 gccaagcatt ccggctggtc gctaatacgtt gagtgcattg gtgacttaca catagacgac 1140
 catcacacca ctgaagactg cgggattgct ctcggccaag cttttaaaga ggccctaggg 1200
 gccgtgcgtg gagtaaaaag gtttggatca ggatttgctc ctttggatga ggcactttcc 1260
 agagcgggtg tagatctttc gaacaggccg tacgcagttg tcgaacttgg tttgcaaagg 1320
 gagaaagtag gagatctctc ttgcgagatg atccccgatt ttcttgaaag ctttgcagag 1380

ES 2 403 541 A1

gctagcagaa ttaccctcca cgttgattgt ctgcgaggca agaatgatca tcaccgtagt 1440
gagagtgcgt tcaaggctct tgcggttgcc ataagagaag ccacctgcc caatggtacc 1500
aacgatgttc cctccaccaa aggtgttctt atgtagtgac accgattatt taaagctgca 1560
gcatacgata tatatacatg tgtatataat tatacctatg aatgtcagta agtatgtata 1620
cgaacagtat gatactgaag atgacaaggt aatgcatcat tctatacgtg tcattctgaa 1680
cgaggcgcgc tttccttttt tctttttgct ttttcttttt ttttctcttg aactcgagaa 1740
aaaaaatata aaagagatgg aggaacggga aaaagttagt tgtggtgata ggtggcaagt 1800
ggtattccgt aagaacaaca agaaaagcat ttcatattat ggctgaactg agcgaacaag 1860
tgcaaaatth aagcatcaac gacaacaacg agaatggtta tgttcctcct cacttaagag 1920
gaaaaccaag aagtgccaga aataacagta gcaactacaa taacaacaac ggcggctaca 1980
acggtggccg tggcgggtggc agcttcttta gcaacaaccg tcgtggtggt tacggcaacg 2040
gtggtttctt cgggtgaaac aacggtggca gcagatctaa cggccgttct ggtggttagat 2100
ggatcgatgg caaacatgct ccagctcaa gaaacgaaaa ggccgagatc gccatatttg 2160
gtgtccccga ggatccccg ggctgcagga attcgatata ccgccgcgca atttactaat 2220
gacctacact accagacaaa ttggtgcaa gaacaccttg gaatacaaaag tttatatcga 2280
gaaggatggt aagccagttt ctgccttcca cgacattccc ttgtacgctg acaaggaaaa 2340
caacattttc aacatggttg ttgaaattcc acgttgacc aacgccaagt tagaaatcac 2400
caaggaagaa actttgaacc caatcatcca agacaccaag aagggcaagt tgagatttgt 2460
tagaaactgt ttccctcacc atggttacat tcacaactat ggtgctttcc cacaaacttg 2520
ggaagacca aacgtaagcc accagaaac taaggcagtt ggtgacaacg atccaattga 2580
tgtgttgaa attggtgaaa ctattgctta cactggtaaa gtcaagcagg ttaaggctct 2640
aggtatcatg gctttattgg atgaaggta gaccgattgg aaagttattg ccattgatata 2700
taacgatcca ttagcccaa aattgaacga cattgaagat gttgagaaat acttcccagg 2760
tctattgagg gctactaacg aatggttcag aatttcaaaa atcccagatg gtaagccaga 2820
aaaccaatth gccttctccg gtgaagctaa gaacaagaag tacgctttgg atatcatcaa 2880
ggaacacat gactcctgga aacaattaat tgctggtgaa tcttctgaca gcaagggtat 2940
tgatttgacc aatggtactt tgctgacac cccaacctac tccaaggctg cctctgatgc 3000
catcccacca gcttctctaa aggcagatgc tccaattgac aagtctattg acaagtgggt 3060
cttcatctcc ggttctgtht aa 3082

<210> 5
<211> 3862
<212> DNA
<213> artificial sequences
<220>
<221> source
<222> 1..3862
<223> /mol_type="DNA"
/note="inactivacion condicional del gen IPP1"
/organism="artificial sequences"

