



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 256 850**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **95938648 .3**
⑧⑥ Fecha de presentación : **05.12.1995**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0796912**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.1997**

⑤④ Título: **Nuevo gen de la lisina descarboxilasa y procedimiento para la producción de L-lisina.**

③⑩ Prioridad: **09.12.1994 JP 6-306386**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2006

⑦③ Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**
nº 15-1, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104, JP

⑦② Inventor/es: **Kikuchi, Yoshimi;**
Suzuki, Tomoko y
Kojima, Hiroyuki

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 256 850 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo gen de la lisina descarboxilasa y procedimiento para la producción de L-lisina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo gen de la lisina descarboxilasa de *Escherichia Coli*, apropiado para la descomposición de la L-lisina, un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen y/o otro gen de la lisina descarboxilasa conocido como gen *cadA*, y un procedimiento para la producción de L-lisina utilizando el microorganismo. Recientemente, aumenta activamente la demanda de L-lisina como aditivo alimentario.

Antecedentes de la invención

La lisina descarboxilasa, que cataliza una reacción para la producción de cadaverina mediante la descarboxilación de la L-lisina, se conoce como una enzima de *Escherichia Coli* que descompone la L-lisina. Se ha informado ya de una secuencia nucleótida de su gen denominado *cadA*, y de una secuencia de aminoácidos codificada por el gen (Meng, S. y Bennett, G. N., *J. Bacteriol.*, 174, 2659 (1992)). Existen dos informes para la lisina descarboxilasa codificada por un gen distinto que el *cadA* de *Escherichia Coli*, que describen que se detectó una tenue actividad en una cepa mutante de *Escherichia Coli* (Goldemberg, S.H., *J. Bacteriol.*, 141, 1428 (1980); Wertheimer, S.J. y Leifer, Z., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, 882 (1983)). Sin embargo, Goldemberg, S.H. informó respecto a esta actividad que la actividad enzimática disminuía en una cuantía de aproximadamente 30% después de un tratamiento con calor a 60°C durante 4 minutos, mientras que Wertheimer, S.J. *et al* informaron de que no se había observado dicho fenómeno. De acuerdo con esto, la presencia de la segunda lisina descarboxilasa es indeterminada.

Por otra parte, la L-lisina es producida mediante procedimientos conocidos que utilizan *Escherichia Coli*, que incluyen un procedimiento que comprende el cultivo de una cepa mutante resistente a un análogo de la lisina o de una cepa recombinante que alberga un vector con ácido desoxirribonucleico incorporado que transporta información genética importante para la biosíntesis de la L-lisina (Patente Japonesa abierta al público n° 56-18596). Sin embargo, no existen informes en absoluto respecto a la producción de la L-lisina utilizando un microorganismo que pertenezca al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen de la lisina descarboxilasa.

B. Lereverend *et al.*, *Proc. Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms*, 4 Meet., 1982, página 113, da a conocer un mutante de *Escherichia Coli* superproductor de lisina que transporta una mutación *cadA* que afecta a la actividad lisina-descarboxilasa, disminuyendo, por tanto, el catabolismo de la lisina.

K. Igarashi *et al.*, *J. Bacteriol.*, vol. 166, n° 1., 1986, páginas 128-124, da a conocer la presencia de dos tipos de actividad lisina descarboxilasa en *E. Coli*. Una es la lisina descarboxilasa inducible habitual y la otra es la ornitina descarboxilasa codificada por el gen *speC*.

40 **Exposición de la invención**

Un objetivo de la presente invención es obtener un nuevo gen de la lisina descarboxilasa de *Escherichia Coli*, crear un microorganismo productor de L-lisina que pertenezca al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen y/o el gen *cadA*, y proporcionar un procedimiento para la producción de L-lisina cultivando el microorganismo que pertenezca al género *Escherichia*.

Los objetivos de la presente invención son resueltos por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando estos inventores crearon una cepa de *Escherichia Coli* en la que se destruyó el gen *cadA* como un conocido gen de la lisina descarboxilasa, se descubrió que la cadaverina, como producto de descomposición de la L-lisina por la lisina descarboxilasa, se producía todavía en esta cepa microbiana. Por tanto, estos inventores convinieron que en *Escherichia Coli* debía estar presente una nueva lisina descarboxilasa, y que podría afectar en gran manera la producción fermentativa de L-lisina, utilizando un microorganismo que perteneciera al género *Escherichia*. Como resultado de ensayos para obtener la clonación del gen, estos inventores alcanzaron el éxito en la obtención de un nuevo gen de la lisina descarboxilasa distinto del gen *cadA*. Se descubrió asimismo que la actividad de descomposición de la L-lisina disminuyó notablemente o desapareció, y la productividad de la L-lisina mejoró significativamente restringiendo la expresión de este gen, y restringiendo la expresión del gen *cadA* en un microorganismo de *Escherichia Coli* productor de L-lisina. De este modo, se concluyó la presente invención.

Concretamente, la presente invención proporciona un nuevo gen que codifica la lisina descarboxilasa que se origina de *Escherichia Coli*. Este gen se ha denominado gen "ldc".

En otro aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que produce L-lisina con una disminución o desaparición de la actividad lisina descarboxilasa en las células.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de L-lisina, que comprende las etapas de cultivar en un medio líquido el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que se

ES 2 256 850 T3

ha descrito anteriormente, para permitir que se produzca la L-lisina y se acumule en un líquido de cultivo, pudiéndola recuperar.

El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que se ha descrito anteriormente incluye un microorganismo en el que la actividad de la lisina descarboxilasa en las células disminuye o desaparece por la expresión moderada (o restringida) del gen *ldc* y/o del gen *cadA*.

La presente invención se describirá detalladamente a continuación.

<1> Preparación del fragmento de ADN que contiene el nuevo gen de la lisina descarboxilasa

Un fragmento de ADN que contiene el nuevo gen de la lisina descarboxilasa (*ldc*) de la presente invención puede obtenerse de la manera siguiente, a partir de una cepa disponible de *Escherichia Coli*, por ejemplo, la cepa K-12 o de una cepa derivada de ella.

En primer lugar, el gen *cadA*, que es un gen conocido de la lisina descarboxilasa, se obtiene a partir del ADN cromosómico de la cepa W3110 que se origina de *Escherichia Coli* K-12 utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (al que en adelante se denominará "método PCR"). La secuencia nucleótida del gen *cadA*, y la secuencia de aminoácidos codificada por él, se muestran en SEC ID n° 5 y n° 6, respectivamente. Fragmentos de ADN que tienen secuencias similares al gen *cadA* son clonados a partir de una biblioteca de ADN cromosómico de *Escherichia Coli* W3110 según un procedimiento que utiliza un vector plasmídico o un vector fágico para confirmar si el nuevo gen de la lisina descarboxilasa está o no contenido en los fragmentos del ADN. La confirmación del hecho de que el gen objetivo está contenido, puede obtenerse según un procedimiento de hibridación Southern, utilizando una sonda preparada mediante el método PCR.

Del gen contenido en el fragmento de ADN, gen que se ha obtenido de esta forma, se determina su secuencia nucleótida de la siguiente manera. En primer lugar, el fragmento de ADN se une a un vector plasmídico que se replica autónomamente en células de *Escherichia Coli*, para preparar ADN recombinante que se introduce en células competentes de *Escherichia Coli*. Después de la obtención de un transformante, se cultiva en un medio líquido, recuperándose el ADN recombinante a partir de las células que proliferaron. De acuerdo con el procedimiento de Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463 (1977), se determina una secuencia nucleótida entera del fragmento de ADN contenido en el ADN recombinante recuperado. Se analiza la estructura del ADN para determinar las posiciones que existen del promotor, operador, secuencia SD, codón de iniciación, codón de finalización, marco abierto de lectura, etc.

El nuevo gen de la lisina descarboxilasa de la presente invención posee una secuencia de 1005-1007 ATG a 3141-3143 GGA de la secuencia nucleótida entera del fragmento de ADN que se muestra en SEC ID n°: 3 en el listado de secuencias. Este gen codifica la lisina descarboxilasa que posee una secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4 en el Listado de Secuencias. Se ha descubierto que la homología entre la nueva lisina descarboxilasa y la lisina descarboxilasa codificada por el gen *cadA* es del 69,4%.

El gen de la presente invención puede ser aquél que codifica la lisina descarboxilasa que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4 en el listado de secuencias, una secuencia nucleótida de la cual no está limitada a la secuencia nucleótida que se ha descrito anteriormente. La lisina descarboxilasa codificada por el gen de la presente invención puede tener sustituciones, deleciones, o inserciones de 3 aminoácidos o menos, en la secuencia de aminoácidos que se ha descrito anteriormente, sin un sustancial deterioro de la actividad de la lisina descarboxilasa. Los genes que codifican la lisina descarboxilasa que presenta dichas deleciones, inserciones o sustituciones, pueden obtenerse a partir de variantes, cepas mutantes espontáneas, o cepas mutantes artificiales de *Escherichia Coli*, o de microorganismos que pertenecen al género *Escherichia* distinto a *Escherichia Coli*. Los genes mutantes que codifican la lisina descarboxilasa que presenta deleciones, inserciones o sustituciones, pueden obtenerse asimismo llevando a cabo un tratamiento mutacional *in vitro*, o un tratamiento de mutagénesis dirigida para el gen que codifica la lisina descarboxilasa que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4. Estos tratamientos mutacionales pueden llevarse a cabo según los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia tal como se describe seguidamente.

