



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 981**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12N 9/04** (2006.01)

**C07K 14/80** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12P 7/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98105608 .8**

96 Fecha de presentación : **27.03.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0869175**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.1998**

54

Título: **Citocromo C y su gen.**

30

Prioridad: **04.04.1997 EP 97105583**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.07.2011**

73

Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72

Inventor/es: **Asakura, Akira;**  
**Hoshino, Tatsuo;**  
**Shinjoh, Masako y**  
**Tomiyama, Noribumi**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 362 981 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

## Citocromo C y su gen

Se sabe que el citocromo *c* es uno de los componentes esenciales que media la transferencia de electrones entre las deshidrogenasas primarias y la oxidasa terminal para lograr la oxidación del sustrato con reducción de oxígeno molecular a H<sub>2</sub>O. Esta reacción de transferencia electrónica se basa en una oxidación-reducción del hierro hemo. Recientemente se han hecho intentos para aplicar la reacción de transferencia electrónica de citocromo *c* como nuevos materiales que imitan materiales o elementos biológicos, a saber, biochips, por ejemplo usando citocromo *c*<sub>552</sub> de *Hydrogenobacter thermophilus* (Kodama et al., patente U.S. n° 5459046). Las bacterias del ácido acético, incluyendo *Gluconobacter* y *Acetobacter*, poseen una capacidad altamente eficiente de oxidar azúcares y alcoholes de azúcares, y se usan industrialmente para producir vinagre y L-sorbosa, que se usa como intermedio para la producción de vitamina C. Para la fermentación oxidativa, el citocromo *c* desempeña un papel importante para completar la oxidación. Las proteínas del citocromo *c* se purificaron y caracterizaron para muchos organismos, incluyendo *Gluconobacter*, por ejemplo, Matsushita et al. dieron a conocer la purificación del citocromo *c*<sub>553</sub> de unión a CO (CO) (peso molecular 48 kDa) a partir de *Gluconobacter suboxydans* (FEMS Microbiol. Lett., 10:267-270, 1981), y más tarde se encontró que el citocromo *c*<sub>553</sub> (CO) era idéntico a la segunda subunidad de alcohol deshidrogenasa de *Gluconobacter*. La amplificación del citocromo *c*<sub>553</sub> (CO) en una *Gluconobacter* deficiente en la segunda subunidad de alcohol deshidrogenasa mejoró ligeramente la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol en su velocidad específica (gramo de producto por gramo de célula hora), como se describe en J. Ferment. Bioeng., 74, 209-213, 1992 (Y. Takeda et al.). Además del citocromo *c*<sub>553</sub>, el citocromo *c*<sub>551</sub>(AL) (peso molecular 55 kDa) y el citocromo *c*<sub>551</sub> (CO) (peso molecular 72 kDa) [Ameyama et al., Agri. Biol. Chem. 51, 2943-2950 (1987)] también se aislaron a partir de *Gluconobacter*.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo citocromo *c* que pertenece a una familia de proteínas que tiene funciones como aceptor de electrones. Más particularmente, el nuevo citocromo *c* de la presente invención es útil como un aceptor de electrones de deshidrogenasa, tal como alcohol y aldehído deshidrogenasa.

La presente invención también se refiere a derivados funcionales de los polipéptidos del presente caso. Tales derivados funcionales se definen en base a las secuencias de aminoácidos de la presente invención mediante adición, inserción, supresión y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos de tales secuencias, en los que tales derivados todavía tienen actividad de citocromo *c* medida mediante un ensayo conocido en la técnica o descrito específicamente aquí. Tales derivados funcionales se pueden obtener mediante síntesis química de péptidos, conocida en la técnica, o por medios recombinantes, basándose en las secuencias de ADN como se describen aquí mediante métodos conocidos en el estado de la técnica y descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, segunda edición 1989). Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos que no alteran generalmente la actividad de tales moléculas son conocidos en el estado de la técnica, y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill en "The Proteins" (Academic Press, Nueva York, 1979, véase especialmente la Figura 6, página 14). Los intercambios que se producen de forma más habitual son: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, así como estos en contrario.

Además, la presente invención se refiere a secuencias de ADN que comprenden una secuencia de ADN que codifica, con la expresión en una célula hospedante procarionta o eucariota, polipéptidos que tienen al menos una parte de la estructura primaria y una de las propiedades biológicas del citocromo *c*<sub>551</sub>, como se describe, por ejemplo, en el listado de secuencias, así como sus hebras complementarias, o aquellas que incluyen estas secuencias, secuencias de ADN que se hibridan, preferiblemente en condiciones estándar, con tales secuencias o sus fragmentos, y secuencias de ADN que, debido a la degeneración del código genético, no se hibridan en condiciones estándar con tales secuencias pero que codifican polipéptidos que tienen exactamente la misma secuencia de aminoácidos.

"Condiciones estándar" para la hibridación significa, en este contexto, las condiciones que se usan generalmente por la persona experta en la técnica para detectar señales de hibridación específicas, y que se describen, por ejemplo, por Sambrook et al., "Molecular Cloning", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, Nueva York, o preferiblemente las denominadas condiciones de hibridación restrictivas y condiciones de lavado no restrictivas, o más preferiblemente las denominadas condiciones moderadamente restrictivas, o incluso más preferiblemente las denominadas condiciones de hibridación restrictivas y de lavado restrictivas con las que está familiarizada una persona experta en la técnica y que se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (s.a.).

Además, es un objeto de la presente invención proporcionar una secuencia de ADN como se especifica anteriormente, que comprende además una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene actividad de alcohol/aldehído deshidrogenasa. Tales constructos se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6.

Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un polipéptido que contiene actividad de citocromo *c* y

que es codificado por una secuencia de ADN definida anteriormente, o un polipéptido que tiene actividad de citocromo *c* obtenible u obtenido a partir de un microorganismo que pertenece al género *Gluconobacter* seleccionado del grupo que consiste en los citocromos c551 I y II, que muestran respectivamente las siguientes propiedades fisicoquímicas:

5 (a) citocromo c551 I:

(a) peso molecular: alrededor de  $19 \pm 1$  kDa mediante filtración en gel, y alrededor de  $18 \pm 1,0$  kDa mediante análisis de SDS-PAGE;

(b) espectro de absorción: la forma reducida muestra máximos de absorción a 551 nm, 522 nm y 417 nm como picos alfa, beta y gamma, respectivamente;

10 (c) contenido hemo: alrededor de 1 mol de hemo/mol de proteína;

(d) punto isoeléctrico: alrededor de 3,95;

y

(b) citocromo c551 II:

15 (a) peso molecular: alrededor de  $19 \pm 1$  kDa mediante filtración en gel, y alrededor de  $16,8 \pm 1,0$  kDa mediante análisis de SDS-PAGE;

(b) espectro de absorción: la forma reducida muestra máximos de absorción a 551 nm, 522 nm y 417 nm como picos alfa, beta y gamma, respectivamente;

(c) contenido hemo: alrededor de 1 mol de hemo/mol de proteína;

(d) punto isoeléctrico: alrededor de 3,75.

