



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 214 972**

② Número de solicitud: 200300591

⑤ Int. Cl.7: **C12N 15/29**

C12N 15/82

C12N 5/04

A01M 5/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **12.03.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2004**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.2004

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Córdoba
Alfonso XIII, nº 13
14001 Córdoba, ES**

⑱ Inventor/es: **Pineda Priego, Manuel;
Gálvez Valdivieso, Gregorio;
Aguilar Urbano, Miguel;
Piedras Montilla, Pedro;
Vera Postigo, José Manuel y
Ruiz Rubio, Manuel**

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Moléculas de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa de maíz y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa de maíz y sus aplicaciones.

Dicha molécula comprende (a) una secuencia de ADN identificada por SEQ ID No. 1, o (b) una secuencia de ADN análoga a la misma que (i) es sustancialmente homóloga a ella, y/o que (ii) que codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por dicha molécula de ADN.

Dicha molécula introducida en una planta productora de tocoferoles, principalmente maíz, por técnicas habituales en biotecnología, permite aumentar el contenido de vitamina E total en dicha planta, así como el contenido en α y γ -tocoferol, entre otras aplicaciones.

ES 2 214 972 A1

DESCRIPCIÓN

Molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa de maíz y sus aplicaciones.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología.

Más específicamente, la invención se refiere a una molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT) de maíz y al empleo de la misma para modular la expresión de tocoferoles en semillas, especialmente de maíz. La invención también se refiere al contenido de vitamina E total, γ - y α -tocoferol obtenido por represión, expresión y traducción de dicha molécula de ADN.

Estado de la técnica anterior a la invención

Los radicales libres son compuestos altamente reactivos producidos en los organismos vivos en procesos normales como consecuencia del metabolismo del oxígeno. Unos niveles normales de radicales libres en nuestras células tienen cierto papel beneficioso en el organismo; en cambio, unos niveles elevados son perjudiciales para la salud. Los radicales libres pueden atacar a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana y dañar así la estructura y funciones de las membranas celulares, también causan daños al ADN y a las proteínas. Los radicales libres conducen a un estrés oxidativo que está implicado en el desarrollo de una serie de enfermedades relacionadas con la edad como la debilitación cognitiva y la enfermedad de Alzheimer, la debilidad del sistema inmune, cataratas, arteriosclerosis, cáncer y artritis (Cross, 1987). Existen numerosos factores ambientales que pueden inducir a una elevada producción de radicales libres; entre estos se encuentran las radiaciones, los humos y los pesticidas (Jacobson, 1987; Halliwell, 1996), (los datos completos de éstas y las demás citas bibliográficas, se dan al final de la descripción, para no hacer demasiado farragosa la presente exposición).

Los seres vivos presentan varios mecanismos con función antioxidante. Entre las diversas sustancias con capacidad antioxidante se encuentra la vitamina E. Su papel como atrapador de radicales libres es crucial en la prevención de la oxidación de los ácidos grasos insaturados situados en la membrana plasmática y es considerada la primera línea de defensa contra la peroxidación de lípidos (Horwitt, 1986; Pecker et al, 1995; Halliwell, 1996).

La vitamina E es sintetizada sólo por las plantas. Por tanto, se encuentra fundamentalmente en productos vegetales (aceites vegetales, semillas...). Existen cuatro isómeros de tocoferol con actividad vitamina E (α , β , γ y δ -tocoferol). Todas las plantas superiores tienen α -tocoferol (hojas y otras partes verdes), mientras que el γ -tocoferol (también el β - y el δ -tocoferol) está presente en concentraciones muy inferiores (Combs, 1992). Las proporciones individuales de los tocoferoles varían ampliamente entre los diferentes aceites de semillas.

La vitamina E se distribuye por todos los tejidos del cuerpo humano a través del plasma y elementos celulares de la sangre, como eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Bajo ciertas circunstancias la vitamina E es transportada por la linfa y la sangre como tocoferol libre o unido a β -lipoproteína (Bjoerneboe, 1990). La forma predominante en plasma humano es α -tocoferol, que constituye el 90% de la concentración total de

vitamina E, y el resto está formado por γ -tocoferol y β -tocoferol en una proporción de 5:1. De δ -tocoferol y tocotrienoles se encuentran solo trazas en plasma humano.

La mayor parte de la vitamina E procede de la toma diaria de aceites y margarina. La absorción de la vitamina E depende de la habilidad del cuerpo para absorber grasas; por tanto, alguna enfermedad que afecte a la digestión, absorción o transporte de estas grasas puede conducir a deficiencias en vitamina E. Una deficiencia severa y crónica puede dar lugar a un característico síndrome neurológico de neuropatía progresiva, con ausencia o disminución de reflejos, debilidad de los miembros, alteración en la marcha y pérdida sensorial en brazos y piernas. En los roedores, el déficit de vitamina E produce esterilidad, parálisis y distrofia muscular (Sokol, 1988). El exceso en el consumo de vitamina E no parece producir efectos nocivos.