Sin embargo, el gen que codifica la lisina descarboxilasa que presenta sustituciones, deleciones o inserciones de 3 o menos residuos aminoácidos, al que se hace alusión en la presente memoria, incluye el que se origina a partir del "gen *ldc*" y puede considerarse sustancialmente el mismo que el gen *ldc*. No se tiene la intención de ampliar el significado a aquellos genes que tienen orígenes diferentes. Se entenderá fácilmente por parte de los expertos en la materia que, por ejemplo, el gen *cadA* que codifica la proteína (que es) diferente en no menos de 200 residuos aminoácidos respecto a una que tenga la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4, es distinto del gen de la presente invención, y los genes que codifican las proteínas que muestran una actividad lisina descarboxilasa equivalente, se incluyen en la presente invención, incluso si son distintos del que posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4, con respecto a dos o tres residuos aminoácidos.

ES 2 256 850 T3

<2> Creación de un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen de la lisina descarboxilasa

5 El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* de la presente invención es un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* en el que la actividad de la lisina descarboxilasa en las células ha disminuido o desaparecido. El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* incluye *Escherichia Coli*. La actividad de la lisina descarboxilasa en las células ha disminuido o desaparecido, por ejemplo, moderando la expresión de cualquiera o de los dos nuevos genes de la lisina descarboxilasa (*ldc*) y del gen *cadA* conocido que se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la actividad de la lisina descarboxilasa en las células puede asimismo disminuir o desaparecer mediante
10 la disminución o desaparición de las actividades específicas de las enzimas lisina descarboxilasa codificadas por estos genes, modificando la estructura de las enzimas.

Los medios para moderar la expresión del gen *ldc* y del gen *cadA* conocido, incluyen, por ejemplo, un procedimiento para moderar la expresión de los genes a nivel transcripcional, provocando la sustitución, delección, inserción,
15 adición o inversión de uno o de varios de los nucleótidos en las secuencias promotoras de estos genes, y disminuyendo las actividades del promotor (M. Rosenberg y D. Court, *Ann. Rev. Genetics* 13 (1979), pág 319, y P. Youderian, S. Bouvier y M. Susskind, *Cell* 30 (1982) pág 843-853). Alternativamente, la expresión de estos genes puede moderarse a nivel traduccional provocando la sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o de varios de los nucleótidos en una región entre una secuencia SD y un codón de iniciación (J.J. Dunn, E. Buzash-Pollert y F.W. Studier,
20 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75 (1978), pág 2743). Además, para que disminuya o desaparezca la actividad específica de la enzima lisina descarboxilasa, está disponible un procedimiento, en el que la región codificante del gen de la lisina descarboxilasa es modificada o anulada provocando la sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o de varios de los nucleótidos en una secuencia nucleótida en la región codificante.

25 Los genes en los cuales se permite que tenga lugar la sustitución, delección, inserción, adición o inversión, pueden ser los genes *ldc* o los genes *cadA* que presentan sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o de varios residuos aminoácidos que no provocan el deterioro de la actividad sustancial de la lisina descarboxilasa codificada, además del gen *ldc* o del gen *cadA*.

30 El procedimiento para provocar la sustitución, delección, inserción, adición o inversión en el gen, incluye específicamente un procedimiento de mutagénesis dirigida (Kramer, W. y Frits, H.J., *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987)), y un procedimiento de tratamiento utilizando un agente químico tal como el hiposulfito sódico y la hidroxilamina (Shortle, D. y Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 270 (1978)).

35 El procedimiento de mutagénesis dirigida es un procedimiento que utiliza un oligonucleótido sintético, que es una técnica para permitir la introducción de una sustitución, delección, inserción, adición o inversión opcionales en un par de nucleótidos limitado y opcional. Para utilizar este procedimiento, se prepara en primer lugar un filamento monocatenario, desnaturalizando un plásmido que posee un gen diana clonado con una determinada secuencia nucleótida de ADN. A continuación, se sintetiza un oligonucleótido sintético complementario a una parte que se tiene la intención
40 de que cause la mutación. Sin embargo, en este procedimiento, no se deja que el oligonucleótido sintético posea una secuencia completamente complementaria, sino que es diseñado para que presente una sustitución, delección, inserción, adición o inversión nucleótida opcional. Después de esto, el ADN monocatenario se hibridiza con el oligonucleótido sintético que tiene la sustitución, delección, inserción, adición o inversión nucleótida opcional. Un plásmido bicatenario completo se sintetiza utilizando la T4 ligasa y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, el cual plásmido se introduce en células competentes de *Escherichia Coli*. Algunos de los transformantes así obtenidos poseen un plásmido
45 que contiene un gen en el que se fija la sustitución, delección, inserción, adición o inversión opcional. Como un procedimiento similar, capaz de introducir la mutación en un gen, para llevar a cabo una modificación o una destrucción, puede mencionarse un método de PCR recombinante (*PCR Technology*, Stockton Press (1989)).

50 El procedimiento para utilizar el agente químico es un procedimiento en el que la mutación que presenta la sustitución, delección, inserción, adición o inversión de los nucleótidos, se introduce al azar en un fragmento de ADN, tratando directamente el fragmento de ADN que contiene un gen diana con hiposulfito sódico, hidroxilamina o un análogo.

55 La expresión del gen *ldc* y/o el gen *cadA* en las células puede moderarse sustituyendo un gen normal en el cromosoma de un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con el gen modificado o destruido, obtenido introduciendo la mutación, tal como se ha descrito anteriormente. El procedimiento para sustituir el gen incluye procedimientos que utilizan la recombinación homóloga (*Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972); Matsuyama, S. y Mizushima, S., *J. Bacteriol.*, 162, 1196 (1985)). La recombinación homóloga
60 se basa en la capacidad que posee generalmente el microorganismo que pertenece al género *Escherichia*. Cuando un plásmido o análogo que presenta homología con una secuencia en el cromosoma, se introduce en las células, tiene lugar la recombinación con una cierta frecuencia en un lugar de la secuencia que presenta la homología, y la totalidad del plásmido que se ha introducido, se incorpora al cromosoma. Después de esto, si tiene lugar una recombinación posterior en el lugar de la secuencia que presenta la homología en el cromosoma, el plásmido se suelta otra vez del cromosoma. Sin embargo, durante este proceso, el gen con la mutación que se ha introducido se fija preferentemente
65 en el cromosoma, dependiendo de la posición a la que la recombinación tiene lugar, y, junto con el plásmido, un gen normal original se suelta del cromosoma. La selección de dichas cepas microbianas hace posible obtener una cepa microbiana en la que el gen normal en el cromosoma es sustituido con el gen modificado o destruido obtenido mediante

la introducción de la mutación que presenta la sustitución, delección, inserción, adición o inversión de los nucleótidos.

El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* y que va a someterse a la sustitución génica, es un microorganismo que produce L-lisina. El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que produce L-lisina, por ejemplo, una cepa microbiana de *Escherichia Coli*, puede obtenerse aplicando un tratamiento mutacional a una cepa que no produce L-lisina, para proporcionarle resistencia a un análogo de la lisina tal como S-(-2-aminoetil)-L-cisteína (a la que se alude de aquí en adelante como "AEC"). Los procedimientos para el tratamiento mutacional incluyen procedimientos en los que las células de *Escherichia Coli* se someten a un tratamiento con un agente químico tal como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y el ácido nitroso, o un tratamiento con irradiación de luz ultravioleta, radiación o análogos. Dicha cepa microbiana, incluye específicamente *Escherichia Coli* AJ13069 (FERM P-14690). Esta cepa microbiana se crió proporcionando resistencia mediante AEC a la cepa W3110 originaria de *Escherichia Coli* K-12. La *Escherichia Coli* AJ13069 se depositó en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibarakiken, Japón), con el número de registro FERM P-14690 el 6 de diciembre de 1994, y se transfirió a un depósito internacional basado en el Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995, con un número de registro FERM BP-5252.

La cepa microbiana de *Escherichia Coli* que produce L-lisina puede asimismo criarse introduciendo y potenciando el ADN que transporta la información genética pertinente para la biosíntesis de la L-lisina mediante la tecnología de la recombinación genética. Los genes que van a introducirse son genes que codifican enzimas de la vía biosintética de la L-lisina, tales como aspartoquinasa, dihidrodipicolinatosintetasa, dihidrodipicolinato reductasa, succinildiaminopimelato transaminasa, y succinildiaminopimelato deacilasa. En el caso de un gen de la enzima que experimenta retroinhibición por la L-lisina, tal como la aspartoquinasa y la dihidrodipicolinato sintetasa, es deseable utilizar un gen de tipo mutante que codifique una enzima que esté desensibilizada de dicha inhibición. Para introducir y potenciar el gen, está disponible un procedimiento, en el que el gen se une a un vector capaz de replicarse autonomamente en las células de *Escherichia Coli* para preparar ADN recombinante con el cual se transforma *Escherichia Coli*. Alternativamente, el gen puede asimismo incorporarse al cromosoma de un huésped según un procedimiento para utilizar la transducción, un transposón (Berg, D. E. y Berg, C.M., *Bio/Technol.*, 1, 417 (1983)), el fago Mu (Patente Japonesa abierta al público n° 2-109985), o la recombinación homóloga (*Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. (1972)).

Otros procedimientos para obtener el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con la función del gen anulada, incluyen un procedimiento para provocar una mutación genética aplicando un tratamiento con un agente químico tal como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y el ácido nitroso, o un tratamiento con irradiación de luz ultravioleta, radiación o análogos, perteneciendo las células del microorganismo al género *Escherichia* que posee el gen.

En el Ejemplo que se describe más adelante, se creó una cepa de *Escherichia Coli* con la función anulada del gen de la lisina descarboxilasa, suprimiendo una parte de su región codificante e insertando un gen drogo-resistente en vez de ella, para obtener un gen de la lisina descarboxilasa que se utilizó para substituir un gen de la lisina descarboxilasa en el cromosoma de *Escherichia Coli*, según el procedimiento que utiliza la recombinación homóloga, descrito anteriormente.