20 Además, es un objeto de la presente invención proporcionar una secuencia de ADN como se especifica anteriormente que comprende además una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene actividad de alcohol/aldehído deshidrogenasa.

25 Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un vector adecuado para la expresión en una célula hospedante procaríota o eucariota que comprende una secuencia de ADN como se define anteriormente, y una célula hospedante que se ha transformado mediante tal vector, más específicamente tal célula hospedante en la que se ha integrado en su genoma una secuencia de ADN como se define anteriormente; adicionalmente, tales células hospedantes que tienen origen eucariota, y preferiblemente una célula de mamífero o vegetal, o tales células hospedantes que tienen origen procaríota, especialmente cuando se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*,  
30 *Acetobacter acetii*, *Acetobacter hansenii*, y *Gluconobacter oxydans*, por ejemplo *Gluconobacter oxydans* DSM No. 4025.

Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir citocromo c551, que comprende cultivar una célula hospedante como se define anteriormente en un medio de cultivo apropiado, y recuperar del cultivo el citocromo c551.

35 El citocromo *c* de la presente invención también es aplicable para mejorar la producción de 2KGA a partir de L-sorbosa o D-sorbitol, y además la producción de aldehídos, ácidos carboxílicos y cetonas a partir de sustratos correspondientes en presencia de alcohol y aldehído deshidrogenasa *in vivo* e *in vitro*.

40 El compuesto 2KGA es un intermedio importante para la producción de ácido ascórbico (vitamina C) en la que se puede convertir según el método de Reichstein bien conocido. La producción de 2KGA a partir de L-sorbosa o a partir de D-sorbitol mediante fermentación es conocida. Se sabe que las cepas de *Gluconobacter* producen 2KGA vía la reacción catalizada por sorbosa y sorbosona deshidrogenasas, como se describe en Agric. Biol. Chem., 54(5), 1211-1218, 1990 (T. Hoshino et al.) y en la Publicación de Patente Europea n° 606621.

Por lo tanto, el uso de citocromo *c* de la presente invención para la producción de vitamina C es también un objeto de la presente invención.

45 En lo siguiente se da una breve descripción de los dibujos antes de describir con más detalle la presente invención:

La Figura 1 muestra un espectro de absorción del citocromo c<sub>551</sub> I y II. La concentración de proteína de la muestra fue cada una 0,4 mg/ml. Las líneas continuas y discontinuas son los espectros de la forma reducida y oxidada, respectivamente.

La Figura 2 muestra secuencias de péptidos aislados a partir de citocromo  $c_{551}$  II natural y sintetizados mediante oligonucleótidos.

La Figura 3 muestra el análisis de transferencia Western de GOS2R que posee el plásmido con el gen del citocromo  $c_{551}$ .

- 5 La Figura 4 muestra la preparación del plásmido empleado en la expresión del conjugado de alcohol/aldehído deshidrogenasa (AADH)-citocromo  $c_{551}$ , que se construyó imitando una alcohol deshidrogenasa (ADH) de *A. acetii* que tiene una secuencia similar a citocromo *c* en su terminal C. La secuencia entre el dominio de deshidrogenasa y el dominio de citocromo *c* de ADH (PALNNRGFLPVKPP que corresponde a los aminoácidos 582 a 595 de ADH madura) se usó como un ligador para conectar el dominio de AADH con el dominio de citocromo  $c_{551}$ . Los sitios de restricción Nhe I y Bam HI se introdujeron para ligar las tres partes (AADH, del ligador, y el citocromo  $c_{551}$ ).

Antes de describir la presente invención con más detalle, a continuación se dan las propiedades fisicoquímicas del citocromo  $c_{551}$  purificado que consiste en las isoformas I y II, según se obtiene a partir de *Gluconobacter oxydans*.

#### (1) Peso molecular

- 15 En la filtración en gel de la etapa de purificación, los citocromos  $c_{551}$  I y II mostraron un peso molecular aparente de alrededor de 19 +/- 1 kDa. Y en el análisis de SDS-PAGE mostraron pesos moleculares de 18,0 +/- 1,0 y 16,8 +/- 1,0 kDa para los citocromos  $c_{551}$  I y II, respectivamente. Por lo tanto, hay dos preparaciones de citocromos  $c_{551}$  que muestran pesos moleculares próximos, y ambos citocromos  $c_{551}$  I y II son proteínas monómeras.

#### (2) Espectro de absorción y contenido hemo

- 20 En la Fig. 1 se muestran los espectros de absorción de los citocromos  $c_{551}$  I y II, que se redujeron completamente mediante adición de ditionito sódico. Los espectros de ambos citocromos  $c_{551}$  I y II fueron indistinguibles entre sí. Los citocromos reducidos mostraron máximos de absorción a 551 nm, 522 nm y 417 nm como picos alfa, beta y gamma, respectivamente. Y los citocromos oxidados mostraron un máximo de absorción a 411 nm como pico gamma. Los contenidos hemo de los citocromos  $c_{551}$  I y II se determinaron como alrededor de 1 mol/mol de proteína, mono-hemo, mediante el método de hemocromo de piridina de Drabkin (J. Biol. Chem., 146: 605, 1942).

#### (3) Punto isoelectrico

Los puntos isoelectricos (pI) se determinaron como 3,95 y 3,75 para los citocromos  $c_{551}$  I y II mediante el sistema de electroforesis isoelectrica de LKB (Estocolmo, Suecia), respectivamente.

#### (4) Comparación del cartografiado peptídico de los citocromos $c_{551}$ I y II

- 30 Los citocromos  $c_{551}$  I y II se digirieron con proteasa V8 o termolisina en la misma condición, y los patrones de fragmentación peptídica se compararon mediante análisis de HPLC de fase inversa. Los patrones de fragmentación peptídica principales (alrededor de 30 picos de fragmentos peptídicos) de los citocromos  $c_{551}$  I y II fueron idénticos, excepto que se observaron adicionalmente unos pocos picos minoritarios de fragmentos peptídicos en los citocromos  $c_{551}$  I y II, respectivamente. El resultado indicó una fuerte homología de secuencia de aminoácidos entre los citocromos  $c_{551}$  I y II.