Estudios recientes que comparan la vitamina E natural con la forma sintética sugieren que la biodisponibilidad de la forma natural es dos veces superior a la de la vitamina E sintética. La vitamina E natural y la sintética muestran las siguientes diferencias (Horwitt, 1986; Cheng et al, 1987; Ingold et al, 1987):

1. La vitamina E natural es derivada de aceites vegetales, principalmente de aceite de soja. La vitamina E sintética se produce a partir de derivados del petróleo.
2. La vitamina E natural es un estereoisómero. La vitamina E sintética es una mezcla de ocho estereoisómeros.
3. La vitamina E natural es más biodisponible que la forma sintética.
4. La vitamina E natural queda retenida durante más tiempo, en tejidos del cuerpo que la forma sintética.

En la actualidad existe un gran interés en el uso de antioxidantes en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosmética (Combs, 1992; Halliwell et al, 1992). Esto produce una gran demanda de antioxidantes estables, a lo que hay que añadir la preferencia por parte de los consumidores y de las autoridades sanitarias por los de carácter natural, básicamente vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y extractos relativamente complejos de varias especies de plantas (*Rosmarinus officinalis*, *Nerium oleander* y *Myrtus communis*).

Los trabajos de Chapault y colaboradores (Chapault et al, 1952, 1955, 1956) fueron los precursores de muchos estudios sobre la capacidad antioxidante de un número de extractos de plantas con aplicaciones potenciales como conservantes en industrias alimentarias, farmacéuticas y de cosmética (Taga et al, 1984; Written et al, 1984; Wu et al, 1984; Economou et al, 1991; Mallet et al, 1994; Daood et al, 1996; Schwants et al, 1996).

La planta de maíz es un producto alimenticio muy apreciado, de amplia aceptación e interés comercial, constituyendo en los EEUU, la mayor fuente alimenticia. Sería muy conveniente disponer de semillas de maíz que, a la vez que mantuvieran sus propiedades organolépticas, fueran muy ricas tanto en el contenido de vitamina E total como en γ - y/o α -tocoferol y, por tanto, dispusieran de mayores niveles de antioxi-

dantes naturales.

La γ -tocoferol metiltransferasa (EC 2.1.1.95) es la enzima que cataliza la metilación del γ -tocoferol a partir de la S-adenosilmetionina (SAM) para dar α -tocoferol.

Una alternativa para obtener semillas de maíz con mayor capacidad antioxidante sería el desarrollo de semillas transgénicas que tuvieran unos niveles elevados de ARNm correspondientes a la γ -TMT con el fin de aumentar su capacidad antioxidante. Para ello, es necesario identificar, aislar y caracterizar el ADN genómico (ADNg) o complementario (ADNc), que codifica para la γ -TMT de maíz y/o el ARNm correspondiente a dicha enzima. Igualmente, la obtención de organismos caracterizados por una alta producción de γ -tocoferol puede plantearse mediante estrategias antisentido que permitan disminuir la expresión del gen de la γ -tocoferol metiltransferasa. Del mismo modo, también podría verse favorecido mediante la sobreexpresión del gen de la ρ -HPPD (ρ -hidroxifenilpiruvato dioxigenasa), habida cuenta de los resultados mostrados por Shintani y DellaPenna (1998), en los que los niveles totales de vitamina E no se incrementan en transformantes antisentido carentes de actividad γ -tocoferol metiltransferasa, y en los que solo se ve afectada la proporción relativa de los distintos isómeros del tocoferol.

La invención proporciona una solución a la necesidad existente de conseguir clonar un gen de maíz, así como el correspondiente ADNc, que codifica para una γ -TMT de maíz.

Compendio de la invención

El principal objeto de esta invención lo constituye una molécula de ADN que codifica para una γ -TMT de maíz.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN para modular la expresión de la γ -TMT en semillas, preferentemente de semillas de maíz.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de ADN que comprende la totalidad o una parte de dicha molécula de ADN, así como un vector que contiene dicha molécula o construcción de ADN y una célula transformada con dicho vector.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN, o de dicha construcción de ADN, en la obtención de plantas transgénicas que expresan una actividad enzimática γ -TMT modulada, por ejemplo, plantas transgénicas que posean unos niveles de ARNm correspondientes a la γ -TMT elevados o inexistentes. Las plantas transgénicas resultantes constituyen otro objeto adicional de esta invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT) de maíz, en adelante molécula de ADN de la invención, seleccionada entre:

- a) una secuencia de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID No. 1;
- b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
 - i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a) y/o que

- ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análogo/a" pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que codifica para una enzima que posee, al menos, actividad γ -TMT que tiene las propiedades i)-ii) arriba mencionadas. Típicamente la secuencia de ADN análoga:

- se puede aislar de otra especie que produce una γ -TMT en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1, o

- se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas, es decir, que dan lugar a la misma secuencia de aminoácidos de la γ -TMT que la codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1, pero que corresponde al empleo de codones del organismo hospedador destinado a la producción de la proteína, o bien mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que dan lugar a una secuencia de aminoácidos diferente y, por tanto, posiblemente a una estructura proteica diferente que pudiera dar lugar a una proteína mutante con propiedades diferentes a las de la proteína nativa. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ADN análogo puede ser una sub-secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID No. 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga", aplicada a secuencias de nucleótidos, significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 70% preferentemente de al menos, un 85%, o más preferentemente de al menos, un 95%.

La molécula de ADN de la invención puede proceder de cualquier variedad de maíz (por ejemplo Zea mays L.) o bien de un organismo hospedador transformado con dicha molécula de ADN.

Alternativamente, la molécula de ADN de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir de ADN de cualquier otra especie mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de ADN proporcionada en esta descripción.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADNc del ARNm correspondiente al gen de la γ -TMT de maíz, relacionado con la biosíntesis de los tocoferoles, que se ha caracterizado molecular y fisiológicamente cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1. El análisis comparativo de la secuencia deducida de la proteína ha puesto de manifiesto que este gen corresponde a un gen que codifica para una γ -TMT. La SEQ ID No. 1 corresponde a la secuencia completa del ADNc del ARNm de la γ -TMT de maíz.

La molécula de ADN de la invención puede obtenerse utilizando métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, mediante un procedimiento que comprende la extracción del ARNm correspondiente a la transcripción del gen que codifica para la γ -TMT a partir de un organismo productor de dicha enzima, la obtención de una primera cadena de ADNc por transcripción inversa del correspondiente ARNm, la síntesis de una segunda cadena de ADNc, complementaria a la primera, para obtener un ADNc de doble cadena, la unión de unos enlaces para su inserción en plásmidos o fagos para su propagación en, por ejemplo, un sistema bacteriano y la identificación de los clones que portan el ADNc deseado.

En una realización particular (véase el Ejemplo 1), se ha obtenido un clon parcial de ADNc correspondiente al ARNm de la γ -TMT de plántulas de maíz, mediante un procedimiento que comprende aplicar la técnica RT-PCR (Retrotranscriptase-PCR) a ARNm procedentes de plántulas etioladas de maíz de 4 días a partir de la germinación, así como de plántulas verdes de 9 días. Para ello, se extrajeron los ARNm de dichas plántulas, se sometieron a una reacción de transcripción inversa (RT) para obtener los correspondientes ADNc de cadena simple. Los productos de la amplificación (que se correspondían con los ARNm expresados en ambos tejidos y contenían la secuencia de nucleótidos que codificaba para la γ -TMT de maíz) se subclonaron en unos vectores apropiados que se utilizaron para transformar bacterias. Seguidamente se extrajo el ADN correspondiente al plásmido recombinante, que se purificó y secuenció. La secuencia obtenida (SEQ ID No. 1) se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos utilizando el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). La comparación de las secuencias puso de manifiesto que la secuencia de ADN obtenida presentaba una relativamente elevada homología de secuencia única y exclusivamente con otras secuencias de plantas superiores que codifican para una γ -TMT.

Utilizando la secuencia de este ADNc se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (SEQ ID No. 3, SEQ ID No.4) que permitieron el aislamiento de un gen γ TMT que se secuenció completamente (SEQ ID No. 1). La comparación entre la secuencia del gen γ TMT y las secuencias presentes en las bases de datos puso de manifiesto una identidad de secuencia a nivel de aminoácidos significativa con secuencias correspondientes a γ TMT de plantas.

La invención proporciona, además una construcción de ADN, en adelante, construcción de ADN de la invención, que comprende la totalidad de la molécula de ADN de la invención o un fragmento de, al menos, 8 nucleótidos consecutivos de la molécula de ADN de la invención y una región iniciadora de la transcripción funcional en plantas. En dicha construcción, cualquiera de los extremos (3' ó 5') de la totalidad o del fragmento de la molécula de ADN de la invención puede estar unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción. La construcción de ADN de la invención también puede contener, operativamente enlazada, una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización particular, dicha región iniciadora y terminadora de la transcripción sería funcional en plantas de maíz.

La molécula de ADN de la invención, o la cons-

trucción de ADN de la invención, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha molécula de ADN, o una construcción que la contiene. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el (o en los que) se ha integrado.