Es posible moderar la expresión de cualquiera de los nuevos genes de la lisina descarboxilasa de la presente invención y del gen *cadA*, o moderar la expresión de los dos, en una cepa microbiana. La expresión del gen de la lisina descarboxilasa puede moderarse en el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que produce L-lisina, o puede proporcionarse la producción de L-lisina al microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen de la lisina descarboxilasa, según el procedimiento descrito anteriormente.

<3> Producción de L-lisina utilizando un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con expresión moderada del gen de la lisina descarboxilasa

Una cantidad considerable de L-lisina se produce y se acumula en un cultivo líquido, cultivando el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con una expresión moderada del gen de la lisina descarboxilasa obtenida tal como se ha descrito anteriormente. La cantidad acumulada de L-lisina aumenta sólo moderando la expresión del gen conocido *cadA*. Sin embargo, para aumentar la cantidad acumulada de L-lisina, es más efectivo moderar la expresión del nuevo gen de la lisina descarboxilasa de la presente invención. El resultado más preferido para la producción de L-lisina se obtiene utilizando una cepa microbiana en la que la expresión, tanto del gen *cadA* como del nuevo gen de la presente invención, se moderen.

El medio a utilizar para la producción de L-lisina es un medio ordinario que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos, y opcionalmente, otras fuentes de nutrientes orgánicos traza. Como fuente de carbono, es posible utilizar azúcares tales como glucosa, lactosa, galactosa, fructosa, e hidrolizado de almidón; alcoholes, tales como glicerol y sorbitol; y ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido cítrico, y ácido succínico. Como fuente de nitrógeno, es posible utilizar sales amónicas inorgánicas tales como sulfato amónico, cloruro amónico, y fosfato amónico; fuentes nitrogenadas orgánicas, tales como hidrolizado de soja; gas amoníaco; y amoníaco líquido. Como iones inorgánicos, fosfato potásico, sulfato magnésico, iones de hierro, iones de manganeso, etc, se añaden en pequeñas cantidades. Además de lo anterior, es deseable que se contengan vitamina B, extracto de levadura o análogos, en cantidades apropiadas, como fuentes de nutrientes orgánicos traza.

ES 2 256 850 T3

El cultivo se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones aeróbicas durante 16-72 horas aproximadamente. La temperatura del cultivo se controla entre 30 y 45°C, y el pH se controla entre 5 y 7 durante el cultivo. Para ajustar el pH, pueden utilizarse sustancias inorgánicas y orgánicas, ácidas o alcalinas, o gas amoníaco, o análogos.

- 5 Después de la finalización del cultivo, se puede llevar a cabo convenientemente la recuperación de la L-lisina a partir de un licor fermentado, combinando un procedimiento ordinario mediante una resina intercambiadora de iones, un procedimiento de precipitación y otros procedimientos conocidos.

Descripción breve de los dibujos

10 La Fig 1 muestra una estructura de un plásmido pUC6F5HH5 que contiene el nuevo gen de la lisina descarboxilasa.

La Fig 2 muestra una estructura de un plásmido pTS6F5HH5 termosensible, que contiene el nuevo gen de la lisina descarboxilasa, y la construcción de un plásmido pTS6F5HH5Cm, en el que una parte del gen se sustituye con un fragmento que contiene un gen de resistencia al cloranfenicol.

15 La Fig 3 muestra la comparación de las actividades de descomposición de la L-lisina en una cepa WC196 que alberga un gen normal de la lisina descarboxilasa, y las cepas WC196C, WC196L y WC196LC con los genes de la lisina descarboxilasa destruidos.

20 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

La presente invención se explicará más específicamente a continuación haciendo referencia a los Ejemplos.

25 Ejemplo 1

(1) Clonación del nuevo gen de la lisina descarboxilasa

Se extrajo ADN cromosómico según un procedimiento ordinario a partir de las células de la cepa W3110 de *Escherichia Coli* K-12 obtenidas del National Institute of Genetics (Yata 1111, Mishima-shi, Shizuoka-ken, Japón). Por otra parte, se sintetizaron dos iniciadores de ADN tal como se muestran en SEC ID n°: 1 y n° 2 en el listado de secuencias, según un procedimiento ordinario que se basa en la secuencia nucleótida del gen *cadA* (véase SEC ID n°: 5) que se describe en Meng, S. y Bennett, G.N., *J. Bacteriol*, 174, 2659 (1992). Tenían secuencias homólogas a una parte corriente arriba del extremo 5' y a una parte terminal del extremo 3' del gen *cadA*, respectivamente. El ADN cromosómico y los iniciadores de ADN se utilizaron para llevar a cabo un método PCR, según el procedimiento de Erlich *et al.* (*PCR Technology*, Stockton Press (1989)). De este modo, se obtuvo un fragmento de ADN de 2,1 kpb que contenía casi la totalidad del gen *cadA*. Este fragmento se marcó con un Equipo de Marcaje al Azar del Iniciador (producido por Takara Shuzo) y [α -³²P]dCTP (producido por Amersham Japan) para preparar una sonda para la hibridización.

40 A continuación, se llevó a cabo la hibridización según un procedimiento ordinario (*Molecular Cloning* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), utilizando la sonda preparada y la Membrana de Elaboración de mapas Génicos/*Escherichia Coli* (producida por Takara Shuzo). A la Membrana de Elaboración de mapas Génicos/*Escherichia Coli* (producida por Takara Shuzo), se absorbió una biblioteca de Kohara *et al.* (biblioteca del fago lambda del ADN cromosómico de *Escherichia Coli*): véase Kohara, Y *et al. Cell*, 50, 495-508 1987). Se rastrearon los clones del fago lambda que tenían secuencias similares al gen *cadA*, suavizando las condiciones para el lavado de la sonda (2 x SSC, 55°C, 30 minutos), cuando se llevó a cabo la hibridización. Como resultado, se logró encontrar señales débiles de tres clones de E2B8, 6F5H y 10F9, además de las señales intensas de los clones que contenían la región (21H11, 5G7) del gen *cadA*. Las secuencias de la inserción de los tres clones del fago lambda de E2B8, 6F5H y 10F9, continúan en el cromosoma de *Escherichia Coli*, aunque se solapan entre ellas. De este modo, el ADN de 6F5H del fago lambda que pertenece a la biblioteca de Kohara *et al.* (Kohara, Y *et al. Cell*, 50, 495-508 (1987), se separó según un procedimiento ordinario, el cual fue digerido con varios enzimas de restricción, para llevar a cabo la hibridización de la transferencia Southern utilizando la sonda descrita anteriormente según un procedimiento similar al descrito anteriormente. Como resultado, se reveló que en un fragmento de ADN de aproximadamente 5 kbp obtenido mediante digestión con *HindIII*, se encontraba presente una secuencia similar al gen *cadA*.

55 De este modo, el fragmento de aproximadamente 5kbp obtenido mediante digestión del ADN de 6F5H del fago lambda con *HindIII* se unió con el digesto *HindIII* de un plásmido pUC19 (producido por Takara Shuzo) utilizando la T4 ADN ligasa. Esta mezcla reactiva se utilizó para transformar *Escherichia Coli* JM109 (producida por Takara Shuzo) para obtener cepas resistentes a la ampicilina que se hicieron crecer en un medio completo (que contenía 10 g de polipeptona, 5 g de extracto de levadura, y 5 g de cloruro sódico en 1 L de agua) que se añadió con 50 mg/mL de ampicilina. Se obtuvo entonces a partir de ello una cepa microbiana que albergaba un plásmido con la inserción del fragmento de aproximadamente 5 kbp obtenido mediante digestión del ADN de 6F5H del fago lambda con *HindIII*. Se extrajo un plásmido de sus células, obteniéndose un plásmido pUC6F5HH5. La Fig 1 muestra una estructura del plásmido pUC6F5HH5.

65 La *Escherichia Coli* JM109/pUC6F5HH5 que albergaba este plásmido se denominó como AJ13068, que se depositó en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology

ES 2 256 850 T3

con el número de registro FERM P-14689 el 6 de diciembre de 1994, y se transfirió a un depósito internacional basado en el Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995, con un número de registro FERM BP-5251.

(2) Determinación de la secuencia nucleótida del nuevo gen de la lisina descarboxilasa

5 Se determinó una secuencia nucleótida de una región entre los sitios de restricción enzimática de *Cla*I y *Hind*III del pUC6F5HH5 obtenido, según un procedimiento descrito en *Molecular Cloning* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Como resultado, se reveló que la secuencia nucleótida que se muestra en SEC ID n°: 3 en el listado de secuencias, estaba codificada. Esta secuencia de ADN contiene un marco de lectura abierto que codifica la
10 secuencia de aminoácidos que se muestra en SEC ID n°: 4 en el listado de secuencias.

(3) Preparación de *Escherichia Coli* con producción de L-lisina

15 La *Escherichia Coli* W3110 se cultivó a 37°C durante 4 horas en un medio completo (que contenía 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, y 5 g de cloruro sódico en 1 L de agua) para obtener células microbianas que se sometieron a tratamiento mutacional a 37°C durante 30 minutos en una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a una concentración de 200 µg/ml, lavándose después, y aplicándose entonces en un medio mínimo de placa (que contenía 7 g de hidrogenofosfato disódico, 3 g de dihidrogenofosfato potásico, 1 g de cloruro amónico, 0,5 g de cloruro
20 sódico, 5 g de glucosa, 0,25 g de sulfato magnésico heptahidratado, y 15 g de agar en 1 L de agua; añadiéndose 5 g/L de AEC. Las cepas resistentes a AEC se obtuvieron separando las colonias que aparecieron después del cultivo a 37°C durante 48 horas. La cepa WC196, como una cepa entre ellas, producía L-lisina. La cepa WC196 se denominó como AJ13069, y se depositó en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology con el número de registro FERM P-14690 el 6 de diciembre de 1994, y se transfirió a un depósito internacional basado en el Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995, con un número de registro FERM
25 BP-5252.