#### (5) Secuencias de aminoácidos del citocromo $c_{551}$ II

- 40 Los aminoácidos N-terminales de los citocromos  $c_{551}$  I y II se bloquearon mediante modificación desconocida. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos internas se determinaron a partir de los fragmentos peptídicos. Además de los fragmentos peptídicos digeridos con proteasa V8 y con termolisina, el citocromo  $c_{551}$  II (S-carboximetilado y al que se le ha eliminado el grupo hemo) se digirió mediante lisil endopeptidasa, para obtener fragmentos peptídicos adicionales. Con los varios fragmentos peptídicos obtenidos, se determinaron las siguientes secuencias de aminoácidos internas:

No. 1 (listado de secuencias SEC ID NO. 3):

**AlaAspThrAlaAlaThrGluGluAlaProAlaAlaAlaAlaGlyAlaAlaThrSerIleTyr  
AspGlyValTyrThrAlaAlaGlnAlaGluAlaGlyGlnAlaAlaTrpMetThrSerXaaAlaSerXaaHisGlyP  
roThrAlaArgGlySer,**

- 45 No. 2 (listado de secuencia SEC ID NO. 4):

**GlyProArgValIleGlyProValIleAsnAsnLysTyrAlaAspLysProLeuLeuAspTyr**

**PheAsnTyrThrArgAspAsnMetProMetGlyAlaProHisSerLeuSerAspAspThr  
TyrValGlu,**

No. 3 (listado de secuencia SEC ID NO: 5): IleLeuGlnSerHisGlyAlaGluProGlyGluThrGlu

5 El citocromo c proporcionado por la presente invención se puede preparar cultivando un microorganismo apropiado, destruyendo las células, y aislándolo y purificándolo del extracto libre de células de las células destruidas, preferiblemente a partir de la fracción soluble del microorganismo.

10 Los microorganismos usados en la presente invención para aislar citocromo c de la presente invención pertenecen preferiblemente al género *Gluconobacter*, que son capaces de producir citocromo c. También se pueden usar en la presente invención equivalentes funcionales, subcultivos, mutantes y variantes de dicho microorganismo. Una cepa preferida es *Gluconobacter oxydans*. Una cepa de *Gluconobacter oxydans* específica y preferida se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen en Göttingen (Alemania) con el número DSM 4025 el 17 de marzo de 1987. Además, también se ha depositado un subcultivo de la cepa en la Agency of Industrial Science and Technology, Fermentation Research Institute, Japón, bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con el número de depósito: *Gluconobacter oxydans* DSM número 4025 FERM BP-3812 (fecha de depósito: 30 de marzo de 1992).  
15 Además, la Publicación de Patente Europea 0278477 describe las características de esta cepa.

20 Los microorganismos se pueden cultivar en un medio acuoso suplementado con los nutrientes apropiados, en condiciones aerobias. El cultivo se puede realizar a un pH entre alrededor de 4,0 y 9,0, preferiblemente entre alrededor de 6,0 y 8,0. Aunque el período de cultivo varía dependiendo del pH, la temperatura y medio nutriente usados, habitualmente 2 a 6 días producirán resultados bastante favorables. Un intervalo preferido de temperaturas para llevar a cabo el cultivo es desde alrededor de 13° hasta 36°C, preferiblemente desde alrededor de 18° hasta 33°C.

25 Habitualmente se requiere que el medio de cultivo contenga nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, fuentes de nitrógeno digeribles y sustancias inorgánicas tales como vitaminas, oligoelementos, y los otros factores que promueven el crecimiento. Como fuentes de carbono asimilables, se pueden usar glicerol, D-glucosa, D-manitol, D-fructosa, D-arabitol, L-sorbosa, D-sorbitol y similares.

Como fuentes de nitrógeno, también se pueden usar diversas sustancias orgánicas o inorgánicas, tales como extracto de levadura, extracto de carne, peptona, caseína, licor de maceración del maíz, urea, aminoácidos, nitratos, sales de amonio, y similares. Como sustancias inorgánicas, se pueden usar sulfato de magnesio, fosfato de potasio, cloruros ferroso y férrico, carbonato de calcio, y similares.

30 En lo siguiente, se describen realizaciones para el aislamiento y purificación de citocromo c a partir de los microorganismos después del cultivo y para su clonación de la secuencia génica/ADN.

(1) Las células se cosechan a partir del caldo de fermentación mediante centrifugación o filtración.

(2) Las células se suspenden en la disolución del tampón y se destruyen por medio de un homogeneizador, aparato de ultrasonidos o tratamiento con lisozima y similar, para dar una disolución de células destruidas.

35 (3) El citocromo c se aísla y purifica a partir de un extracto libre de células de las células destruidas, preferiblemente a partir de la fracción soluble de los microorganismos, mediante métodos habituales de purificación de proteínas, tales como precipitación con sulfato de amonio, diálisis, cromatografías de intercambio iónico, cromatografías de filtración en gel, y cromatografías de afinidad.

40 El citocromo c proporcionado por la presente invención es útil como un aceptor de electrones a partir de una enzima que pertenece a deshidrogenasa, para la producción de aldehídos, ácidos carboxílicos y cetonas a partir de alcoholes y aldehídos, especialmente para la producción de 2-KGA a partir de L-sorbosa o D-sorbitol vía L-sorbosona.

45 De forma breve, el gen del citocromo c, la secuencia de ADN, el vector de expresión recombinante y el organismo recombinante, también denominado célula hospedante transformada, utilizados en la presente invención se pueden obtener mediante las siguientes etapas:

(1) aislando ADN cromosómico a partir de los microorganismos que pueden proporcionar citocromo c que acepta electrones de deshidrogenasas, y construyendo la librería génica con el ADN cromosómico en

*Escherichia coli*.

(2) Clonando el gen del citocromo *c* a partir de un ADN cromosómico mediante hibridación en colonias, en placa, o Southern, clonación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), análisis de transferencia Western, y similares.

5 (3) Determinando la secuencia nucleotídica del gen del citocromo *c* obtenido como antes por métodos habituales para seleccionar la molécula de ADN que contiene dicho gen del citocromo *c*, y construyendo el vector de expresión recombinante en el cual se puede expresar eficientemente el gen del citocromo *c*.

(4) Construyendo organismos recombinantes que poseen el gen del citocromo *c* mediante transformación, transducción, transconjugación y electroporación.