ES 2 403 541 A1

```

<220>
<221> promoter
<222> 1..368
<223> /note="promotor del gen IPP1 del cromosoma II de Saccharomyces ce
      revisiae"

<220>
<221> misc_feature
<222> 369..403
<223> /note="fragmento del plasmido pBluescript"

<220>
<221> misc_feature
<222> 404..2176
<223> /note="casete de expresion del gen HIS3"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2177..2188
<223> /note="fragmento del plasmido pBluescript"

<220>
<221> promoter
<222> 2189..2996
<223> /note="promotor del gen GAL1"

<220>
<221> C_region
<222> 2997..3862
<223> /note="secuencia codificante del gen IPP1 del cromosoma II de Sac
      charomyces cerevisiae"

<400> 5
ggataatatc atgatttagc cgccgaattt tatgtaacta aaaggttcctt gggggacttt      60
gaagcccagg tagaagtgtt tcattcacag aaggagatgc caatgtgcta ttattatccc      120
tgtgtggcgc actattcaaa cggatttgac tgtcctgcaa aatatcgtca tcgcagacgc      180
taaggttggtt gggagaagcc acagtcatta ggtacgatag tctcatgatg actttttctc      240
gttttttttc gacgttttaa ggtcgcgctc aagttaggaa ggttagtcca ttacaactt      300
gtttttgaat acttactttc ttaatcatct attttgattt gttgtccctt aggtctatag      360
aacaggatag ctccaccgcg gtggcggccg ctctagaact agtggatccg ctgcacggtc      420
ctgttccta gcatgtacgt gagcgtatct ctttttaaac cacgacgctt tgtcttcatt      480
caacgtttcc cattgttttt ttctactatt gctttgctgt gggaaaaact tatcгааага      540
tgacgacttt ttcttaattc tcgttttaag agcttggatga gcgctaggag tcaactgccag      600
gtatcgtttg aacacggcat tagtcaggga agtcataaca cagtcctttc ccgcaatttt      660
ctttttctat tactcttggc ctctctagt acactctata tttttttatg cctcggtaat      720
gattttcatt ttttttttc cacctagcgg atgactcttt ttttttctta gcgattggca      780
ttatcacata atgaattata cattatataa agtaatgtga tttcttcgaa gaatatacta      840
aaaaatgagc aggcaagata aacgaaggca aagatgacag agcagaaagc cctagtaaag      900
cgtattacaa atgaaaccaa gattcagatt gcgatctctt taaaggggtg tcccctagcg      960
atagagcact cgatcttccc agaaaaagag gcagaagcag tagcagaaca ggccacacaa     1020
tcgcaagtga ttaacgtcca cacaggtata gggtttctgg accatatgat acatgctctg     1080

```

ES 2 403 541 A1

gccaaagcatt cgggctggtc gctaatecgtt gaggcattg gtgacttaca catagacgac 1140
 catcacacca ctgaagactg cgggattgct ctcggctcaag cttttaaaga ggccctaggg 1200
 gccgtgcgtg gagtaaaaag gtttggatca ggatttgccg ctttggatga ggcactttcc 1260
 agagcgggtg tagatctttc gaacaggccg tacgcagttg tcgaacttgg tttgcaaagg 1320
 gagaaagtag gagatctctc ttgcgagatg atcccgcatt ttcttgaaag ctttgcagag 1380
 gctagcagaa ttaccctcca cgttgattgt ctgcgaggca agaattgatca tcaccgtagt 1440
 gagagtgcgt tcaaggctct tgcggttgcc ataagagaag ccacctgcc caatggtacc 1500
 aacgatgttc cctccaccaa aggtgttctt atgtagtgac accgattatt taaagctgca 1560
 gcatacgata tatatacatg tgtatataat tatacctatg aatgtcagta agtatgtata 1620
 cgaacagtat gatactgaag atgacaaggt aatgcatcat tctatacgtg tcattctgaa 1680
 cgaggcgcgc tttccttttt tctttttgct ttttcttttt ttttctcttg aactcgagaa 1740
 aaaaaatata aaagagatgg aggaacggga aaaagttagt tgtggtgata ggtggcaagt 1800
 ggtattccgt aagaacaaca agaaaagcat ttcatattat ggctgaactg agcgaacaag 1860
 tgcaaaaattt aagcatcaac gacaacaacg agaattggtt tgttcctcct cacttaagag 1920
 gaaaaccaag aagtgccaga aataacagta gcaactacaa taacaacaac ggcggctaca 1980
 acggtggccg tggcgggtggc agcttcttta gcaacaaccg tcgtggtggt tacggcaacg 2040
 gtggtttctt cgggtgaaac aacgggtggca gcagatctaa cggccgttct ggtggttagat 2100
 ggatcgatgg caaacatgct ccagctcaa gaaacgaaaa ggccgagatc gccatatttg 2160
 gtgtccccga ggatcccccg ggctgcagga attcgacagg ttatcagcaa caacacagtc 2220
 atatccattc tcaattagct ctaccacagt gtgtgaacca atgtatccag caccacctgt 2280
 aacaaaaaca attttagaag tactttcact ttgtaactga gctgtcattt atattgaatt 2340
 ttcaaaaatt ctactttttt ttttggatgg acgcaaagaa gtttaataat catattacat 2400
 ggcattacca ccatatacat atccatatct aatcttactt atatgttggtg gaaatgtaaa 2460
 gagccccatt atcttagcct aaaaaaacct tctctttgga actttcagta atacgcttaa 2520
 ctgctcattg ctatattgaa gtacggatta gaagccgccg agcggggcgac agccctccga 2580
 cggaaagactc tcctccgtgc gtccctcgtc tcaccggctg cgttcctgaa acgcagatgt 2640
 gcctcgcgcc gcaactgctc gaacaataaa gattctacaa tactagcttt tatggttatg 2700
 aagaggaaaa attggcagta acctggcccc acaaaccttc aaattaacga atcaaatata 2760
 caacataggt atgataatgc gattagtttt ttagccttat ttctggggta attaatacgc 2820
 gaagcgatga tttttgatct attaacagat atataaatgg aaaagctgca taaccacttt 2880
 aactaatact ttcaacattt tcagtttgta ttacttctta ttcaaattgc ataaaagtat 2940
 caacaaaaaa ttgttaatat acctctatac tttaacgtca aggagaaaaa actatactat 3000
 gacctacact accagacaaa ttggtgcca gaacaccttg gaatacaaaag tttatatcga 3060
 gaaggatggt aagccagttt ctgccttcca cgacattccc ttgtacgctg acaaggaaaa 3120
 caacattttc aacatggttg ttgaaattcc acgttgacc aacgccaagt tagaaatcac 3180