(4) Creación de la cepa WC196 con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa

30 El fragmento de aproximadamente 5 kbp obtenido mediante digestión del ADN de 6F5H del fago lambda con *Hind*III, descrito anteriormente, se unió con un digesto *Hind*III de un plásmido pMANO31 termosensible (Yasueda, H. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 211 (1991)), utilizando la T4 ADN ligasa. Esta mezcla reactiva se utilizó para transformar *Escherichia Coli* JM109, seguido por el cultivo a 37°C durante 24 horas en un medio completo de placa al que se añadieron 50 mg/L de ampicilina para que se desarrollaran cepas resistentes a la ampicilina. Se obtuvo entonces una cepa microbiana, que albergaba un plásmido con la inserción del fragmento de aproximadamente 5 kbp
35 obtenido mediante digestión del ADN de 6F5H del fago lambda con *Hind*III. Se extrajo un plásmido de las células de esta cepa, obteniéndose un plásmido pTS6F5HH5. El plásmido pTS6F5HH5 se sometió a digestión con *Eco*RV para eliminar un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kbp. A continuación, se utilizó T4 ligasa para insertar un fragmento que contenía un gen de resistencia al cloranfenicol de aproximadamente 1 kbp obtenido mediante digestión de pHSG399 (producido por Takara Shuzo) con *Acc*I. De este modo, se construyó un plásmido ppTS6F5HH5Cm. Como resultado de la operación descrita anteriormente, se logró la construcción del plásmido que posea un fragmento
40 de ADN con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa. La Fig 2 muestra una estructura del plásmido pTS6F5HH5, y del plásmido pTS6F5HH5Cm.

45 A continuación, se creó una cepa, en la que el nuevo gen de la lisina descarboxilasa en el cromosoma de la cepa WC196 se sustituyó con el fragmento de ADN con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa, de acuerdo con una técnica general de recombinación homóloga (Matsuyama, S. y Mizushima, S., *J. Bacteriol.*, 162, 1196 (1985)), utilizando la propiedad de termosensibilidad del plásmido pTS6F5HH5Cm. Concretamente, la cepa WC196 se transformó con el plásmido pTS6F5HH5Cm para obtener en primer lugar una cepa que fuera resistente a la ampicilina y resistente al cloranfenicol a 300°C. A continuación, esta cepa se utilizó para obtener una cepa que fuera resistente
50 a la ampicilina y resistente al cloranfenicol a 420°C. Posteriormente, esta cepa se utilizó para obtener una que fuera sensible a la ampicilina y resistente al cloranfenicol a 300°C. De este modo, se creó la cepa tal como se ha descrito anteriormente, en la que el nuevo gen de la lisina descarboxilasa en el cromosoma de la cepa WC196 fue sustituido con el fragmento de ADN con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa. Esta cepa se denominó
55 cepa WC196L.

(5) Creación de la cepa WC196 y de la cepa WC196L con deficiencia del gen *cadA*

60 *Escherichia Coli*, en la que el gen *cadA* como gen conocido de la lisina descarboxilasa es anulado, es ya conocida, incluyendo, por ejemplo, a la cepa GNB10181 que se origina de *Escherichia Coli* K-12 (véase Auger, E.A. *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 3, 609 (1989); esta cepa microbiana está disponible a partir, por ejemplo, del Genetic Stock Center de *E. Coli* (Connecticut, USA)). Se ha desvelado que en esta cepa microbiana, la región del gen *cadA* es deficiente. Así, el carácter deficiente del gen *cadA* de la cepa GNB10181 se transdujo a la cepa WC196 según un procedimiento general, utilizando el fago P1 (*A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992)) para crear
65 la cepa WC196C. La deficiencia del gen *cadA* de la cepa WC196 se confirmó mediante hibridización de transferencia Southern. Además, se creó la cepa WC196LC con deficiencia del gen *cadA* a partir de la cepa WC196L según un procedimiento similar al descrito anteriormente.

ES 2 256 850 T3

Ejemplo 2

(1) Confirmación de las actividades de descomposición de la L-lisina de las cepas WC196, WC196C, WC196L y WC196LC

Las cuatro cepas creadas que se describen anteriormente se cultivaron a 37°C durante 17 horas utilizando un medio para la producción de L-lisina (que contenía 40 g de glucosa, 16 g de sulfato amónico, 1 g de dihidrogenofosfato potásico, 2 g de extracto de levadura, 10 mg de sulfato de manganeso tetra a pentahidratado, y 10 mg de sulfato férrico heptahidratado en 1 l de agua; se ajustó el pH a 7 con hidróxido potásico, añadiendo entonces 30 g de carbonato cálcico esterilizado separadamente). Las células microbianas recuperadas se lavaron dos veces con una solución salina fisiológica, se suspendieron en un medio para ensayar la descomposición de la lisina (que contenía 17 g de hidrogenofosfato disódico dodeca-hidratado, 3 g de dihidrogenofosfato potásico, 0,5 g de cloruro sódico, y 10 g de clorhidrato de L-lisina en 1 l de agua), cultivándose a 37°C durante 31 horas.

La Fig 3 muestra cambios en las cantidades de la L-lisina que quedan en el líquido de cultivo, a lo largo del tiempo. La cantidad de L-lisina se determinó cuantitativamente utilizando un Analizador Biotech AS-210 (producido por Asahi Chemical industry). En la cepa WC196 se observó una descomposición significativa de la L-lisina. Sin embargo, la actividad de descomposición disminuyó un poco en la cepa WC196C con deficiencia del gen *cadA*, como gen conocido de la lisina descarboxilasa. La descomposición de la L-lisina no se observó en las cepas WC196L y WC196LC con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa. La L-lisina que permanecía en el líquido del cultivo disminuyó durante un tiempo de hasta 3 horas del cultivo en cualquiera de las cepas microbianas. Sin embargo, este fenómeno fue causado por la incorporación de la L-lisina en las células microbianas, y no por la descomposición.

(2) Producción de L-lisina por las cepas WC196, WC196C, WC196L y WC196LC

Las cuatro cepas descritas anteriormente se cultivaron a 37°C durante 20 horas en el medio para la producción de L-lisina descrito anteriormente. Se midieron las cantidades de L-lisina y de cadaverina producidas y acumuladas en el líquido del cultivo. La cantidad de L-lisina se determinó cuantitativamente utilizando el Analizador Biotech As-210 tal como se ha descrito anteriormente. La cantidad de cadaverina se determinó cuantitativamente utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

Los resultados se muestran en la tabla 1. La acumulación de L-lisina aumentó, y la acumulación de cadaverina como producto de descomposición de la L-lisina, disminuyó en la cepa WC196C con destrucción del gen *cadA*, comparado con la cepa WC196 y la cepa WC196L con la función anulada del nuevo gen de la lisina descarboxilasa, comparado con las cepas WC196 y WC196C. La acumulación de L-lisina aumentó posteriormente, y la acumulación de cadaverina como producto de descomposición de la L-lisina no se detectó en la cepa WC196LC con la función anulada de ambos genes de la lisina descarboxilasa.

TABLA 1

Cepa microbiana	Acumulación de lisina(g/L)	Acumulación de cadaverina (g/L)
WC196	1,4	0,6
WC196C	1,9	0,4
WC196L	2,3	0,1
WC196LC	3,3	no detectada

Ejemplo 3

La *Escherichia Coli* WC196LC en la que la actividad de descomposición de la L-lisina había desaparecido, se transformó con pUC6F5HH5 que contenía el nuevo gen de la lisina descarboxilasa para obtener una cepa resistente a la ampicilina. La cepa WC196LC y la cepa WC196LC/pUC6F5HH5 se cultivaron a 37°C durante 16 horas en un medio para la producción de L-lisina al que se habían añadido 5 g/L de L-lisina, midiéndose la cantidad de cadaverina producida.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. La cepa WC196LC no consiguió convertir la L-lisina a cadaverina, mientras que la cepa WC196LC/pUC6F5HH5 mostró la capacidad de convertir la L-lisina a cadaverina.

TABLA 2

Cepa microbiana	Cantidad producida de cadaverina (g/L)
WC196LC	no detectada
WC196LC/pUC6F5HH5	0,93

Aplicación industrial

El nuevo gen de la lisina descarboxilasa de la presente invención participa en la descomposición de la L-lisina en *Escherichia Coli*. La L-lisina puede producirse eficientemente y de modo barato cultivando la bacteria que pertenece al género *Escherichia* que produce la L-lisina con una expresión moderada del gen descrito anteriormente y/o del gen *cadA*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Gen que codifica la lisina descarboxilasa que posee una secuencia de aminoácidos que se define en los apartados (A) o (B) siguientes:

(A) una secuencia de aminoácidos representada en SEC ID n°: 4,

10 (B) una secuencia de aminoácidos que presenta sustitución, delección o inserción de 3 residuos aminoácidos o menos en la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID n°: 4 en el listado de secuencias y que posee actividad lisina descarboxilasa.

2. Gen según la reivindicación 1, en el que el gen posee una secuencia nucleótida desde el nucleótido 1005° al 3143° representada en SEC ID n°: 3.

15 3. Fragmento de ADN que contiene un gen según la reivindicación 1 ó 2.

20 4. Procedimiento para que disminuya o desaparezca la actividad de la lisina descarboxilasa codificada por el gen según la reivindicación 1 ó 2, en el que el gen según la reivindicación 1 ó 2 se modifica por sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o de una pluralidad de nucleótidos en una secuencia nucleótida en el gen.