10 Los materiales y las técnicas usados en el aspecto anterior de la presente invención se ejemplifican con detalles como sigue:

un ADN cromosómico total se puede purificar mediante un procedimiento bien conocido en la técnica. El gen que codifica el citocromo *c* se clona en vectores plasmídicos o fágicos a partir de un ADN cromosómico total mediante los siguientes métodos:

15 (i) determinando las secuencias de aminoácidos parciales a partir del citocromo *c* purificado aislando la proteína completa o los fragmentos peptídicos obtenidos mediante tratamiento con peptidasas a partir del gel después de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, y aplicándolos a un secuenciador de proteínas, tal como el secuenciador automático de fase gaseosa 470A de Applied Biosystems (Perkin Elmer Corp., Norwalk, Conn., USA), sintetizando sondas oligonucleotídicas con un sintetizador de ADN  
20 tal como un secuenciador de ADN automático 381A de Applied Biosystems (Perkin Elmer), según las secuencias de aminoácidos obtenidas como antes, aislando clones que poseen el gen objetivo a partir de una librería génica de la cepa que posee el gen objetivo con las sondas oligonucleotídicas a través de hibridación Southern, en colonias o en placa; (ii) seleccionando clones que expresan el citocromo *c* a partir de la librería génica mediante métodos inmunológicos con un anticuerpo anti-citocromo *c*; o (iii)  
25 amplificando el ADN a partir del ADN cromosómico total mediante un método de PCR con dos oligonucleótidos sintetizados según las secuencias de aminoácidos determinadas como antes, y aislando un clon que posee el gen completo del citocromo *c* a partir de la librería génica construida en *E. coli* mediante hibridación Southern, en colonias, o en placa con, como sonda, el producto de la PCR obtenido anteriormente. El anticuerpo mencionado anteriormente que reacciona frente a dicho  
30 citocromo *c* se puede preparar con proteína de citocromo *c* purificada o su fragmento peptídico mediante un método tal como se describe en *Methods in Enzymology*, vol. 73, p. 46, 1981.

La secuencia nucleotídica del gen del citocromo *c* se puede determinar mediante un método bien conocido, tal como el método de terminación de cadena didesoxi con el fago M13 (Sanger F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467, 1977).

35 Para expresar eficientemente el gen del citocromo *c*, o hablando de forma general la secuencia de ADN que codifica la actividad del citocromo *c*, se pueden usar diversos promotores; por ejemplo, el promotor original que existe en dirección del mencionado gen del citocromo *c*, promotores de genes de resistencia a antibióticos, tales como gen de resistencia a canamicina de Tn5 (Berg, D. E., y C. M. Berg. 1983. *Bio/Technology* 1:417-435), el gen de resistencia a ampicilina de pBR322, y b-galactosidasa del promotor (*lac*), *trp*, *tac*, *trc* de *E. coli*, promotores del fago lambda, y  
40 cualesquiera promotores que pueden ser funcionales en los hospedantes que consisten en un microorganismo que incluye bacterias tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter acetii*, *Acetobacter hansenii*, y *Gluconobacter oxydans*, células de mamíferos y células vegetales.

Para el objeto anterior, otros elementos reguladores, tales como una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (por ejemplo, AGGAGG etc., incluyendo secuencias naturales y sintéticas operables en la célula hospedante) y un  
45 terminador transcripcional (estructura repetida invertida que incluye cualquier secuencia natural o sintética operable en la célula hospedante), que son operables en la célula hospedante en la que se introducirá y se usará la secuencia codificante con el promotor descrito anteriormente.

Para la expresión de polipéptidos periplásmicos, la proteína del citocromo *c*, es indispensable un péptido señal, que contiene habitualmente 15 a 50 restos de aminoácidos y son totalmente hidrófobos. Un ADN que codifica un péptido  
50 señal se puede seleccionar a partir de cualquier secuencia natural y sintética operable en la célula hospedante deseada.

En la clonación del ADN bicatenario se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de hospedante/vector de clonación. El vector de clonación es generalmente un plásmido o fago que contiene un origen de replicación, elementos reguladores, un sitio de clonación que incluye un sitio de clonación múltiple, y marcadores de selección  
55 tales como genes de resistencia a antibióticos, incluyendo genes de resistencia para ampicilina, tetraciclina,

canamicina, estreptomycin, gentamicina, espectinomycin, etc.

Los vectores preferidos para la expresión del gen objeto en *E. coli* se seleccionan de cualesquiera vectores usados habitualmente en *E. coli*, tales como pBR322 o sus derivados, incluyendo pUC18 y pBluescript II, pACYC177 y pACYC184 (J. Bacteriol., 134:1141-1156, 1978) y sus derivados, y un vector derivado de un plásmido de amplio intervalo de hospedantes, tal como RK2 y RSF1010. Un vector preferido para la expresión del gen objeto en *Gluconobacter*, incluyendo *G. oxydans* DSM No. 4025 y *P. putida*, se selecciona de cualesquiera vectores que se puedan replicar en *Gluconobacter* y/o *P. putida*, así como también en un organismo de clonación preferido, tal como *E. coli*. El vector preferido es un vector de amplio intervalo de hospedantes, tal como un vector cosmidico como pVK102 y sus derivados, y RSF1010 y sus derivados, y un vector que contiene un origen de replicación, funcional en *Gluconobacter*, y otro origen, funcional en *E. coli*. El número de copias y la estabilidad del vector se deberían de tener en cuenta cuidadosamente para la expresión estable y eficiente del gen clonado, y también para el cultivo eficiente de la célula hospedante que posee el gen clonado. Las secuencias de ADN que contienen elementos transposables, tales como Tn5, también se pueden usar como un vector para introducir el gen objeto en el hospedante preferido, especialmente en un cromosoma. Las secuencias de ADN que contienen cualesquiera ADN aislados a partir del hospedante preferido junto con el gen objeto también son útiles para introducir la secuencia de ADN deseada en el hospedante preferido, especialmente en un cromosoma. Tales secuencias de ADN se pueden transferir al hospedante preferido mediante transformación, transducción, transconjugación o electroporación.

Los hospedantes útiles son de origen procarionta o eucarionta, y pueden incluir microorganismos, células de mamíferos, y células vegetales. Como microorganismo preferible, se pueden mencionar las bacterias tales como *E. coli*, *P. putida*, *A. xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. hansenii*, *G. oxydans*, y cualesquiera bacteria gramnegativas que sean capaces de producir citocromo *c* recombinante. En la presente invención también se pueden usar equivalentes funcionales, subcultivos, mutantes y variantes de dicho microorganismo. Una cepa preferida es *E. coli* K12 y sus derivados, *P. putida* o *G. oxydans* DSM No. 4025.

La secuencia de ADN que codifica el citocromo *c* de la presente invención se liga, mediante métodos bien conocidos en la técnica, en un vector adecuado que contiene una región reguladora tal como un promotor y un sitio de unión ribosómica y un terminador transcripcional operable en la célula hospedante descrita anteriormente, para producir un vector de expresión.