ES 2 403 541 A1

caaggaagaa actttgaacc caatcatcca agacaccaag aagggcaagt tgagatttgt 3240
tagaaactgt ttccctcacc atggttacat tcacaactat ggtgctttcc cacaaacttg 3300
ggaagacca aacgtaagcc acccagaaac taaggcagtt ggtgacaacg atccaattga 3360
tgtgttgaa attggtgaaa ctattgctta cactgggtcaa gtcaagcagg ttaaggctct 3420
aggtatcatg gctttattgg atgaagggtga gaccgattgg aaagttattg ccattgatat 3480
taacgatcca ttagcccca aattgaacga cattgaagat gttgagaaat acttcccagg 3540
tctattgagg gctactaacg aatggttcag aatttacaaa atcccagatg gtaagccaga 3600
aaaccaattt gccttctccg gtgaagctaa gaacaagaag tacgctttgg atatcatcaa 3660
ggaacacat gactcctgga aacaattaat tgctggtaag tcttctgaca gcaagggtat 3720
tgatttgacc aatgttactt tgctgacac cccaacctac tccaaggctg cctctgatgc 3780
catcccacca gcttctctaa aggcagatgc tccaattgac aagtctattg acaagtggtt 3840
cttcatctcc ggttctgttt aa 3862

<210> 6
<211> 1316
<212> mRNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..1316
<223> /mol_type="mRNA"
/organism="Homo sapiens"

<400> 6
ccggtccagt gctcgcagtg cgcaggcgtg gggctctctc cttgtcagtc ggcgccgcgt 60
gcgggctggt ggctctgtgg cagcggcggc ggcaggactc cggcactatg agcggcttca 120
gcaccgagga gcgcgccgcg cccttctccc tggagtaccg agtcttcctc aaaaatgaga 180
aaggacaata tatacttcca tttcatgata ttccaattta tgcagataag gatgtgtttc 240
acatggtagt tgaagtacca cgctgggtcta atgcaaaaat ggagattgct acaaaggacc 300
ctttaaacc tattaaaca gatgtgaaaa aaggaaaact tcgctatggt gcgaatttgt 360
tcccgtataa aggatatac tggaaactat gtgccatccc tcagacttgg gaagaccag 420
ggcacaatga taaacatact ggctgttggt gtgacaatga cccaattgat gtgtgtgaaa 480
ttggaagcaa ggtatgtgca agagggtgaaa taattggcgt gaaagttcta ggcatattgg 540
ctatgattga cgaaggggaa accgactgga aagtcattgc cattaatgtg gatgatcctg 600
atgcagccaa ttataatgat atcaatgatg tcaaacggct gaaacctggc tacttagaag 660
ctactgtgga ctggtttaga aggtataagg ttctctgatgg aaaaccagaa aatgagtttg 720
cgtttaatgc agaatttaaa gataaggact ttgccattga tattattaaa agcactcatg 780
accattgaa agcattagt actaagaaaa cgaatggaaa aggaatcagt tgcataaata 840
caactttgtc tgagagcccc ttcaagtgtg atcctgatgc tgccagagcc attgtggatg 900
ctttaccacc accctgtgaa tctgcctgca cagtaccaac agacgtggat aagtggttcc 960
atcaccagaa aaactaatga gatttctctg gaatacaagc tgatattgct acatcgtggt 1020