En el vector proporcionado por esta invención, la molécula de ADN de la invención estará conectada operativamente a un promotor y a una secuencia terminadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora elegida y puede derivar bien de genes que codifican para proteínas homólogas o heterólogas de la célula hospedadora. Los procedimientos utilizados para ligar la secuencia de ADN de la invención al promotor y a la secuencia terminadora, respectivamente, y para insertar dicha construcción en un vector son bien conocidos por los técnicos en la materia y han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. (1989).

La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ADN de la invención, o una construcción de ADN que contiene a dicha secuencia o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de ADN de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc, véase, por ejemplo, el libro titulado "Gene Transfer to Plants" de I. Potrykus y G. Spangenberg, Ed. Springer Lab. Manual (1995).

La invención también proporciona una proteína con actividad γ -tocoferol metiltransferasa, en adelante γ -TMT de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 2,
- la secuencia de aminoácidos deducidos a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1,
- una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente definidas en a) o en b).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 70%, preferentemente de al menos, un 85%, y, más preferentemente de al menos un 95%.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que la proteína en cuestión tiene una actividad γ -tocoferol metiltransferasa.

En una realización particular, la γ -TMT de la in-

vención es una γ -TMT de maíz (*Zea mays*) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 2. La SEQ ID No. 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos de un fragmento de una γ -TMT de maíz y ha sido deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del fragmento parcial del ADNc del ARNm correspondiente al gen de la γ -TMT de maíz mostrada en la SEQ ID No. 1. La comparación entre la SEQ ID No. 1 y las secuencias presentes en las bases de datos puso de manifiesto una identidad de secuencia a nivel de aminoácidos significativa únicamente con secuencias correspondientes a γ TMT de plantas superiores. El análisis por computador de la ORF del gen γ TMT mostró una proteína deducida de 352 aminoácidos.

La γ -TMT de la invención puede obtenerse mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora adecuada que contiene la molécula de ADN de la invención, o una construcción de ADN de la invención, bajo condiciones que permiten la producción de la proteína y su recuperación del medio de cultivo.

La γ -TMT de la invención puede obtenerse, alternativamente, a partir de un organismo productor de la misma mediante un procedimiento que comprende el cultivo del organismo productor, por ejemplo, plántulas verdes de maíz, bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha enzima, y, posteriormente, recuperar dicha enzima.

La invención también se refiere al uso de una preparación enzimática resultante de romper la célula u organismo hospedador que contiene la molécula o construcción de ADN de la invención, así como al resultante de someter a esta preparación a diversos pasos de purificación o enriquecimiento por los métodos conocidos por los técnicos en la materia. Una preparación resultante de mezclar la preparación anterior con otros componentes también es objeto de la invención.

La γ -TMT de la invención tiene importancia en la industria alimenticia, en particular, en la industria del procesado de conservación de alimentos, tales como atún, sardinas, etc. El empleo de la γ -TMT de la invención en la industria alimenticia podría dar lugar a alimentos con unos niveles superiores de antioxidantes naturales otorgando así un valor añadido a dichos productos alimenticios puesto que se podría aumentar el tiempo de conservación de los mismos. La molécula de ADN de la invención puede ser utilizada en procesos de mejora de la conservación de diferentes alimentos, modulando la expresión por sobreexpresión o represión de la γ -TMT, alterando con ello por un lado la mayor capacidad vitamínica de los alimentos así como la capacidad de deterioro de dichos alimentos. En una realización particular, la molécula de ADN de la invención se utiliza en la obtención de plantas transgénicas que posean unos niveles de ARNm correspondientes muy elevados o muy reducidos o inexistentes. Para la obtención de estas plantas transgénicas se puede proceder con las técnicas convencionales de ARNm antisentido y/o sobreexpresión (silenciamiento en sentido), u otras.

La invención también se refiere a una célula transgénica de una planta, o a la planta que contiene al menos una de estas células, que comprende una construcción de ADN de la invención que contiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN de

la invención, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión. Y en una realización particular esta planta tendría unos niveles superiores de α -tocoferol o bien de vitamina E total.

Por tanto, la invención también se refiere a una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de ADN de la invención que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN de la invención, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

Una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas, constituye un objeto adicional de esta invención. En una realización particular, dicha planta transgénica es una planta de maíz. En otras realizaciones particulares, las plantas transgénicas son plantas que producen diferentes niveles tanto de γ -tocoferol como de α -tocoferol.

La utilización de la molécula de ADN de la invención, en particular, de una molécula de ADNc que codifica para una γ -TMT de maíz, de longitud completa o parcial, mediante cualquier tipo de técnica, puede generar plantas transgénicas que tengan alterados los niveles de tocoferoles o de vitamina E total, con la consiguiente ventaja en la calidad del fruto de maíz, así como de la planta entera, lo que redundará en un valor económico añadido a los mismos.