Para construir una célula hospedante que posee un vector de expresión, se pueden usar diversos métodos de transferencia de ADN, incluyendo transformación, transducción, emparejamiento conjugacional (Capítulos 14 y 15, Methods for general and molecular bacteriology, Philip Gerhardt et al. ed., American Society for Microbiology, 1994), y electroporación. El método para construir una célula hospedante transformada se puede seleccionar de los métodos bien conocidos en el campo de la biología molecular. Se puede usar un sistema de transformación habitual para *E. coli*, *Pseudomonas* y *Acetobacter*. También se puede usar un sistema de transducción para *E. coli*. El sistema de emparejamiento conjugacional se puede usar ampliamente en bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo *E. coli*, *P. putida* y *G. oxydans*. En la Publicación PCT n° WO 89/06688, se describió básicamente por el inventor un método preferido de emparejamiento conjugacional. La conjugación puede ocurrir en medio líquido, o en una superficie sólida. El receptor preferido para la producción de citocromo *c* se selecciona de *E. coli*, *P. putida* y *G. oxydans*. El receptor preferido para la producción de 2KGA se selecciona de *E. coli*, *P. putida* y *G. oxydans*, que pueden producir AADH activas con un vector de expresión recombinante adecuado. El receptor preferido para la producción de 2KGA es *G. oxydans* DSM No. 4025. Al receptor para el emparejamiento conjugacional, habitualmente se añade un marcador selectivo; por ejemplo, habitualmente se selecciona resistencia frente a ácido nalidixico o a rifampicina.

El citocromo  $c_{551}$  de la presente invención se puede usar como una fuente para conjugados de proteína-proteína, tales como conjugados de AADH-citocromo  $c_{551}$  construidos con secuencias de ADN que codifican AADH, para mejorar la eficiencia de la transferencia electrónica total como se ejemplifica a continuación.

Ejemplo 1. Preparación de los citocromos  $c_{551}$  I y II

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C excepto que se describa de otro modo.

(1) Cultivo de *G. oxydans* DSM No. 4025

Un medio de cultivo de siembra que contiene 8% de L-sorbose (esterilizada de forma separada), 0,05% de glicerol, 0,25% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,75% de licor de maceración de maíz, 5,0% de levadura de panadero, 0,5% de  $CaCO_3$ , y 0,5% de urea (esterilizada de forma separada), pH 7,0, se distribuyó en un tubo de ensayo (5 ml cada uno). En el medio de cultivo de siembra en el tubo de ensayo, se inoculó una cantidad de un contenido de un asa de siembra de las células de *G. oxydans* DSM No. 4025 que se hicieron crecer en el medio de agar de placas NS2 que contiene 5,0% de D-manitol, 0,25% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,75% de licor de maceración de maíz, 5,0% de levadura de panadero (Oriental Yeast Co., Tokio, Japón), 0,5% de  $CaCO_3$ , 0,5% de urea (esterilizada de forma separada), y 2,0% de agar, pH 7,0 (antes de la esterilización) a 27°C durante cuatro días, y se cultivó a 30°C durante 24 h con agitación. El cultivo de siembra resultante se transfirió a 100 ml del mismo medio de cultivo de siembra como se describe

anteriormente en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, y se cultivó a 30°C durante 24 h con una rotación de 280 rpm. Cada 25 ml del cultivo de siembra preparado como antes se transfirió a 500 ml de medio de producción que contiene 10% de L-sorbose (esterilizada separadamente), 0,05% de glicerol, 1,6% de urea (esterilizada separadamente), 0,25% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 6,25% células de levadura de panadero, 1,5% de  $CaCO_3$  (grado de producción, Nacaraitesque, Kioto, Japón), y 3,0% de licor de maceración de maíz, pH 7,5 (antes de la esterilización) en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml, y se cultivó a 30°C durante 35-40 h con una rotación de 180 rpm. Después de cultivar, los materiales sólidos tales como las células de levadura de panadero y el  $CaCO_3$  se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad (500 x g, 15 min.), dos veces. Después, las células de *G. oxydans* DSM No. 4025 se cosecharon mediante centrifugación a 10.000 x g durante 15 min. Las células se resuspendieron en 25 mM de Tris-HCl, 0,9% de NaCl, 0,09% de KCl, 10 mM de  $CaCl_2$ , 5 mM de  $MgCl_2$ , 5% de sacarosa, y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfanilo (PMSF), pH 8,0, y la suspensión celular se centrifugó a 500 x g durante 15 min. para eliminar los materiales sólidos, después las células se recogieron centrifugación a 10.000 x g durante 15 min., y se almacenaron a -20°C hasta el uso.

#### (2) Preparación de la fracción soluble

Las células obtenidas de un cultivo de 10 litros (peso seco 40 g) se suspendieron con 60 ml de 25 mM de Tris, 5 mM de  $CaCl_2$ , pH 8,0, y se destruyeron haciéndolas pasar dos veces a través de una prensa francesa (1500 kg/cm<sup>2</sup>). A la disolución se le añadió ADNasa y  $MgCl_2$  a la concentración final de 0,01 mg/ml y 1 mM, respectivamente, y el desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 6.000 x g durante 10 min. A partir del extracto libre de células (8.800 mg de proteínas totales) preparado como antes, la fracción soluble que contiene citocromos se separó mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 90 min., y se dializó frente a 25 mM de Tris, 5 mM de  $CaCl_2$ , pH 8,0.

#### (3) Cromatografía en columna de DEAE-Toyopearl 650M

La fracción soluble se sometió a una columna de DEAE-Toyopearl 650M (TOSOH Corp., Tokio, Japón; 2,5 ID. x 45 cm) que se había equilibrado con 25 mM de Tris, 5 mM de  $CaCl_2$ , pH 8,0. Después de lavar la columna con 400 ml del mismo tampón, se llevó a cabo la elución mediante 2000 ml de un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en el tampón. La banda de color rojo oscuro que muestra un pico de absorción de la diferencia 412 nm menos 480 nm a una concentración de alrededor de 0,13 M de NaCl se recogió como la fracción principal de citocromo.

#### (4) Cromatografía en columna Butil-Toyopearl 650S

La fracción principal de citocromo se diluyó con el mismo volumen de 25 mM de Tris, 80% de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado, pH 8,0 con agitación suave, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos para eliminar los materiales insolubles, y se aplicó a una columna de Butil-Toyopearl 650S (TOSOH; 2,5 ID. X 20 cm), que se había equilibrado con 25 mM de Tris, 40% de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado, pH 8,0. Tras lavar con 200 ml del mismo tampón, la elución se llevó a cabo mediante 1000 ml de un gradiente lineal de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado de 40-0% en el tampón. Una banda de citocromo que eluyó a una concentración de alrededor de 20% de  $(NH_4)_2SO_4$  saturado se recogió y se concentró hasta 2,5 ml usando un ultrafiltro PM-10 en  $N_2$  gaseoso.

#### (5) Filtración en gel de Sephacryl S-100HR

La fracción de citocromo se cargó en una columna de Sephacryl S-100HR (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia; 2,5 ID. x 90 cm) que se había equilibrado con 25 mM de fosfato de sodio, 0,2 M de NaCl, pH 7,2. La columna se desarrolló mediante el mismo tampón, y se recogió una banda de citocromo que presenta un peso molecular de alrededor de 19 kDa.