25 5. Microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, en el que el gen según la reivindicación 1 ó 2, una secuencia promotora del gen o una región entre una secuencia SD y un codón de iniciación del gen, es modificada por sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o una pluralidad de nucleótidos en la secuencia nucleótida del gen, la secuencia promotora o la región entre una secuencia SD y un codón de iniciación, por lo que disminuye o desaparece en las células la actividad de una lisina descarboxilasa codificada por el gen.

6. Microorganismo según la reivindicación 5, en la que dicho microorganismo es *Escherichia Coli*.

30 7. Microorganismo según la reivindicación 5 ó 6, en el que el gen *cadA* que codifica la lisina descarboxilasa que posee la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID n°: 6, una secuencia promotora del gen *cadA* o una región entre una secuencia SD y un codón de iniciación del gen *cadA*, son modificados por sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o una pluralidad de nucleótidos en la secuencia nucleótida del gen *cadA*, la secuencia promotora del gen *cadA* o la región entre una secuencia SD y un codón de iniciación del gen *cadA*, por lo que disminuye o desaparece adicionalmente la actividad de una lisina descarboxilasa codificada por el gen *cadA*.

35 8. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 y 7, que pertenece al género *Escherichia* y presenta la capacidad de producir L-lisina.

40 9. Procedimiento para la producción de L-lisina, que comprende la etapa de cultivo de un microorganismo según la reivindicación 8 en un medio líquido.

45

50

55

60

65

FIG. 1

**Edición determinada por la
secuencia nucleótida**

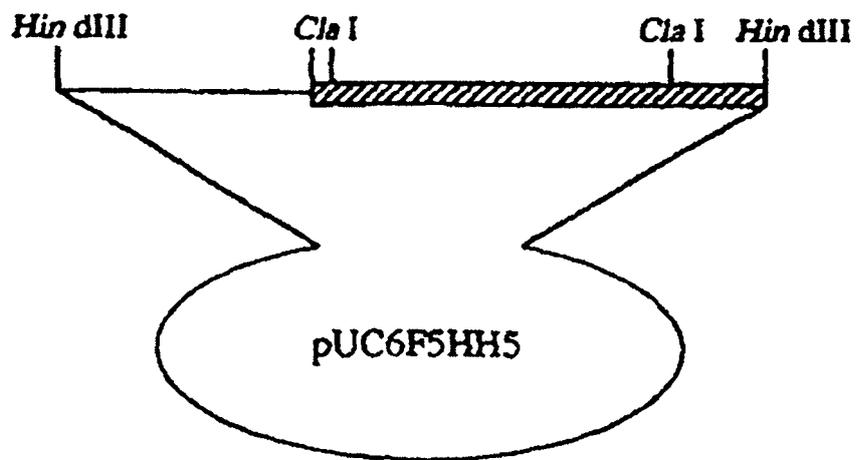
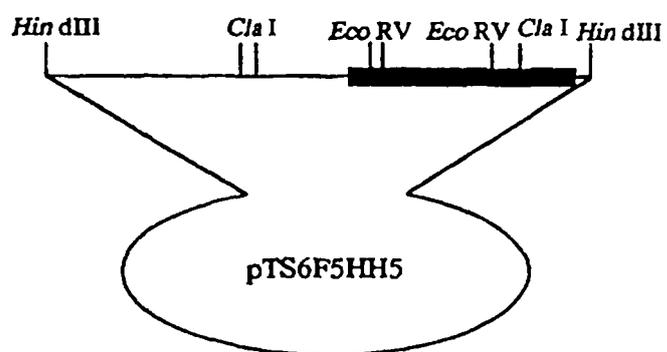


FIG. 2

Región que codifica la nueva lisina
descarboxilasa



↓ Sometido a digestión con EcoRV
 ↓ Fragmento del gen de la resistencia al
 cloranfenicol obtenido mediante la
 digestión de pHSG399 con AccI
 ↓ Unido con T4 ligasa

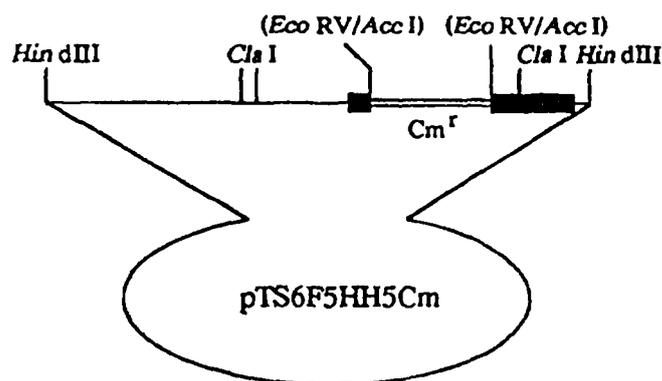
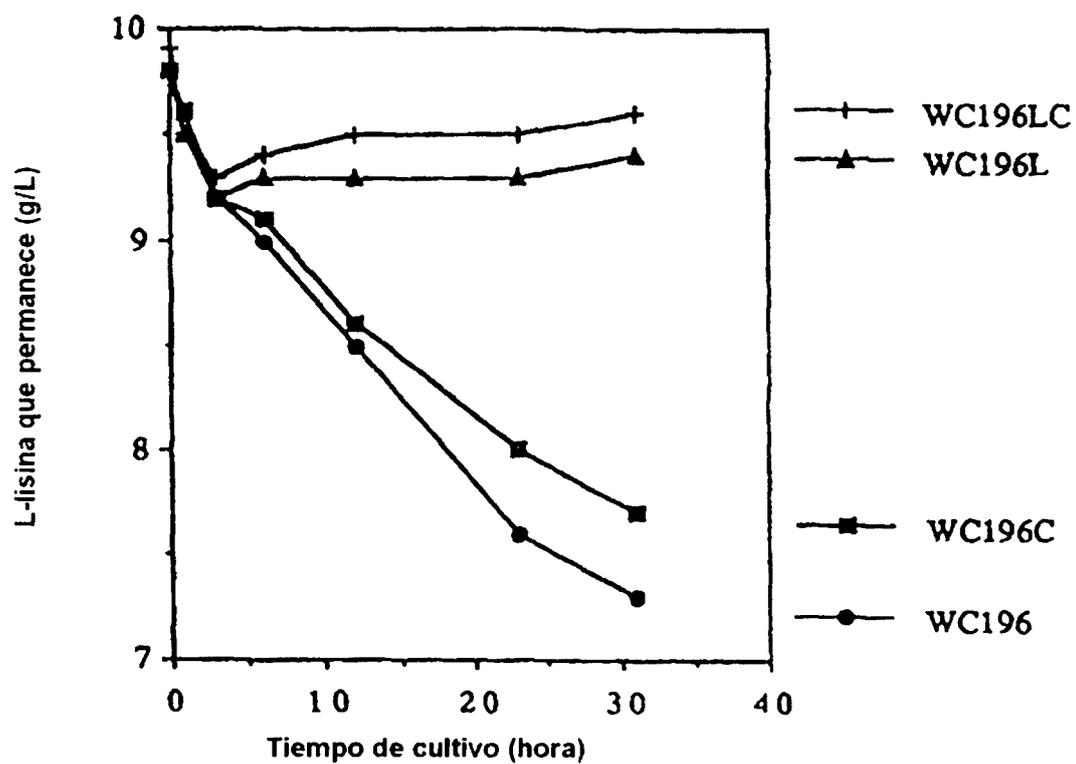


FIG. 3



ES 2 256 850 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: AJINOMOTO Co., Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: NUEVO GEN DE LA LISINA DESCARBOXILASA Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR LA L-LISINA
- 10 (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 6
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA
- (A) DESTINATARIO: Ajinomoto Co., Ltd.
- 15 (B) CALLE: 15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
- (C) CIUDAD: Tokyo 104
- (D) ESTADO:
- (E) PAÍS: Japón
- 20 (F) CP:
- (v) MEDIO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- 25 (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: FastSEC Versión 1.5
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NUMERO DE SOLICITUD: 95 938 648.3
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 05.12.95
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NUMERO DE SOLICITUD: 6-306386
- 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09.12.94
- (viii) DATOS DEL APODERADO/AGENTE DE INFORMACIÓN:
- (A) NOMBRE: Strehl Schübel-Hopf Groening & Partner
- 45 (B) NUMERO DE REGISTRO: 94
- (ix) INFORMACIÓN DE CONTACTO: EPN-43688
- (A) TELÉFONO: [49] (89)223911
- (B) FAX: [49] (89) 22 39 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- 55 (A) LONGITUD: 20 bases
- (A) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE FILAMENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc= "ADN sintético"
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 65 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

ES 2 256 850 T3

(v) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

TGGATAACCA CACCGCGTCT

20

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 20 bases

(A) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE FILAMENTO: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc: "ADN sintético"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: SI

(v) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

25

GGAAGGATCA TATTGGCGTT

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 3269 pares de bases

(A) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE FILAMENTO: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

40

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Escherichia Coli*

(B) CEPA: W3110

45

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CÓDIGO: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1005..3143