Modos de realización de la invención

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Clonaje del gen γ TMT

Se ha clonado el gen γ TMT, que codifica para una γ -TMT de maíz, relacionado con la biosíntesis de la vitamina E y se ha caracterizado molecular y fisiológicamente. El análisis comparativo de la secuencia deducida de la proteína ha puesto de manifiesto que este gen corresponde a un gen que codifica para una γ -TMT.

Para obtener el gen γ TMT se siguió una estrategia que comprendía el empleo de la técnica RT-PCR, amplificando por PCR los fragmentos de ADNc obtenidos a partir de ARNm que se expresaban en plántulas etioladas y verdes de maíz. Los productos amplificados se subclonaron en unos vectores y con dichos vectores se transformaron células de *Escherichia coli*, seleccionándose las células transformantes que contenían el vector con el inserto de ADNc correspondiente a la γ -TMT de maíz, que se aisló, purificó y secuenció. La secuencia obtenida se comparó con otras secuencias de ADN que codifican para γ -TMT de otros organismos. Seguidamente se explica con detalle este proceso:

1.1 Aislamiento del ARN

Para la obtención del ARNm correspondiente a la transcripción del gen que codifica para la γ TMT de maíz se extrajo el ARN total procedente tanto de plántulas etioladas como de plántulas verdes de maíz. Para la extracción de ARN total se siguió el método descrito por Dellaporta et al. (1983).

1.2. RT-PCR

Una vez extraído el ARN total de ambos tejidos se sometieron a una reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Para ello se utilizó el kit comercial Po-

werScript Reverse Transcriptase (Clontech, CA, Palo Alto). Las condiciones de la RT-PCR incluyen: síntesis de las subpoblaciones ancladas de ADNc de simple cadena, amplificación de las mismas por PCR utilizando iniciadores arbitrarios; separación y comparación de las poblaciones resultantes de ADNc de doble cadena mediante electroforesis en geles de agarosa; recuperación, desde el gel, de los fragmentos de ADNc amplificados; las condiciones fueron las que se indican en el manual de uso del citado kit "PowerScript Reverse Transcriptase".

Una vez amplificados por PCR los fragmentos de ADNc, éstos se purificaron de la mezcla de PCR mediante el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" de la casa comercial ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, siguiendo la metodología descrita en su manual de instrucciones.

Posteriormente, los productos de la amplificación, que se correspondían con los ARNm expresados en los distintos tejidos, y contenían la secuencia de nucleótidos que codificaba para la γ -TMT de maíz, se subclonaron en un vector pGEM-Teasy de la casa comercial PROMEGA CORPORATION (Madison, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de ADNc contenidos en el plásmido recombinante se secuenciaron en un secuenciador automático ABI 310 utilizando el kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing de APPLIED BIOSYSTEMS (California, Estados Unidos), obteniéndose la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1 (que corresponde a la secuencia de ADN que codifica para una γ -TMT de maíz).

A continuación, se transformaron células de *E. Coli* con dicho vector, comprobándose que las células transformantes contenían el vector con el inserto de ADNc correspondiente a la γ -TMT de maíz, mediante técnicas convencionales descritas en Sambrook et al., (1989). Seguidamente se extrajo el ADN correspondiente al plásmido recombinante, se purificó y secuenció utilizando un secuenciador automático de ADN mediante técnicas convencionales descritas en Sambrook et al. (1989). La secuencia obtenida SEQ ID No. 1 se comparó con las secuencias depositadas en las bases de datos utilizando el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). La comparación de las secuencias puso de manifiesto que la secuencia de ADN obtenida que codifica para la γ -TMT de maíz presentaba una relativamente alta homología de secuencia única y exclusivamente con otras secuencias de diferentes organismos que codifican para una γ -TMT.

1.3. Reconstrucción del ADNc del gen γ TMT de maíz

El ADNc correspondiente al gen γ TMT de maíz se aisló utilizando la técnica SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) (Clontech, CA, Estados Unidos) utilizando dos poblaciones diferentes de ARN de plántulas de maíz correspondientes a plántulas crecidas en la oscuridad (etioldadas) y plántulas crecidas en luz. Para ello se utilizaron dos oligonucleótidos específicos Zm3 y Zm2 así como dos oligonucleótidos iniciadores procedentes del kit comercial.

El uso de estos oligonucleótidos permitió amplificar fragmentos con una región solapante (Fig. 1). El oligonucleótido Zm3 (SEQ ID No. 3) se utilizó pa-

ra amplificar el extremo 3' obteniéndose un fragmento de ADNc de un tamaño aparente de 570 pb. Con el oligonucleótido Zm2 (SEQ ID No. 4) se amplificó un fragmento de 1350 pb del extremo 5'. Estos dos fragmentos del ADNc se clonaron a continuación en el vector pBluescript® II KS (+/-) (Stratagene, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron completamente. Esto permitió comprobar que la suma de los dos fragmentos de ADNc abarcaba la totalidad de la región codificante del ADNc de la γ -TMT. La reconstrucción del ADNc completo (pTMT) se realizó por digestión de ambos clones en la región común, con la enzima EcoRV, y posterior ligación de los fragmentos.