#### (6) Cromatografía en columna de hidroxilapatito

La fracción principal de citocromo se dializó extensamente frente a fosfato de sodio 0,2 mM/pH 6,8, y se aplicó a la columna de hidroxilapatito: HCA-100S (3,3 x 20 cm; Mitsui Toatsu chemicals Inc., Tokio, Japón), que se había equilibrado con 0,2 mM de fosfato de sodio (pH 6,8). Tras lavar la columna con 200 ml del mismo tampón, la elución se llevó a cabo mediante 2000 ml de un gradiente lineal de fosfato de sodio (pH 6,8) 0,2-18 mM. Durante el gradiente, los citocromos se separaron en dos bandas rojas, y se eluyeron. Por lo tanto, los picos más rápido y más lento se denominaron como los citocromos c<sub>551</sub> I y II, respectivamente. Cada citocromo se dializó frente a 25 mM de MOPS, 0,2 M de NaCl/pH 7,5, se concentró hasta 2,0 ml usando un ultrafiltro PM-10 (Millipore Corp., Bedford, Mass., USA) bajo  $N_2$  gaseoso, y se almacenó a -80°C. Finalmente, se obtuvieron 37,4 mg de citocromo c<sub>551</sub> I y 42,6 mg de citocromo c<sub>551</sub> II a partir de 8800 mg de proteína celular total.

#### (7) Pureza de los citocromos c<sub>551</sub> I y II

En la cromatografía en columna con hidroxilapatito (etapa final de purificación), cada citocromo se eluyó como un único pico con relación de absorción constante de 280/410 nm. En los análisis de SDS-PAGE y PAGE nativo, cada citocromo mostró una única banda de proteína cuando se tñó, o una banda roja visible cuando no se tñó. Se

determinó que los pesos moleculares del citocromo  $c_{551}$  I y II eran 18,0 +/- 1,0 y 16,8 +/- 1,0 kDa, respectivamente, mediante análisis de SDS-PAGE.

(8) Capacidad para aceptar electrones de los citocromos  $c_{551}$  I y II puros procedentes de la AADH de *G. oxydans* DSM No. 4025

- 5 Se reconstituyó el sistema de producción de 2-KGA que contiene las siguientes proteínas definidas y purificadas. El sistema consistió en 12  $\mu$ M de AADH (purificada a partir de *G. oxydans* DSM No. 4025 mediante el método descrito por A. Asakura y T. Hoshino en la Publicación de Patente Europea nº 606621), 14,4  $\mu$ M de citocromos  $c_{551}$  I y II (mezcla 1:1), 250  $\mu$ M de citocromo *c* tipo VI de corazón de caballo (adquirido de Sigma, St. Louis, Mo, USA), 12,5 unidades/ml de citocromo *c* oxidasa tipo *aa3* de corazón bovino (adquirida de Sigma), y 50 mM de tampón MOPS, pH 7,5, que contiene 50 mg/ml de L-sorbosa, 5 mg/ml de seroalbúmina bovina (fracción V, adquirida de Sigma) y 0,2 M de NaCl. En el sistema de producción de 2-KGA, el citocromo *c* tipo VI de corazón de caballo y la citocromo *c* oxidasa tipo *aa3* de corazón bovino catalizaron la reoxidación del citocromo *c* bacteriano, los citocromos  $c_{551}$  I y II, con reducción de oxígeno. Tras la reacción con incubación aerobia a 25°C durante 15 horas, se acumularon alrededor de 8 mM de 2-KGA. Pero, en ausencia de los citocromos  $c_{551}$  I y II, la acumulación de 2-KGA fue menor que 0,2 mM. Esta producción de 2-KGA dependiente de los citocromos  $c_{551}$  I y II indicó que los citocromos  $c_{551}$  I y II fueron aceptores efectivos de electrones por el ciclo catalítico de AADH productor de 2-KGA.

Ejemplo 2. Clonación del gen del citocromo  $c_{551}$

(1) Amplificación del gen parcial del citocromo  $c_{551}$  mediante el método de la PCR

- 20 Se llevó a cabo una PCR usando los cebadores *c1*, *c5*, *c6* y sus secuencias antisentido (*c1R*, *c5R*, *c6R*), que se sintetizaron según las secuencias de aminoácidos de la proteína del citocromo  $c_{551}$  purificada, con un sintetizador de ADN Applied Biosystems 381A (USA), como se muestra en la Fig. 2. La reacción de PCR se llevó a cabo usando el kit de reactivos de amplificación de ADN GeneAmp™ (Takara Shuzo, Kioto, Japón), con el termociclador de Perkin-Elmer Cetus Instruments, según las recomendaciones del proveedor. La reacción consistió en 30 ciclos de 1) etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 min.; 2) etapa de hibridación a 48 ó 40°C durante 2 min.; y 3) etapa de síntesis a 72°C durante 3 min. La mezcla de reacción (50  $\mu$ l) contenía 200  $\mu$ M de dNTP, 6,4  $\mu$ M de cada cebador (degeneración 32), 250 ng de ADN cromosómico de *G. oxydans* DSM No. 4025, y 2,5 u de Taq polimerasa, en el tampón suministrado. Cuando el producto de la PCR se marcó con  $^{32}$ P, se añadieron a la mezcla de reacción 0,74 MBeq de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP y 40  $\mu$ M de dCTP, en lugar de 200  $\mu$ M de dCTP. La PCR con los cebadores *c5* y *c1R* produjo un ADN de 50 pb, mientras que las PCR con la otra combinación de cebadores no produjo o produjo muchas bandas de ADN.

(2) Clonación y secuenciación nucleotídica del fragmento de ADN de 50 pb amplificado mediante PCR

El fragmento de ADN de 50 pb amplificado mediante PCR se clonó en el sitio *Sma* I de pUC18 y se secuenció mediante el método de terminación de cadena didesoxi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463 - 5467, 1977). La secuencia nucleotídica determinada de este fragmento de 50 pb fue

35 5'-ATCAACAACAAGTATGCTGACAAGCCGCTGCTGGACTACTTCAACTACAC-3'

(listado de secuencia SEC ID NO. 6)

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de esta secuencia nucleotídica en el primer marco (IleAsnAsnLysTyrAlaAspLysProLeuLeuAspTyrPheAsnTyrThr) incluye las secuencias de aminoácidos (IleAsnAsnLysTyrAla, AspTyrPheAsnTyrThr) que se usaron para preparar cebadores.

- 40 (3) Análisis de transferencia Southern del ADN cromosómico de *G. oxydans* DSM No. 4025 usando como sonda un oligonucleótido de 50 bases

Las transferencias Southern preparadas a partir del ADN cromosómico de *G. oxydans* DSM No. 4025 digerido con diversas enzimas de restricción, incluyendo *Eco*RI, se sondaron mediante el oligonucleótido de 50-mero que se sintetizó mediante el sintetizador de ADN y se marcó con  $^{32}$ P basándose en la información de secuencia de las 50 bases mencionadas anteriormente. La sonda se hibridó sólo al fragmento de *Eco*RI de 2,5 kb. Este resultado indica que el citocromo  $c_{551}$  se produce sólo a partir de un gen en el ADN cromosómico.