50

55

60

65

ES 2 256 850 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

	ATCGATTCTC	TGA	CTG	CGGT	TAGCCGTCAG	GATGAGAAAC	TGGATATTAA	CATCGATGAA		60							
5	GAAGTGCATC	GTCTGCGTGA	AAAAAGCGTA	GA	ACTGACAC	GTAAAATCTT	CGCCGATCTC			120							
	GGTGCATGGC	AGATTGCGCA	ACTGGCACGC	CATCCACAGC	GTCCTTATAC	CCTGGATTAC				180							
	GTTGCGCTGG	CATTTGATGA	ATTTGACGAA	CTGGCTGGCG	ACCGCGCGTA	TGCAGACGAT				240							
	AAAGCTATCG	TCGGTGGTAT	CGCCCGTCTC	GATGGTCGTC	CGGTGATGAT	CATTGGTCAT				300							
	CAAAAAGGTC	GTGAAACCAA	AGAAAAAATT	CGCCGTA	ACT	TTGGTATGCC	AGCGCCAGAA			360							
10	GGTTACCGCA	AAGCACTGCG	TCTGATGCAA	ATGGCTGAAC	GCTTTAAGAT	GCCTATCATC				420							
	ACCTTTATCG	ACACCCCGGG	GGCTTATCCT	GGCGTGGGCG	CAGAAGAGCG	TGGTCAGTCT				480							
	GAAGCCATTG	CACGCAACCT	GCGTGAAATG	TCTCGCCTCG	GCGTACCGGT	AGTTTGTACG				540							
	GTTATCGGTG	AAGGTGGTTC	TGGCGGTGCG	CTGGCGATTG	GCGTGGGCGA	TAAAGTGAAT				600							
	ATGCTGCAAT	ACAGCACCTA	TTCCGTTATC	TCGCCGGAAG	GTTGTGCGTC	CATTCTGTGG				660							
15	AAGAGCGCCG	ACAAAAGCGCC	GCTGGCGGCT	GAAGCGATGG	GTATCATTGC	TCCGCGTCTG				720							
	AAAGAACTGA	AACTGATCGA	CTCCATCATC	CCGGAACCCAC	TGGGTGGTGC	TCACCGTAAC				780							
	CCGGAAGCGA	TGGCGGCATC	GTTGAAAGCG	CAACTGCTGG	CGGATCTGGC	CGATCTCGAC				840							
	GTGTTAAGCA	CTGAAGATTT	AAAAAATCGT	CGTTATCAGC	GCCTGATGAG	CTACGGTTAC				900							
	GCGTAATTCG	CAAAAAGTTCT	GAAAAAGGGT	CACTTCGGTG	GCCCTTTTTT	ATCGCCACGG				960							
20	TTGAGCAGG	CTATGATTAA	GGAAGGATTT	TCCAGGAGGA	ACAC	ATG	AAC	ATC	ATT	1016							
										Met Asn Ile Ile							
										1							
	GCC	ATT	ATG	GGA	CCG	CAT	GGC	GTC	TTT	TAT	AAA	GAT	GAG	CCC	ATC	AAA	1064
25	Ala	Ile	Met	Gly	Pro	His	Gly	Val	Phe	Tyr	Lys	Asp	Glu	Pro	Ile	Lys	
	5					10					15					20	
	GAA	CTG	GAG	TCG	GCG	CTG	GTG	GCG	CAA	GGC	TTT	CAG	ATT	ATC	TGG	CCA	1112
	Glu	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Gly	Phe	Gln	Ile	Ile	Trp	Pro	
					25					30					35		
30	CAA	AAC	AGC	GTT	GAT	TTG	CTG	AAA	TTT	ATC	GAG	CAT	AAC	CCT	CGA	ATT	1160
	Gln	Asn	Ser	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	Glu	His	Asn	Pro	Arg	Ile	
				40					45					50			
	TGC	GGC	GTG	ATT	TTT	GAC	TGG	GAT	GAG	TAC	AGT	CTC	GAT	TTA	TGT	AGC	1208
	Cys	Gly	Val	Ile	Phe	Asp	Trp	Asp	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Leu	Cys	Ser	
35			55					60						65			

ES 2 256 850 T3

	GAT	ATC	AAT	CAG	CTT	AAT	GAA	TAT	CTC	CCG	CTT	TAT	GCC	TTC	ATC	AAC	1256
	Asp	Ile	Asn	Gln	Leu	Asn	Glu	Tyr	Leu	Pro	Leu	Tyr	Ala	Phe	Ile	Asn	
		70					75					80					
5	ACC	CAC	TCG	ACG	ATG	GAT	GTC	AGC	GTG	CAG	GAT	ATG	CGG	ATG	GCG	CTC	1304
	Thr	His	Ser	Thr	Met	Asp	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Met	Arg	Met	Ala	Leu	
	85					90					95					100	
	TGG	TTT	TTT	GAA	TAT	GCG	CTG	GGG	CAG	GCG	GAA	GAT	ATC	GCC	ATT	CGT	1352
	Trp	Phe	Phe	Glu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Glu	Asp	Ile	Ala	Ile	Arg	
10					105					110					115		
	ATG	CGT	CAG	TAC	ACC	GAC	GAA	TAT	CTT	GAT	AAC	ATT	ACA	CCG	CCG	TTC	1400
	Met	Arg	Gln	Tyr	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Pro	Pro	Phe	
				120					125					130			
	ACG	AAA	GCC	TTG	TTT	ACC	TAC	GTC	AAA	GAG	CGG	AAG	TAC	ACC	TTT	TGT	1448
	Thr	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Tyr	Val	Lys	Glu	Arg	Lys	Tyr	Thr	Phe	Cys	
								140						145			
	ACG	CCG	GGG	CAT	ATG	GGC	GGC	ACC	GCA	TAT	CAA	AAA	AGC	CCG	GTT	GGC	1496
	Thr	Pro	Gly	His	Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gln	Lys	Ser	Pro	Val	Gly	
		150					155					160					
20	TGT	CTG	TTT	TAT	GAT	TTT	TTC	GGC	GGG	AAT	ACT	CTT	AAG	GCT	GAT	GTC	1544
	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Asp	Val	
	165					170					175					180	
	TCT	ATT	TCG	GTC	ACC	GAG	CTT	GGT	TCG	TTG	CTC	GAC	CAC	ACC	GGG	CCA	1592
	Ser	Ile	Ser	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	His	Thr	Gly	Pro	
25					185					190					195		
	CAC	CTG	GAA	GCG	GAA	GAG	TAC	ATC	GCG	CGG	ACT	TTT	GGC	GCG	GAA	CAG	1640
	His	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Arg	Thr	Phe	Gly	Ala	Glu	Gln	
				200					205				210				
	AGT	TAT	ATC	GTT	ACC	AAC	GGA	ACA	TCG	ACG	TCG	AAC	AAA	ATT	GTG	GGT	1688
	Ser	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Ile	Val	Gly	
				215				220					225				
	ATG	TAC	GCC	GCG	CCA	TCC	GGC	AGT	ACG	CTG	TTG	ATC	GAC	CGC	AAT	TGT	1736
	Met	Tyr	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	Arg	Asn	Cys	
							235					240					
35	CAT	AAA	TCG	CTG	GCG	CAT	CTG	TTG	ATG	ATG	AAC	GAT	GTA	GTG	CCA	GTC	1784
	His	Lys	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Leu	Met	Met	Asn	Asp	Val	Val	Pro	Val	
						250					255					260	
	TGG	CTG	AAA	CCG	ACG	CGT	AAT	GCG	TTG	GGG	ATT	CTT	GGT	GGG	ATC	CCG	1832
	Trp	Leu	Lys	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	
					265					270					275		
	CGC	CGT	GAA	TTT	ACT	CGC	GAC	AGC	ATC	GAA	GAG	AAA	GTC	GCT	GCT	ACC	1880
	Arg	Arg	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Ser	Ile	Glu	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Thr	
					280				285					290			
45	ACG	CAA	GCA	CAA	TGG	CCG	GTT	CAT	GCG	GTG	ATC	ACC	AAC	TCC	ACC	TAT	1928
	Thr	Gln	Ala	Gln	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
							300						305				
	GAT	GGC	TTG	CTC	TAC	AAC	ACC	GAC	TGG	ATC	AAA	CAG	ACG	CTG	GAT	GTC	1976
	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Trp	Ile	Lys	Gln	Thr	Leu	Asp	Val	
		310					315					320					
50	CCG	TCG	ATT	CAC	TTC	GAT	TCT	GCC	TGG	GTG	CCG	TAC	ACC	CAT	TTT	CAT	2024
	Pro	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr	Thr	His	Phe	His	
						330					335					340	