ES 2 403 541 A1

catctggatg tattagaagt aaaagtagta gcttttcaaa gctttaaatt tgtagaactc 1080
atctaactaa agtaaattct gctgtgacta atccaatata ctcagaatgt tatccatcta 1140
aagcattttt catatctcaa ctaagataac ttttagcaca tgcttaaata tcaaagcagt 1200
tgtcatttgg aagtcacttg tgaatagatg tgcaagggga gcacatattg gatgtatatg 1260
ttaccatatg ttaggaaata aaattatfff gctgaaactt ggaaaaaaaa aaaaaa 1316

<210> 7
<211> 2318
<212> mRNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> source
<222> 1..2318
<223> /mol_type="mRNA"
/note="ARNm del gen AVP1 que codifica para la H+-PPasa vacuolar "
/organism="Arabidopsis thaliana"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2313
<223> /note="ORF 2313"

<400> 7
atggtggcgc ctgctttggt accggagctc tggacggaga tccttgtacc gatttgtgcg 60
gtgattgga tcgccttttc gcttttccaa tggtagcttg tatctcgcgt gaaactcacc 120
tctgacctg gcgcatcgtc ttccgggtga gctaacaatg ggaagaatgg atacggtgat 180
tatctaactg aggaagagga aggtgtaat gaccagagtg ttgtcgctaa gtgctgctgag 240
attcagactg ctatttccga aggtgcaact tcattcctat tcacggagta caaatatggt 300
ggtgtcttca tgattttctt tgctgctggt atctttggtt tcctcggctc tgttgaggga 360
ttcagactg ataacaagcc ttgtacttac gacaccacca gaacctgcaa gcctgcattg 420
gctactgcag ctttcagtac cattgctttc gtgcttgggt ctgttacctc tgttctatct 480
ggtttccttg ggatgaagat tgctacatac gctaattgcta ggaccacttt ggaggcgagg 540
aaagggtgtg gaaaggcgtt cattgttgca ttcagggtctg gtgctgtgat gggtttcctt 600
cttgacgca gtggtctatt ggtgctttac attactatca atgtgttcaa gatctattac 660
ggagatgact gggaaggtct ttttgaggct attactggtt atggtcttgg tgggtcttcc 720
atggctctct ttggccgtgt tgggtggtgg atctacacta aggctgctga tgtcggcgct 780
gaccttctg gtaaaattga gaggaatatt ccagaggatg atccaagaaa cccagctgtc 840
attgctgata atgtcggatg caatgttggg gacattgctg gtatgggatc tgatctcttt 900
ggatcatatg ctgaagcatc atgcgctgct cttgttgggt cctcgatctc atctttcgga 960
atcaaccacg acttcaactg catgtgctac ccattgctca tcagttcaat gggaatcttg 1020
gtttgtttga tcacaactct ctttgccact gacttctttg agattaagct tgtcaaggag 1080
attgaaccag cattgaagaa ccagctcatt atctcaactg ttattatgac tgttggatt 1140
gctattgtgt catgggttgg cttaccgacc tcctttacca tcttcaactt tggaaacaaa 1200

ES 2 403 541 A1

```

aaagttgtca agaactggca gctattcctt tgtgtttgtg ttggctcttg ggctggactc 1260
attattgggt tcgtcactga gtactacact agtaacgcct acagccctgt gcaagatggt 1320
gcagattcat gcagaactgg tgcagctacc aatggtatct tcggccttgc tcttggttac 1380
aaatccgtca ttattccaat ctttgctatt gctatcagta tttcgttag cttcagcttt 1440
gctgctatgt atgggtgtgc tgttgctgct cttggtatgc tcagtacat tgccactggg 1500
ttggcaattg atgcttatgg tcccatcagt gacaatgctg gtggtattgc tgaaatggct 1560
ggaatgagcc accgcatccg tgaaagaact gatgctcttg atgccgctgg aaacaccact 1620
gctgctattg gaaagggatt tgccattggc tctgctgccc tagtctcctt ggctctcttt 1680
ggtgcctttg tgagccgtgc agggatccac accgtagatg ttttgacccc taaagttatc 1740
attgggctcc ttgttggtgc catgcttcct tactggttct ctgccatgac aatgaagagt 1800
gtgggaagtg cagctcttaa gatggttgaa gaagttcgca ggcagttcaa caccatccct 1860
ggacttatgg aaggaaccgc aaaaccagac tacgccacat gtgtcaagat ctccaccgat 1920
gcttccatca aggaaatgat acctcctggg tgccttgca tgctcacacc tctcattggt 1980
ggtttcttct ttggagttga gaccctctct ggtgtcctcg ccggatctct tgtatccggt 2040
gttcagatcg ccatatcagc atctaact ggtgggtgct gggacaacgc caagaaatac 2100
atcgaggctg gtgtatcaga gcacgcaaag agccttgac caaagggttc agagccacac 2160
aaggcagctg tgattggaga cacaattgga gaccattga aggatacttc aggacctca 2220
ttgaacatcc tcatcaagct catggctgtt gagtctcttg tctttgctcc cttcttcgcc 2280
actcacggtg gtatcctttt caagtacttc taatctag 2318