(4) Clonación del fragmento de *Eco*RI de 2,5 kb que contiene el gen completo de citocromo  $c_{551}$

- 50 El ADN cromosómico de *G. oxydans* DSM No. 4025 se digirió completamente con *Eco*RI, y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de un tamaño de alrededor de 2,5 kb (2-3,5 kb) se separaron por corte y se eluyeron del gel. Los fragmentos de ADN recuperados se ligaron con el vector pUC18, digerido mediante *Eco*RI, para transformar *E. coli* JM109. Se obtuvieron alrededor de 1.000 transformantes y se identificaron mediante hibridación en colonias con, como sonda, el oligonucleótido de 50-mero

5 marcado con <sup>32</sup>P. Por consiguiente, se obtuvo una colonia que muestra una señal potente. Se extrajo ADN plasmídico de la colonia, y se digirió con EcoRI; su fragmento de EcoRI de 2,5 kb mostró una señal potente. El plásmido se denominó pGOC201. El fragmento de EcoRI de 2,5 kb también se clonó en el vector pVK100 (Knauf, V. C., et al., Plasmid 8:45 - 54, 1982) para generar los plásmidos pGOC101 y pGOC101R, que tienen el fragmento de EcoRI de 2,5 kb en dirección opuesta.

(5) Secuenciación nucleotídica del gen completo del citocromo *c<sub>551</sub>*

10 La secuencia nucleotídica del gen del citocromo *c<sub>551</sub>* se determinó mediante el método de terminación de cadena didesoxi. Se secuenció un fragmento de EcoRI-SmaI de 1,7 kb, y se encontró en el fragmento un marco de lectura abierto (ORF de 507 pb que existe en la secuencia mostrada en el listado de secuencias SEC ID NO. 1). Este ORF codifica una proteína de 168 aminoácidos (listado de secuencias SEC ID NO. 2), que contiene los tres tramos consistentes con las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos derivados de las digestiones del citocromo *c<sub>551</sub>* (listado de secuencias SEC ID NO. 3-5). El ORF también contenía una secuencia señal típica; la secuencia señal se escinde posiblemente después de los restos ALA para generar los 25 restos de MetLysAsnLysTbrThrLeuGlyGlyAlaLeuAlaLeuAlaAlaLeuLeuAlaGlyThrThiGlyAla LeuAla y los 143 restos de la secuencia madura. El peso molecular del citocromo *c<sub>551</sub>* maduro calculado a partir de la secuencia fue 14.836. Este valor fue en cierto modo más pequeño que los pesos moleculares aparentes del citocromo *c<sub>551</sub>* I y II (18.000 y 16.800) estimados con SDS-PAGE. A la mitad de la proteína madura (restos n° 51 a 55), se encontró CysAlaSerCysHis como una secuencia de consenso de unión a hemo, CysXaaXaaCysHis.

(6) Subclonación del gen del citocromo *c<sub>551</sub>* mediante el método de la PCR.

20 El fragmento de 744 pb que contiene las secuencias de flaqueo de 5' de 117 pb y de 3' de 120 pb del ORF (507 pb) se amplificó mediante PCR con cebadores etiquetados con el sitio EcoRI. La clonación de los fragmentos amplificados en los vectores pVK100 generó los plásmidos pGOC102 y pGOC102R, que tienen el fragmento de 744 pb en dirección opuesta. La clonación del fragmento de 744 pb en pMMB22 (Bagdasarian, M., et al., Gene 26: 273 - 282, 1983) generó el plásmido pGOC 402.

25 Ejemplo 3. Expresión del gen del citocromo *c<sub>551</sub>* en *E. coli*, *P. putida*, y *G. oxydans* DSM No. 4025

(1) Expresión del gen del citocromo *c<sub>551</sub>* en *E. coli*

30 El extracto libre de células de JM109 de *E. coli*, que posee pGOC402 o pMMB22, se sometió a análisis de transferencia Western. Las células de *E. coli* se hicieron crecer en LB toda la noche con 50 µg/ml de ampicilina, y después se inocularon alícuotas del 1% en 5 ml de medio reciente. Después de cultivar 4 horas, el cultivo se continuó una hora más con o sin adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Las células se cosecharon y se suspendieron en agua. Después de determinar la concentración de proteína, la suspensión celular se diluyó hasta una concentración de 2 mg de proteína/ml en tampón de Laemmli que consiste en 62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,5), 10% de glicerol, 2% de SDS y 5% de β-mercaptoetanol, y se hirvió durante 3 min. Treinta µg de los extractos libres de células se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (15%). Las bandas de proteína resultantes en el gel se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa con un aparato de electrotransferencia semiseco (Trans-blot SD, Bio-Rad, Hercules, Calif., USA) que funciona a 25V durante 1 hora en tampón de 2,5 mM de Tris-19,2 mM de glicina, pH 8,6, que contiene 20% de metanol. La proteína del citocromo *c<sub>551</sub>* se visualizó mediante el tratamiento con antisuero anti-citocromo *c<sub>551</sub>*, conjugado de anti-IgG de conejo de cabra con peroxidasa de rábano picante, peróxido de hidrógeno, y reactivos que desarrollan el color, como se recomienda por el proveedor (KONICA Co., Tokio, Japón). Las células que poseen pGOC402, preparadas con o sin inducción mediante IPTG, expresaron dos bandas positivas (alrededor de 30 ng o 10 ng de citocromo *c<sub>551</sub>* en total por 30 µg de extracto libre de células, respectivamente), mientras que las células que poseen pMMB22 no las expresan. Los valores R<sub>f</sub> de estas bandas fueron idénticos a los del citocromo *c<sub>551</sub>* I y II purificado, indicando que el citocromo *c<sub>551</sub>* I y II son expresados a partir de un gen y modificados post-traduccionalmente o post-transcripcionalmente.