De acuerdo con lo anterior, se ha conseguido clonar mediante RACE-PCR el ADNc que codifica para la γ -tocoferol metiltransferasa. Esto permitió la reconstrucción de un ADNc de 1301 pb que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT). La fase abierta de lectura desde el codón de inicio al codón de terminación codifica un péptido de 352 aminoácidos con un peso molecular calculado de 38349 Da, un punto isoeléctrico de 8,28 y una carga neta de -5,51 a pH 7,0.

La clonación y caracterización del gen de la γ -tocoferol metiltransferasa de *Zea mays* constituye un paso previo para la obtención de organismos transgénicos con los niveles de tocoferoles alterados.

Seguidamente se proporciona una relación detallada de las referencias bibliográficas que se han ido citando a lo largo de la exposición anterior:

- **Bjorneboe, A., Bjoernoboe, G., y Drevon, C.** (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.* 120, 233-242.
- **Cheng, S.C., Burton, G.W., Ingold, K.U. y Foster, D.O.** (1987). Chiral discrimination in the exchange of alpha-tocopherol stereoisomers between plasma and red blood cells, *Lipids* 22, 469-473.
- **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., y Lundsberg, W.O.** (1952). Antioxidant properties of natural spices. *Food Res.* 17, 46-55.
- **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., y Lundsberg, W.O.** (1955). Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions, *Food Res.* 20,443-448.
- **Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., y Lundsberg W.O.** (1956). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol.* 10, 209-211.
- **Combs, G.F.** (1992). The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. *Academic Press*, San Diego.
- **Cross, C.E.** (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107, 526-545.
- **Daood, H.G., Vinkler, M., Markus, F., Hebschi, E.A. y Biacs, P.A.** (1996). Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Foods. Checo.* 55, 365-372.
- **Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983) Isolation of DNA from higher plants. *PMB Reporter* 4, 19-21.

- **Economou, K.D., Oreopoulou, V. Y Thomopoulos, C.D. (1991).** Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiateaea. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 109-113.
- **González, M.J. (1990).** Serum concentrations and cellular uptake of vitamin E. *Med. Hypotheses* 32, 107-110.
- **Halliwell, B. (1996).** Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. (1992).** Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now. *J. Lab. Clin. Med.* 6, 598-620.
- **Horwitt, M.K. (1986).** The promotion of vitamin E. *J. Nutr.* 116, 1371-1377.
- **Horwitt, M.K. (1986).** Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin, tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B6. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 973-985.
- **Ingold, K.U., Burton, G.W., Foster, D.O. Hughes, L., Lindsay, D.A. y Webb, A. (1987).** Biokinetics of and discrimination between dietary RRR- and SRR- α -tocopherols in the male. *Rat. Lipids.* 22, 163-172.
- **Jacobson, H.N. (1987).** Dietary standards and future developments, *Free Rad. Biol. Med.* 3, 209-213.
- **Mallet, J.F., Cerrati, C., Ucciani, E., Gami-sans, J. y Gruber, M. (1994).** Antioxidant activity of plant leaves in relation to their α -tocopherol content. *Food Chem.* 49, 61-65.
- **Packer, L., Witt, E.H., y Tritschler, H.J. (1995).** α -lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 227-250.
- **Schwants, P., Kimball, B.A., Idso, S.B., Hendrix, D.L. y Polle, A. (1996).** Antioxidants in sun and shade leaves of sour orange trees (*Citrus aurantium*) after long-term acclimation to elevated CO_2 . *J. Exp. Bot.* 47, 1941-1950.
- **Shintani, D. y DellaPenna, D. (1998).** Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science.* 11, 2098-2100.
- **Sokol, R.J. (1988).** Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.* 8, 351-373.
- **Taga, M.S., Miller, E.E. y Pratt, D.E. (1984).** Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 928-933.
- **Written, C.C., Miller, E.E. y Pratt, D.E. (1984).** Cotton-seed flavonoids as lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1075-1078.
- **Wu, J.W., Lee, M.H., Ho, C.T. y Chang, S.S. (1984).** Elucidation of the chemical structure of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 339-345.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT) de maíz que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID No. 1;
- b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
 - i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a) y/o, que
 - ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

2. Molécula de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho ADN es ADNc.

3. Molécula de ADN según la reivindicación 1, en la que dicho ADN es ADN genómico (ADNg).

4. Una construcción de ADN que comprende (i) una secuencia de ADN seleccionada entre una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un fragmento de, al menos, 8 nucleótidos consecutivos de dicha molécula de ADN, y (ii) una región iniciadora de la transcripción funcional de plantas.