```

```

<210> 8
<211> 770
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

```

```

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..770
<223> /mol_type="protein"
      /organism="Arabidopsis thaliana"

```

```

<220>
<221> PEPTIDE
<222> 1..770
<223> Secuencia aminoacidica del gen AVP1 que codifica para la H+-PPasa
      vacuolar

```

```

<400> 8
Met Val Ala Pro Ala Leu Leu Pro Glu Leu Trp Thr Glu Ile Leu Val
1          5          10          15
Pro Ile Cys Ala Val Ile Gly Ile Ala Phe Ser Leu Phe Gln Trp Tyr
          20          25          30
Val Val Ser Arg Val Lys Leu Thr Ser Asp Leu Gly Ala Ser Ser Ser
          35          40          45
Gly Gly Ala Asn Asn Gly Lys Asn Gly Tyr Gly Asp Tyr Leu Ile Glu
          50          55          60
Glu Glu Glu Gly Val Asn Asp Gln Ser Val Val Ala Lys Cys Ala Glu
65          70          75          80
Ile Gln Thr Ala Ile Ser Glu Gly Ala Thr Ser Phe Leu Phe Thr Glu
          85          90          95
Tyr Lys Tyr Val Gly Val Phe Met Ile Phe Phe Ala Ala Val Ile Phe