55

60

65

ES 2 256 850 T3

CCG ATC TAC CAG GGT AAA AGT GGT ATG AGC GGC GAG CGT GTT GCG GGA 2072
 Pro Ile Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Met Ser Gly Glu Arg Val Ala Gly
 345 350 355
 5 AAA GTG ATC TTC GAA ACG CAA TCG ACC CAC AAA ATG CTG GCG GCG TTA 2120
 Lys Val Ile Phe Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Met Leu Ala Ala Leu
 360 365 370
 10 TCG CAG GCT TCG CTG ATC CAC ATT AAA GGC GAG TAT GAC GAA GAG GCC 2168
 Ser Gln Ala Ser Leu Ile His Ile Lys Gly Glu Tyr Asp Glu Glu Ala
 375 380 385
 TTT AAC GAA GCC TTT ATG ATG CAT ACC ACC ACC TCG CCC AGT TAT CCC 2216
 Phe Asn Glu Ala Phe Met Met His Thr Thr Thr Ser Pro Ser Tyr Pro
 390 395 400
 15 ATT GTT GCT TCG GTT GAG ACG GCG GCG GCG ATG CTG CGT GGT AAT CCG 2264
 Ile Val Ala Ser Val Glu Thr Ala Ala Ala Met Leu Arg Gly Asn Pro
 405 410 415 420
 20 GGC AAA CGG CTG ATT AAC CGT TCA GTA GAA CGA GCT CTG CAT TTT CGC 2312
 Gly Lys Arg Leu Ile Asn Arg Ser Val Glu Arg Ala Leu His Phe Arg
 425 430 435
 AAA GAG GTC CAG CGG CTG CGG GAA GAG TCT GAC GGT TGG TTT TTC GAT 2360
 Lys Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu Glu Ser Asp Gly Trp Phe Phe Asp
 440 445 450
 25 ATC TGG CAA CCG CCG CAG GTG GAT GAA GCC GAA TGC TGG CCC GTT GCG 2408
 Ile Trp Gln Pro Pro Gln Val Asp Glu Ala Glu Cys Trp Pro Val Ala
 455 460 465
 CCT GGC GAA CAG TGG CAC GGC TTT AAC GAT GCG GAT GCC GAT CAT ATG 2456
 Pro Gly Glu Gln Trp His Gly Phe Asn Asp Ala Asp Ala Asp His Met
 470 475 480
 30 TTT CTC GAT CCG GTT AAA GTC ACT ATT TTG ACA CCG GGG ATG GAC GAG 2504
 Phe Leu Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Leu Thr Pro Gly Met Asp Glu
 485 490 495 500
 35 CAG GGC AAT ATG AGC GAG GAG GGG ATC CCG GCG GCG CTG GTA GCA AAA 2552
 Gln Gly Asn Met Ser Glu Glu Gly Ile Pro Ala Ala Leu Val Ala Lys
 505 510 515
 TTC CTC GAC GAA CGT GGG ATC GTA GTA GAG AAA ACC GGC CCT TAT AAC 2600
 Phe Leu Asp Glu Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Thr Gly Pro Tyr Asn
 520 525 530
 40 CTG CTG TTT CTC TTT AGT ATT GGC ATC GAT AAA ACC AAA GCA ATG GGA 2648
 Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr Lys Ala Met Gly
 535 540 545
 TTA TTG CGT GGG TTG ACG GAA TTC AAA CGC TCT TAC GAT CTC AAC CTG 2696
 Leu Leu Arg Gly Leu Thr Glu Phe Lys Arg Ser Tyr Asp Leu Asn Leu
 550 555 560
 45 CGG ATC AAA AAT ATG CTA CCC GAT CTC TAT GCA GAA GAT CCC GAT TTC 2744
 Arg Ile Lys Asn Met Leu Pro Asp Leu Tyr Ala Glu Asp Pro Asp Phe
 565 570 575 580
 50 TAC CGC AAT ATG CGT ATT CAG GAT CTG GCA CAA GGG ATC CAT AAG CTG 2792
 Tyr Arg Asn Met Arg Ile Gln Asp Leu Ala Gln Gly Ile His Lys Leu
 585 590 595
 ATT CGT AAA CAC GAT CTT CCC GGT TTG ATG TTG CGG GCA TTC GAT ACT 2840
 Ile Arg Lys His Asp Leu Pro Gly Leu Met Leu Arg Ala Phe Asp Thr
 600 605 610

60

65

ES 2 256 850 T3

```

5   TTG CCG GAG ATG ATC ATG ACG CCA CAT CAG GCA TGG CAA CGA CAA ATT   2888
    Leu Pro Glu Met Ile Met Thr Pro His Gln Ala Trp Gln Arg Gln Ile
      615                               620                               625
10  AAA GGC GAA GTA GAA ACC ATT GCG CTG GAA CAA CTG GTC GGT AGA GTA   2936
    Lys Gly Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Glu Gln Leu Val Gly Arg Val
      630                               635                               640
15  TCG GCA AAT ATG ATC CTG CCT TAT CCA CCG GGC GTA CCG CTG TTG ATG   2984
    Ser Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val Pro Leu Leu Met
      645                               650                               655                               660
    CCT GGA GAA ATG CTG ACC AAA GAG AGC CGC ACA GTA CTC GAT TTT CTA   3032
    Pro Gly Glu Met Leu Thr Lys Glu Ser Arg Thr Val Leu Asp Phe Leu
      665                               670                               675
20  CTG ATG CTT TGT TCC GTC GGG CAA CAT TAC CCC GGT TTT GAA ACG GAT   3080
    Leu Met Leu Cys Ser Val Gly Gln His Tyr Pro Gly Phe Glu Thr Asp
      680                               685                               690
    ATT CAC GGC GCG AAA CAG GAC GAA GAC GGC GTT TAC CGC GTA CGA GTC   3128
    Ile His Gly Ala Lys Gln Asp Glu Asp Gly Val Tyr Arg Val Arg Val
      695                               700                               705
25  CTA AAA ATG GCG GGA TAACTTGCCA GAGCGGCTTC CGGGCGAGTA ACGTTCTGTT   3183
    Leu Lys Met Ala Gly
      710
    AACAAATAAA GGAGACGTTA TGCTGGGTTT AAAACAGGTT CACCATATTG CGATTATTGC   3243
    GACGGATTAT GCGGTGAGCA AAGCTT                                     3269

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº4:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 713 aminoácidos

(A) TIPO: aminoácido

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