5. Construcción de ADN según la reivindicación 4, en la que el extremo 3' de dicha secuencia de ADN está unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción.

6. Construcción de ADN según la reivindicación 4, en la que el extremo 5' de dicha secuencia de ADN está unido al extremo 3' de dicha región iniciadora de la transcripción.

7. Construcción de ADN según las reivindicaciones 4 a 6, que comprende, además, una secuencia de terminación de la transcripción.

8. Un vector recombinante que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

9. Una célula que comprende una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o un vector según la reivindicación 8.

10. Una proteína con actividad γ -tocoferol metiltransferasa, obtenible por expresión de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

11. Una proteína con actividad γ -tocoferol metiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 2,
- b) la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No. 1 y
- c) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a las secuencias de aminoácidos definidas

en a) o en b).

12. Un método para la producción de una proteína con actividad γ -tocoferol metiltransferasa según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 9 bajo condiciones que permitan la producción de dicha proteína con actividad γ -tocoferol metiltransferasa y recuperarla del medio de cultivo.

13. Una preparación enzimática que comprende, al menos, una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.

14. Preparación enzimática según la reivindicación 13, que comprende entre 0,01% y 100% en peso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.

15. Preparación enzimática según la reivindicación 14, que comprende, además una o más proteínas con actividades enzimáticas diferentes.

16. Un método para aumentar el contenido de vitamina E total que comprende introducir en una planta productora de tocoferoles una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor de una orientación directa a la de su expresión.

17. Un método para aumentar el contenido de vitamina E total que comprende introducir en una planta de maíz una construcción de ADN que tiene un promotor funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

18. Un método para aumentar el contenido de α -y γ -tocoferol que comprende introducir en una planta de maíz una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor de una orientación opuesta a la de su expresión.

19. Una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado en una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación opuesta a la de su expresión.

20. Una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una sub-secuencia de ADN de, al menos, 8 nucleótidos, derivada de una molécula de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando unida dicha sub-secuencia de ADN al promotor en una orientación directa a la de su expresión.

21. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según las reivindicaciones 19 y 20.

22. Planta transgénica según la reivindicación 21, en la que dicha planta es una planta de maíz.

ES 2 214 972 A1

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad de Córdoba

<120> Molécula de ADN que codifica para una γ -tocoferol metiltransferasa de maíz y sus aplicaciones

<130> 2002-1174

10 <140>

<141>

15 <160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 1301

<212> ADN

<213> Maíz

25 <400> 1

```
ccacgcgtcc gcctcggcct cttttaaata tcgcgcatcc cggcgccgca aatggctcac 60
gcggcgctgc tccattgctc ccagtcctcc aggagcctcg cagcctgccg ccgcggcagc 120
30 cactaccgcg ccccttcgca cgtcccgcgc cactcccgcc gtctccgacg cgccgtcgtc 180
agcctgctc cgatggcctc gtcgacggct caggcccccg cgacggcgcc gccgggtctg 240
aaggagggca tcgcggggct gtacgacgag tcgtcggggc tgtgggagaa catctggggc 300
35 gaccacatgc accacggctt ctacgactcg agcagggccg cctccatggc cgatcaccgc 360
cgcgcccaga tccgcatgat cgaggaggcg ctgccttcg ccgggtgtcc agcctcagat 420
gatccagaga agacaccaa aacaatagtc gatgtcggat gtggcattgg tggtagctca 480
aggtacttgg cgaagaaata cggagcgcag tgcactggca ccacgttgag ccctgttcaa 540
40 gccgagagag gaaatgctct cgctgcagcg caggggttgt cggatcaggt tactctgcaa 600
gttctgatg ctctggagca accgtttcct gacgggcagt tcgatctggt gtggtccatg 660
gagagtggcg agcacatgcc ggacaagaga aagtttgta gtgagctagc acgcgtggcg 720
45 gtcctggag ggacaataat catcgtgaca tggtgccata ggaacctgga tccatccgaa 780
acctcgctaa agcccgatga actgagcctc ctgaggagga tatgcgacgc gtactacctc 840
cggactggt gctcacctc agactatgtg aacattgcc agtcactgtc tctcaggat 900
atcaagacag ctgactggtc ggagaacgtg gccccgtttt ggcccgcctg gataaaatca 960
50 gcgctaacat ggaagggtt cacctctctg ctgacgaccg gatggaagac gatcagaggc 1020
gcgatggtga tgccgctaata gatccagggc tacaagaagg ggctcatcaa attcaccatc 1080
atcacctgtc gcaagcctgg agccgcgtag gaggaggcca aggagcacia gttactagca 1140
55 caggcacagg agtgccaagt gcaataatgt agatccgtgg caccatcgcc gtctactcat 1200
ctatactgca ccaaaatcaa cattctccta ggacatgtta aataattttc tgccactcgt 1260
cgagatattt caaattcact gtccacaaaa aaaaaaaaaa a 1301
```