```

ES 2 403 541 A1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | 110 | | | |
| Val | Phe | Leu | Gly | Ser | Val | Glu | Gly | Phe | Ser | Thr | Asp | Asn | Lys | Pro | Cys |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Thr | Tyr | Asp | Thr | Thr | Arg | Thr | Cys | Lys | Pro | Ala | Leu | Ala | Thr | Ala | Ala |
| | 130 | | | | | 135 | | | | 140 | | | | | |
| Phe | Ser | Thr | Ile | Ala | Phe | Val | Leu | Gly | Ala | Val | Thr | Ser | Val | Leu | Ser |
| 145 | | | | | 150 | | | | 155 | | | | | | 160 |
| Gly | Phe | Leu | Gly | Met | Lys | Ile | Ala | Thr | Tyr | Ala | Asn | Ala | Arg | Thr | Thr |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | |
| Leu | Glu | Ala | Arg | Lys | Gly | Val | Gly | Lys | Ala | Phe | Ile | Val | Ala | Phe | Arg |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Ser | Gly | Ala | Val | Met | Gly | Phe | Leu | Leu | Ala | Ala | Ser | Gly | Leu | Leu | Val |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Leu | Tyr | Ile | Thr | Ile | Asn | Val | Phe | Lys | Ile | Tyr | Tyr | Gly | Asp | Asp | Trp |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Glu | Gly | Leu | Phe | Glu | Ala | Ile | Thr | Gly | Tyr | Gly | Leu | Gly | Gly | Ser | Ser |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Met | Ala | Leu | Phe | Gly | Arg | Val | Gly | Gly | Gly | Ile | Tyr | Thr | Lys | Ala | Ala |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Asp | Val | Gly | Ala | Asp | Leu | Val | Gly | Lys | Ile | Glu | Arg | Asn | Ile | Pro | Glu |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Asp | Asp | Pro | Arg | Asn | Pro | Ala | Val | Ile | Ala | Asp | Asn | Val | Gly | Asp | Asn |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Val | Gly | Asp | Ile | Ala | Gly | Met | Gly | Ser | Asp | Leu | Phe | Gly | Ser | Tyr | Ala |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| Glu | Ala | Ser | Cys | Ala | Ala | Leu | Val | Val | Ala | Ser | Ile | Ser | Ser | Phe | Gly |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Ile | Asn | His | Asp | Phe | Thr | Ala | Met | Cys | Tyr | Pro | Leu | Leu | Ile | Ser | Ser |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Met | Gly | Ile | Leu | Val | Cys | Leu | Ile | Thr | Thr | Leu | Phe | Ala | Thr | Asp | Phe |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Phe | Glu | Ile | Lys | Leu | Val | Lys | Glu | Ile | Glu | Pro | Ala | Leu | Lys | Asn | Gln |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Leu | Ile | Ile | Ser | Thr | Val | Ile | Met | Thr | Val | Gly | Ile | Ala | Ile | Val | Ser |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Trp | Val | Gly | Leu | Pro | Thr | Ser | Phe | Thr | Ile | Phe | Asn | Phe | Gly | Thr | Gln |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Lys | Val | Val | Lys | Asn | Trp | Gln | Leu | Phe | Leu | Cys | Val | Cys | Val | Gly | Leu |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Trp | Ala | Gly | Leu | Ile | Ile | Gly | Phe | Val | Thr | Glu | Tyr | Tyr | Thr | Ser | Asn |
| | | | 420 | | | | 425 | | | | | | 430 | | |
| Ala | Tyr | Ser | Pro | Val | Gln | Asp | Val | Ala | Asp | Ser | Cys | Arg | Thr | Gly | Ala |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Ala | Thr | Asn | Val | Ile | Phe | Gly | Leu | Ala | Leu | Gly | Tyr | Lys | Ser | Val | Ile |
| | | 450 | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Ile | Pro | Ile | Phe | Ala | Ile | Ala | Ile | Ser | Ile | Phe | Val | Ser | Phe | Ser | Phe |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| Ala | Ala | Met | Tyr | Gly | Val | Ala | Val | Ala | Ala | Leu | Gly | Met | Leu | Ser | Thr |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| Ile | Ala | Thr | Gly | Leu | Ala | Ile | Asp | Ala | Tyr | Gly | Pro | Ile | Ser | Asp | Asn |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| Ala | Gly | Gly | Ile | Ala | Glu | Met | Ala | Gly | Met | Ser | His | Arg | Ile | Arg | Glu |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| Arg | Thr | Asp | Ala | Leu | Asp | Ala | Ala | Gly | Asn | Thr | Thr | Ala | Ala | Ile | Gly |
| | | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| Lys | Gly | Phe | Ala | Ile | Gly | Ser | Ala | Ala | Leu | Val | Ser | Leu | Ala | Leu | Phe |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| Gly | Ala | Phe | Val | Ser | Arg | Ala | Gly | Ile | His | Thr | Val | Asp | Val | Leu | Thr |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| Pro | Lys | Val | Ile | Ile | Gly | Leu | Leu | Val | Gly | Ala | Met | Leu | Pro | Tyr | Trp |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| Phe | Ser | Ala | Met | Thr | Met | Lys | Ser | Val | Gly | Ser | Ala | Ala | Leu | Lys | Met |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| Val | Glu | Glu | Val | Arg | Arg | Gln | Phe | Asn | Thr | Ile | Pro | Gly | Leu | Met | Glu |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| Gly | Thr | Ala | Lys | Pro | Asp | Tyr | Ala | Thr | Cys | Val | Lys | Ile | Ser | Thr | Asp |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| Ala | Ser | Ile | Lys | Glu | Met | Ile | Pro | Pro | Gly | Cys | Leu | Val | Met | Leu | Thr |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| Pro | Leu | Ile | Val | Gly | Phe | Phe | Phe | Gly | Val | Glu | Thr | Leu | Ser | Gly | Val |

ES 2 403 541 A1

Leu Ala Gly Ser Leu Val Ser Gly Val Gln Ile Ala Ile Ser Ala Ser
 660 665 670
 675 680 685
 Asn Thr Gly Gly Ala Trp Asp Asn Ala Lys Lys Tyr Ile Glu Ala Gly
 690 695 700
 Val Ser Glu His Ala Lys Ser Leu Gly Pro Lys Gly Ser Glu Pro His
 705 710 715 720
 Lys Ala Ala Val Ile Gly Asp Thr Ile Gly Asp Pro Leu Lys Asp Thr
 725 730 735
 Ser Gly Pro Ser Leu Asn Ile Leu Ile Lys Leu Met Ala Val Glu Ser
 740 745 750
 Leu Val Phe Ala Pro Phe Phe Ala Thr His Gly Gly Ile Leu Phe Lys
 755 760 765
 Tyr Phe
 770

<210> 9
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..287
 <223> /mol_type="protein"
 /organism="Saccharomyces cerevisiae"

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 1..287
 <223> Secuencia aminoacidica de IPP1