```

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

```

ES 2 256 850 T3

Lys Ala Asp Val Ser Ile Ser Val Thr Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp
 180 185 190
 His Thr Gly Pro His Leu Glu Ala Glu Glu Tyr Ile Ala Arg Thr Phe
 195 200 205
 Gly Ala Glu Gln Ser Tyr Ile Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn
 210 215 220
 Lys Ile Val Gly Met Tyr Ala Ala Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240
 Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Leu Ala His Leu Leu Met Met Asn Asp
 245 250 255
 Val Val Pro Val Trp Leu Lys Pro Thr Arg Asn Ala Leu Gly Ile Leu
 260 265 270
 Gly Gly Ile Pro Arg Arg Glu Phe Thr Arg Asp Ser Ile Glu Glu Lys
 275 280 285
 Val Ala Ala Thr Thr Gln Ala Gln Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Trp Ile Lys Gln
 305 310 315 320
 Thr Leu Asp Val Pro Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr
 325 330 335
 Thr His Phe His Pro Ile Tyr Gln Gly Lys Ser Gly Met Ser Gly Glu
 340 345 350
 Arg Val Ala Gly Lys Val Ile Phe Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Met
 355 360 365
 Leu Ala Ala Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ile His Ile Lys Gly Glu Tyr
 370 375 380
 Asp Glu Glu Ala Phe Asn Glu Ala Phe Met Met His Thr Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Pro Ser Tyr Pro Ile Val Ala Ser Val Glu Thr Ala Ala Ala Met Leu
 405 410 415
 Arg Gly Asn Pro Gly Lys Arg Leu Ile Asn Arg Ser Val Glu Arg Ala
 420 425 430
 Leu His Phe Arg Lys Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu Glu Ser Asp Gly
 435 440 445
 Trp Phe Phe Asp Ile Trp Gln Pro Pro Gln Val Asp Glu Ala Glu Cys
 450 455 460
 Trp Pro Val Ala Pro Gly Glu Gln Trp His Gly Phe Asn Asp Ala Asp
 465 470 475 480
 Ala Asp His Met Phe Leu Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Leu Thr Pro
 485 490 495
 Gly Met Asp Glu Gln Gly Asn Met Ser Glu Glu Gly Ile Pro Ala Ala
 500 505 510
 Leu Val Ala Lys Phe Leu Asp Glu Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Thr
 515 520 525
 Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr
 530 535 540
 Lys Ala Met Gly Leu Leu Arg Gly Leu Thr Glu Phe Lys Arg Ser Tyr
 545 550 555 560
 Asp Leu Asn Leu Arg Ile Lys Asn Met Leu Pro Asp Leu Tyr Ala Glu
 565 570 575
 Asp Pro Asp Phe Tyr Arg Asn Met Arg Ile Gln Asp Leu Ala Gln Gly
 580 585 590

ES 2 256 850 T3

	CGT	TTA	CAG	ATT	AGC	TTC	TTT	GAA	TAT	GCG	CTG	GGT	GCT	GCT	GAA	GAT	336
5	Arg	Leu	Gln	Ile	Ser	Phe	Phe	Glu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Glu	Asp	
				100					105						110		
	ATT	GCT	AAT	AAG	ATC	AAG	CAG	ACC	ACT	GAC	GAA	TAT	ATC	AAC	ACT	ATT	384
	Ile	Ala	Asn	Lys	Ile	Lys	Gln	Thr	Thr	Asp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Thr	Ile	
			115					120						125			
10	CTG	CCT	CCG	CTG	ACT	AAA	GCA	CTG	TTT	AAA	TAT	GTT	CGT	GAA	GGT	AAA	432
	Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Phe	Lys	Tyr	Val	Arg	Glu	Gly	Lys	
		130					135					140					
	TAT	ACT	TTC	TGT	ACT	CCT	GGT	CAC	ATG	GGC	GGT	ACT	GCA	TTC	CAG	AAA	480
	Tyr	Thr	Phe	Cys	Thr	Pro	Gly	His	Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Gln	Lys	
	145					150					155					160	
15	AGC	CCG	GTA	GGT	AGC	CTG	TTC	TAT	GAT	TTC	TTT	GGT	CCG	AAT	ACC	ATG	528
	Ser	Pro	Val	Gly	Ser	Leu	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	
				165					170						175		
	AAA	TCT	GAT	ATT	TCC	ATT	TCA	GTA	TCT	GAA	CTG	GGT	TCT	CTG	CTG	GAT	576
	Lys	Ser	Asp	Ile	Ser	Ile	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	
20				180					185					190			
	CAC	AGT	GGT	CCA	CAC	AAA	GAA	GCA	GAA	CAG	TAT	ATC	GCT	CGC	GTC	TTT	624
	His	Ser	Gly	Pro	His	Lys	Glu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Arg	Val	Phe	
			195				200						205				
25	AAC	GCA	GAC	CGC	AGC	TAC	ATG	GTG	ACC	AAC	GGT	ACT	TCC	ACT	GCG	AAC	672
	Asn	Ala	Asp	Arg	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	
		210					215					220					
	AAA	ATT	GTT	GGT	ATG	TAC	TCT	GCT	CCA	GCA	GGC	AGC	ACC	ATT	CTG	ATT	720
	Lys	Ile	Val	Gly	Met	Tyr	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Thr	Ile	Leu	Ile	
	225					230					235					240	
30	GAC	CGT	AAC	TGC	CAC	AAA	TCG	CTG	ACC	CAC	CTG	ATG	ATG	ATG	AGC	GAT	768
	Asp	Arg	Asn	Cys	His	Lys	Ser	Leu	Thr	His	Leu	Met	Met	Met	Ser	Asp	
				245						250					255		
	GTT	ACG	CCA	ATC	TAT	TTC	CGC	CCG	ACC	CGT	AAC	GCT	TAC	GGT	ATT	CTT	816
	Val	Thr	Pro	Ile	Tyr	Phe	Arg	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ile	Leu	
35				260					265					270			
	GGT	GGT	ATC	CCA	CAG	AGT	GAA	TTC	CAG	CAC	GCT	ACC	ATT	GCT	AAG	CGC	864
	Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Gln	His	Ala	Thr	Ile	Ala	Lys	Arg	
			275				280						285				
40	GTG	AAA	GAA	ACA	CCA	AAC	GCA	ACC	TGG	CCG	GTA	CAT	GCT	GTA	ATT	ACC	912
	Val	Lys	Glu	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr	
		290					295					300					
	AAC	TCT	ACC	TAT	GAT	GGT	CTG	CTG	TAC	AAC	ACC	GAC	TTC	ATC	AAG	AAA	960
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Phe	Ile	Lys	Lys	
	305					310					315					320	
45	ACA	CTG	GAT	GTG	AAA	TCC	ATC	CAC	TTT	GAC	TCC	GCG	TGG	GTG	CCT	TAC	1008
	Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr	
				325						330					335		
	ACC	AAC	TTC	TCA	CCG	ATT	TAC	GAA	GGT	AAA	TGC	GGT	ATG	AGC	GGT	GGC	1056
	Thr	Asn	Phe	Ser	Pro	Ile	Tyr	Glu	Gly	Lys	Cys	Gly	Met	Ser	Gly	Gly	
50				340					345					350			
	CGT	GTA	GAA	GGG	AAA	GTG	ATT	TAC	GAA	ACC	CAG	TCC	ACT	CAC	AAA	CTG	1104
	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Tyr	Glu	Thr	Gln	Ser	Thr	His	Lys	Leu	
			355					360					365				

55

60

65

ES 2 256 850 T3

	CTG	GCG	GCG	TTC	TCT	CAG	GCT	TCC	ATG	ATC	CAC	GTT	AAA	GGT	GAC	GTA	1152
	Leu	Ala	Ala	Phe	Ser	Gln	Ala	Ser	Met	Ile	His	Val	Lys	Gly	Asp	Val	
		370					375					380					
5	AAC	GAA	GAA	ACC	TTT	AAC	GAA	GCC	TAC	ATG	ATG	CAC	ACC	ACC	ACT	TCT	1200
	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Asn	Glu	Ala	Tyr	Met	Met	His	Thr	Thr	Thr	Ser	
	385					390					395				400		
	CCG	CAC	TAC	GGT	ATC	GTG	GCG	TCC	ACT	GAA	ACC	GCT	GCG	GCG	ATG	ATG	1248
10	Pro	His	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Met	
				405						410					415		
	AAA	GGC	AAT	GCA	GGT	AAG	CGT	CTG	ATC	AAC	GGT	TCT	ATT	GAA	CGT	GCG	1296
	Lys	Gly	Asn	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	
				420				425						430			
15	ATC	AAA	TTC	CGT	AAA	GAG	ATC	AAA	CGT	CTG	AGA	ACG	GAA	TCT	GAT	GGC	1344
	Ile	Lys	Phe	Arg	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Arg	Thr	Glu	Ser	Asp	Gly	
			435				440						445				
	TGG	TTC	TTT	GAT	GTA	TGG	CAG	CCG	GAT	CAT	ATC	GAT	ACG	ACT	GAA	TGC	1392
	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gln	Pro	Asp	His	Ile	Asp	Thr	Thr	Glu	Cys	
		450				455						460					
20	TGG	CCG	CTG	CGT	TCT	GAC	AGC	ACC	TGG	CAC	GGC	TTC	AAA	AAC	ATC	GAT	1440
	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Trp	His	Gly	Phe	Lys	Asn	Ile	Asp	
		465				470					475				480		
	AAC	GAG	CAC	ATG	TAT	CTT	GAC	CCG	ATC	AAA	GTC	ACC	CTG	CTG	ACT	CCG	1488
25	Asn	Glu	His	Met	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ile	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro	
				485						490					495		
	GGG	ATG	GAA	AAA	GAC	GGC	ACC	ATG	AGC	GAC	TTT	GGT	ATT	CCG	GCC	AGC	1536
	Gly	Met	Glu	Lys	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Asp	Phe	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	
				500				505						510			
30	ATC	GTG	GCG	AAA	TAC	CTC	GAC	GAA	CAT	GGC	ATC	GTT	GTT	GAG	AAA	ACC	1584
	Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	His	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr	
			515					520					525				
	GGT	CCG	TAT	AAC	CTG	CTG	TTC	CTG	TTC	AGC	ATC	GGT	ATC	GAT	AAG	ACC	1632
	Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr	
		530				535						540					
35	AAA	GCA	CTG	AGC	CTG	CTG	CGT	GCT	CTG	ACT	GAC	TTT	AAA	CGT	GCG	TTC	1680
	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Phe	Lys	Arg	Ala	Phe	
		545				550					555				560		
	GAC	CTG	AAC	CTG	CGT	GTG	AAA	AAC	ATG	CTG	CCG	TCT	CTG	TAT	CGT	GAA	1728
40	Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Tyr	Arg	Glu	
				565						570					575		
	GAT	CCT	GAA	TTC	TAT	GAA	AAC	ATG	CGT	ATT	CAG	GAA	CTG	GCT	CAG	AAT	1776
	Asp	Pro	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Asn	
				580					585					590			
45	ATC	CAC	AAA	CTG	ATT	GTT	CAC	CAC	AAT	CTG	CCG	GAT	CTG	ATG	TAT	CGC	1824
	Ile	His	Lys	Leu	Ile	Val	His	His	Asn	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Tyr	Arg	
			595					600					605				
	GCA	TTT	GAA	GTG	CTG	CCG	ACG	ATG	GTA	ATG	ACT	CCG	TAT	GCT	GCA	TTC	1872
	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Met	Thr	Pro	Tyr	Ala	Ala	Phe	
		610				615						620					
50	CAG	AAA	GAG	CTG	CAC	GGT	ATG	ACC	GAA	GAA	GTT	TAC	CTC	GAC	GAA	ATG	1920
	Gln	Lys	Glu	Leu	His	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Met	
				625		630					635					640	

55

60

65

ES 2 256 850 T3

	Asp	Arg	Asn	Cys	His	Lys	Ser	Leu	Thr	His	Leu	Met	Met	Met	Ser	Asp
					245					250					255	
	Val	Thr	Pro	Ile	Tyr	Phe	Arg	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ile	Leu
				260					265					270		
5	Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Gln	His	Ala	Thr	Ile	Ala	Lys	Arg
			275					280					285			
	Val	Lys	Glu	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr
		290					295					300				
10	Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Phe	Ile	Lys	Lys
	305					310					315					320
	Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr
				325						330					335	
15	Thr	Asn	Phe	Ser	Pro	Ile	Tyr	Glu	Gly	Lys	Cys	Gly	Met	Ser	Gly	Gly
			340					345						350		
	Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Tyr	Glu	Thr	Gln	Ser	Thr	His	Lys	Leu
			355					360						365		
20	Leu	Ala	Ala	Phe	Ser	Gln	Ala	Ser	Met	Ile	His	Val	Lys	Gly	Asp	Val
		370					375					380				
	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Asn	Glu	Ala	Tyr	Met	Met	His	Thr	Thr	Thr	Ser
	385					390						395				400
	Pro	His	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Met
				405						410					415	
25	Lys	Gly	Asn	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala
			420						425					430		
	Ile	Lys	Phe	Arg	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Arg	Thr	Glu	Ser	Asp	Gly
			435						440					445		
30	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gln	Pro	Asp	His	Ile	Asp	Thr	Thr	Glu	Cys
	450						455					460				
	Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Trp	His	Gly	Phe	Lys	Asn	Ile	Asp
	465					470					475					480
35	Asn	Glu	His	Met	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ile	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro
				485						490					495	
	Gly	Met	Glu	Lys	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Asp	Phe	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser
				500					505					510		
40	Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	His	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr
			515					520					525			
	Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr
		530					535					540				
45	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Phe	Lys	Arg	Ala	Phe
	545					550					555					560
	Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Tyr	Arg	Glu
				565						570					575	
50	Asp	Pro	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Asn
				580					585					590		
	Ile	His	Lys	Leu	Ile	Val	His	His	Asn	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Tyr	Arg
			595					600						605		
55	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Met	Thr	Pro	Tyr	Ala	Ala	Phe
		610					615					620				
	Gln	Lys	Glu	Leu	His	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Met
	625					630					635					640
	Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Ala	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val
				645						650					655	
60	Pro	Leu	Val	Met	Pro	Gly	Glu	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ser	Arg	Pro	Val
			660							665				670		
	Leu	Glu	Phe	Leu	Gln	Met	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Tyr	Pro	Gly
			675					680					685			
65	Phe	Glu	Thr	Asp	Ile	His	Gly	Ala	Tyr	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Arg	Tyr
		690					695					700				
	Thr	Val	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Lys					
				705			710									