60 <210> 2

<211> 351

<212> PRT

65 <213> Maíz

ES 2 214 972 A1

<400> 2

Met Ala His Ala Ala Leu Leu His Cys Ser Gln Ser Ser Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Cys Arg Arg Gly Ser His Tyr Arg Ala Pro Ser His Val Pro
 20 25 30

Arg His Ser Arg Arg Leu Arg Arg Ala Val Val Ser Leu Arg Pro Met
 35 40 45

Ala Ser Ser Thr Ala Gln Ala Pro Ala Thr Ala Pro Pro Gly Leu Lys
 50 55 60

Glu Gly Ile Ala Gly Leu Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Leu Trp Glu Asn
 65 70 75 80

Ile Trp Gly Asp His Met His His Gly Phe Tyr Asp Ser Ser Glu Ala
 85 90 95

Ala Ser Met Ala Asp His Arg Arg Ala Gln Ile Arg Met Ile Glu Glu
 100 105 110

Ala Leu Phe Arg Gly Val Pro Ala Ser Asp Asp Pro Glu Lys Thr Pro
 115 120 125

Lys Thr Ile Val Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Tyr
 130 135 140

Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Ala Gln Cys Thr Gly Thr Thr Leu Ser Pro
 145 150 155 160

Val Gln Ala Glu Arg Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ala Gln Gly Leu Ser
 165 170 175

Asp Gln Val Thr Leu Gln Val Ala Asp Ala Leu Glu Gln Pro Phe Pro
 180 185 190

Asp Gly Gln Phe Asp Leu Val Trp Ser Met Glu Ser Gly Glu His Met
 195 200 205

Pro Asp Lys Arg Lys Phe Val Ser Glu Leu Ala Arg Val Ala Ala Pro
 210 215 220

Gly Gly Thr Ile Ile Ile Val Thr Trp Cys His Arg Asn Leu Asp Pro
 225 230 235 240

65

ES 2 214 972 A1

	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	Lys	Pro	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ile
					245					250					255	
5	Cys	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Cys	Ser	Pro	Ser	Asp	Tyr	Val
			260						265					270		
10	Asn	Ile	Ala	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Ile	Lys	Thr	Ala	Asp	Trp
			275						280					285		
15	Ser	Glu	Asn	Val	Ala	Pro	Phe	Trp	Pro	Ala	Val	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu
		290						295					300			
20	Thr	Trp	Lys	Gly	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Thr	Gly	Trp	Lys	Thr	Ile
	305						310					315				320
25	Arg	Gly	Ala	Met	Val	Met	Pro	Leu	Met	Ile	Gln	Gly	Tyr	Lys	Lys	Gly
					325					330					335	
30	Leu	Ile	Lys	Phe	Thr	Ile	Ile	Thr	Cys	Arg	Lys	Pro	Gly	Ala	Ala	
				340					345					350		

30 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Maíz

35

<400> 3

gaaatacgggacgcagtgca c

21

40 <210> 4

<211> 25

<212> ADN

<213> Maíz

45

<400> 4

gctccaggct tgcgacaggt gatga

25

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 214 972

② Nº de solicitud: 200300591

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/29, 15/82, 5/04, A01H 5/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KIM K. et al. "Cloning of Perilla gamma 1 tocopherol methyltransferase", 05.12.2001, EBI DATABASES [en línea] [recuperado el 04.05.2004] Accesion nº AF213481, Sequence identification AF213481.1	1-10,19-22
Y		16-18
X	SONG R. et al. "Sorghum bicolor clone BAC SB_BBc0234M12 php200725 orthologous region", 07.10.2002, EBI DATABASES [en línea] [recuperado el 04.05.2004] Accesion nº AF527809, Sequence version AF527809.1	1-10,19-22
Y		16-18
X	SONG R. et al. "Putative gamma-tocopherol methyltransferase", 01.10.2002, EBI DATABASES [en línea] [recuperado el 04.05.2004] Accesion nº Q8LJW6.	11-15
Y	SHINTANI D. et al. "Elevating the Vitamin E Content of Plants Through Metabolic Engineering", Science, 1998, 282, páginas 2098-2100.	16-18
A	SONG R. et al. "Mosaic Organization of Orthologous Sequences in Grass Genomes", Genome Res., 2002, 12 (10), páginas 1549-1555.	1-22
A	WO 03016482 A2 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 27.02.2003	1-22

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

31.05.2004

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1