<400> 9
 Met Thr Tyr Thr Thr Arg Gln Ile Gly Ala Lys Asn Thr Leu Glu Tyr
 1 5 10 15
 Lys Val Tyr Ile Glu Lys Asp Gly Lys Pro Val Ser Ala Phe His Asp
 20 25 30
 Ile Pro Leu Tyr Ala Asp Lys Glu Asn Asn Ile Phe Asn Met Val Val
 35 40 45
 Glu Ile Pro Arg Trp Thr Asn Ala Lys Leu Glu Ile Thr Lys Glu Glu
 50 55 60
 Thr Leu Asn Pro Ile Ile Gln Asp Thr Lys Lys Gly Lys Leu Arg Phe
 65 70 75 80
 Val Arg Asn Cys Phe Pro His His Gly Tyr Ile His Asn Tyr Gly Ala
 85 90 95
 Phe Pro Gln Thr Trp Glu Asp Pro Asn Val Ser His Pro Glu Thr Lys
 100 105 110
 Ala Val Gly Asp Asn Asp Pro Ile Asp Val Leu Glu Ile Gly Glu Thr
 115 120 125
 Ile Ala Tyr Thr Gly Gln Val Lys Gln Val Lys Ala Leu Gly Ile Met
 130 135 140
 Ala Leu Leu Asp Glu Gly Glu Thr Asp Trp Lys Val Ile Ala Ile Asp
 145 150 155 160
 Ile Asn Asp Pro Leu Ala Pro Lys Leu Asn Asp Ile Glu Asp Val Glu
 165 170 175
 Lys Tyr Phe Pro Gly Leu Leu Arg Ala Thr Asn Glu Trp Phe Arg Ile
 180 185 190
 Tyr Lys Ile Pro Asp Gly Lys Pro Glu Asn Gln Phe Ala Phe Ser Gly
 195 200 205
 Glu Ala Lys Asn Lys Lys Tyr Ala Leu Asp Ile Ile Lys Glu Thr His
 210 215 220
 Asp Ser Trp Lys Gln Leu Ile Ala Gly Lys Ser Ser Asp Ser Lys Gly
 225 230 235 240
 Ile Asp Leu Thr Asn Val Thr Leu Pro Asp Thr Pro Thr Tyr Ser Lys
 245 250 255
 Ala Ala Ser Asp Ala Ile Pro Pro Ala Ser Leu Lys Ala Asp Ala Pro
 260 265 270
 Ile Asp Lys Ser Ile Asp Lys Trp Phe Phe Ile Ser Gly Ser Val
 275 280 285

ES 2 403 541 A1

<210> 10
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..289
 <223> /mol_type="protein"
 /organism="Homo sapiens"

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 1..289
 <223> Secuencia aminoacidica del gen PPA1 humano LOCUS NM21129

<400> 10
 Met Ser Gly Phe Ser Thr Glu Glu Arg Ala Ala Pro Phe Ser Leu Glu
 1 5 10 15
 Tyr Arg Val Phe Leu Lys Asn Glu Lys Gly Gln Tyr Ile Ser Pro Phe
 20 25 30
 His Asp Ile Pro Ile Tyr Ala Asp Lys Asp Val Phe His Met Val Val
 35 40 45
 Glu Val Pro Arg Trp Ser Asn Ala Lys Met Glu Ile Ala Thr Lys Asp
 50 55 60
 Pro Leu Asn Pro Ile Lys Gln Asp Val Lys Lys Gly Lys Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Val Ala Asn Leu Phe Pro Tyr Lys Gly Tyr Ile Trp Asn Tyr Gly Ala
 85 90 95
 Ile Pro Gln Thr Trp Glu Asp Pro Gly His Asn Asp Lys His Thr Gly
 100 105 110
 Cys Cys Gly Asp Asn Asp Pro Ile Asp Val Cys Glu Ile Gly Ser Lys
 115 120 125
 Val Cys Ala Arg Gly Glu Ile Ile Gly Val Lys Val Leu Gly Ile Leu
 130 135 140
 Ala Met Ile Asp Glu Gly Glu Thr Asp Trp Lys Val Ile Ala Ile Asn
 145 150 155 160
 Val Asp Asp Pro Asp Ala Ala Asn Tyr Asn Asp Ile Asn Asp Val Lys
 165 170 175
 Arg Leu Lys Pro Gly Tyr Leu Glu Ala Thr Val Asp Trp Phe Arg Arg
 180 185 190
 Tyr Lys Val Pro Asp Gly Lys Pro Glu Asn Glu Phe Ala Phe Asn Ala
 195 200 205
 Glu Phe Lys Asp Lys Asp Phe Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ser Thr His
 210 215 220
 Asp His Trp Lys Ala Leu Val Thr Lys Lys Thr Asn Gly Lys Gly Ile
 225 230 235 240
 Ser Cys Met Asn Thr Thr Leu Ser Glu Ser Pro Phe Lys Cys Asp Pro
 245 250 255
 Asp Ala Ala Arg Ala Ile Val Asp Ala Leu Pro Pro Pro Cys Glu Ser
 260 265 270
 Ala Cys Thr Val Pro Thr Asp Val Asp Lys Trp Phe His His Gln Lys
 275 280 285
 Asn



- ②¹ N.º solicitud: 201130852
②² Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2011
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤ ⁶ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | GAXIOLA, A., <i>et al.</i> Plant proton pumps. FEBS LETTERS, 25.05.2007 VOL: 581 No: 12 Pags: 2204-2214 ISSN 0014-5793 Doi: doi:10.1016/j.febslet.2007.03.050. Ver todo el documento, especialmente resumen y apartados 3, 4 y 6. | 1-20 |
| A | GAXIOLA, A., <i>et al.</i> A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops aspart of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. CHEMOSPHERE, 01.03.2011 (en línea) VOL: 84 No: 6 Pags: 840-845 ISSN 0045-6535 Doi: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.062. Ver todo el documento, especialmente resumen y apartados 5 y 6. | 1-20 |
| A | PEREZ-CASTINEIRA, J.R., <i>et al.</i> Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase bybacterial and plant H ⁺ -translocating pyrophosphatases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 10.12.2002 VOL: 99 No: 25 Pags: 15914-15919 ISSN 0027-8424 Doi: doi:10.1073/PNAS.242625399. Ver todo el documento. | 1-20 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.03.2013

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/55 (2006.01)

C12N1/15 (2006.01)

C12N5/10 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC,WPI,TXTUS0,TXTUS1,TXTUS2,TXTUS3,TXTUS4,TXTUS5,TXTEP1,XTGB1,XTWO1,XTAU1,XTCA1, TCPAT,MEDLINE,BIOSIS,NPL,EMBASE,XPESP,XPESP2,EBI (UniProt,Euro Patents,Japan Patents,Korea Patents,US Patents, EMBL All), Google Academics.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.03.2013

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-20 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-20 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | GAXIOLA, A., <i>et al.</i> FEBS LETTERS, 25.05.2007 VOL: 581 No: 12 Pags: 2204-2214 ISSN 0014-5793 Doi: doi:10.1016/j.febslet.2007.03.050. | 25.05.2007 |
| D02 | GAXIOLA, A., <i>et al.</i> CHEMOSPHERE, 01.03.2011 (en línea) VOL: 84 No: 6 Pags: 840-845 ISSN 0045-6535 Doi: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.062. | 01.03.2011 |
| D03 | PEREZ-CASTINEIRA, J.R., <i>et al.</i> Proceedings of the National Academy of Sciences, 10.12.2002 VOL: 99 No: 25 Pags: 15914-15919 ISSN 0027-8424 Doi: doi:10.1073/PNAS.242625399. | 10.12.2002 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe el uso de secuencias nucleotídicas que codifican para una pirofosfatasa translocadora de protones (H⁺-PPasa) para producir tolerancia a fármacos citotóxicos inhibidores de la ATPasa translocadora de protones vacuolar (V-ATPasa) y a fungicidas morfolinos en células fúngicas y animales. La patente reivindica también un método para transformar células fúngicas o animales con estas secuencias nucleotídicas de modo que, además, las células tienen inactivado el gen de la pirofosfatasa soluble citosólica (sPPasa). Reivindica también un método para obtener un tejido u organismo fúngico o animal que contiene las mencionadas secuencias de H⁺-PPasa y tiene inactivada la sPPasa.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue los usos y métodos de la solicitud tal y como están reivindicados, ni se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia a los usos y métodos de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 20 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe tres documentos del campo técnico de la solicitud que se consideran cercanos a la misma pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

Los documentos D01 y D02 son sendas revisiones de las pirofosfatasa translocadoras de protones de plantas, en las que se incluyen trabajos de expresión heteróloga de estas H⁺-PPasas en levaduras y en plantas. Dado que esta expresión heteróloga se emplea para identificar determinantes estructurales (en D01) y para favorecer la captura del fósforo inorgánico en cereales (en D02), y que en ninguno de los dos documentos se menciona la utilidad de las secuencias de la H⁺-PPasa para conseguir tolerancia a fármacos, no se considera que estos documentos afecten la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

En el documento D03 se describe, como en la solicitud, la introducción de secuencias de H⁺-PPasas de plantas y bacterias en células de levadura, en las que además se ha inactivado el gen de la sPPasa citosólica. Pero, al igual que en los casos anteriores, no se asocian de ninguna forma las células transformadas con la resistencia a fármacos, por lo que el documento D03 tampoco anticipa los usos ni métodos de la solicitud, que, por tanto, cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.