45 (2) Expresión del gen del citocromo *c<sub>551</sub>* en *P. putida*

50 Primeramente, se introdujeron pGOC402 y pMMB22 en *P. putida* ATCC 21812 resistente a ácido nalidíxico (Nal<sup>r</sup>), mediante el método de emparejamiento conjugacional triparental llevado a cabo según lo siguiente. Células de Nal<sup>r</sup> *P. putida* ATCC 21812 se cultivaron a 30°C en 5 ml de medio MB que consiste en 2,5% de manitol, 0,5% de extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) y 0,3% de Bactotrypton (Difco). Las cepas donantes, JM109 de *E. coli* que posee pGOC402 (resistente a estreptomycin: Sm<sup>r</sup>) o pMMB22 (Sm<sup>r</sup>), y una cepa auxiliar, HB101 de *E. coli* que posee pRK2013 (Km<sup>r</sup>, Figurski, D. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648 - 1652, 1979), se hicieron crecer en medio LB que contiene antibióticos apropiados, toda la noche a 37°C. Estos cultivos nocturnos (2 ml cada uno) se centrifugaron independientemente, y los peletes celulares se suspendieron independientemente en 2 ml de medio MB. Se mezclaron cien µl de cada una de las suspensiones celulares, y cincuenta µl de la suspensión celular mixta se colocaron como manchas sobre un filtro de nitrocelulosa colocado sobre la superficie de medio de agar FB que consiste en 5% de fructosa, 1% de extracto de levadura (Difco), 1% de Polypepton (Wako Pure Chemical Industries

Ltd., Osaka, Japón), y 1,8% de agar. La placa se incubó a 27°C toda la noche. Las células resultantes se extendieron sobre medio de agar MB que contiene 50 µg/ml de ácido nalidíxico y 50 µg/ml de estreptomicina (placa de agar MNS). Los transconjugantes así obtenidos se purificaron rayando en placa de agar MNS, para eliminar células de *E. coli* y *P. putida* libre de plásmido.

- 5 El extracto libre de células del transconjugante de *P. putida* que posee pGOC402 o pMMB22 se preparó a partir de las células que se hicieron crecer toda la noche en medio MB que contiene 50 µg/ml de estreptomicina con o sin adición de 10 mM de IPTG, y se sometió a análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 3-1. Las células que poseen pGOC402, preparadas con o sin inducción mediante IPTG, expresaron dos bandas positivas (alrededor de 30 y 10 ng de citocromo  $c_{551}$  en total por 20 µg de extracto libre de células, respectivamente), mientras que las células que poseen pMMB22 no lo hicieron.

### (3) Expresión del gen del citocromo $c_{551}$ en GOS2R y GORS6-35

Los plásmidos que poseen el gen del citocromo  $c_{551}$  en pVK100 en ambas direcciones (pGOC101 y pGOC 101R) se introdujeron en un derivado de *G. oxydans* DSM No. 4025 resistente a rifampicina, GOS2R (T. Hoshino et al., Publicación de Patente Europea nº 0832974), mediante método de emparejamiento conjugacional triparental. Células de GOS2R se cultivaron a 30°C en 10 ml de medio T, que consiste en 3% de caldo de soja tripticasa (Becton Dickinson, Cockeysville, Md., USA) y 0,3% de extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) con 100 µg/ml de rifampicina. Las cepas donantes, HB101 de *E. coli* que poseen pGOC101, (Tc<sup>r</sup>), pGOC101R (Tc<sup>r</sup>) o pVK102 (Km<sup>r</sup>), y una cepa auxiliar, HB101 de *E. coli* que posee pRK2013 (Km<sup>r</sup>), se hicieron crecer en medio LB que contiene antibióticos apropiados, toda la noche a 37°C. Estos cultivos durante toda la noche (10 ml de cultivo de GOS2R y 2 ml de cultivo de *E. coli*) se centrifugaron de forma independiente, y los peletes celulares se suspendieron independientemente en 2 ml de medio T. Se mezclaron cien µl de cada una de las suspensiones celulares, y cincuenta µl de la suspensión celular mixta se colocaron como manchas sobre filtro de nitrocelulosa colocado sobre la superficie de medio de agar NS2 descrito en el Ejemplo 1-(1). La placa se incubó a 27°C toda la noche. Las células resultantes se extendieron sobre medio de agar T que contiene 100 µg/ml de rifampicina y 3 µg/ml de tetraciclina (paca de agar TRT). Los transconjugantes así obtenidos se purificaron rayando sobre la placa de agar TRT para eliminar células de *E. coli* y GOS2R libre de plásmido. Las células de los transconjugantes que se hicieron crecer sobre placas de agar NS2 se sometieron a análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 3-(1). La Figura 3 muestra que GOS2R que posee pGOC101 o pGOC101R produjo más proteínas inmunológicamente positivas que GOS2R que posee pVK102; la relación de la amplificación parece ser alrededor de dos veces.

Los plásmidos pGOC101 y pGOC102 se introdujeron en un derivado de *G. oxydans* DSM No. 4025 resistente a rifampicina, GORS6-35 (productor elevado de 2KGA a partir de L-sorbosa, T. Hoshino et al., Publicación de Patente Europea nº 0832974) mediante una conjugación triparental como se describe anteriormente. El plásmido pGOC101 se introdujo a una frecuencia baja ( $< 10^6$  transconjugantes por receptor), mientras que el plásmido pGOC102 se introdujo a una frecuencia mayor (aprox.  $10^4$  transconjugantes por receptor). Uno de los transconjugantes típicos que posee pGOC101, GORS6-35 (pGOC101)-1, mostró un crecimiento muy pobre y una baja estabilidad del plásmido (50%) como se muestra en la Tabla 1, sugiriendo que la presencia o expresión del gen del citocromo  $c_{551}$  tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hospedante, lo que da como resultado la amplificación de células libres de plásmido durante el crecimiento. Otro transconjugante, GORS6-35 (pGOC101)-2, cambió para mostrar un buen crecimiento y una estabilidad del plásmido muy elevada (>99%), después de varias transferencias sobre medio de agar NS2 que contiene 30 µg/ml de tetraciclina. Esta alteración espontánea en el crecimiento parece que ha resultado de la adaptación del hospedante al estrés por sobreexpresión de citocromo  $c_{551}$ . Por el contrario, el transconjugante que posee pGOC102 mostró un buen crecimiento y una elevada estabilidad del plásmido (88%).

Los contenidos del citocromo  $c_{551}$  en las cepas que se hicieron crecer en el medio de producción que contiene 10% de L-sorbosa se determinaron cuantitativamente mediante los espectros de la diferencia de la forma reducida menos la forma oxidada. El análisis cuantitativo del citocromo  $c_{551}$  se llevó a cabo con un espectrofotómetro Shimadzu (Kioto, Japón) UV-2200 según lo siguiente. Las cepas del derivado GORS6-35 se cultivaron en el medio de producción que contiene células de levadura de panadero descrito en el Ejemplo 1, durante 4 días. Después de eliminar el CaCO<sub>3</sub> y las células de levadura de panadero mediante centrifugación dos veces a 1.000 rpm durante 10 min., las células se cosecharon mediante centrifugación durante 10 min. a 8.000 rpm. Las células cosechadas se lavaron con 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5) que contiene 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón. La suspensión celular se hizo pasar dos veces a través de una prensa francesa destructora de células (1.500 kg/cm<sup>2</sup>), y el desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. El extracto bruto resultante se ultracentrifugó a 45.000 rpm durante 1 hora. El sobrenadante se usó para determinar el contenido de citocromo  $c_{551}$  mediante los espectros de la diferencia de la forma reducida menos la forma oxidada. Para la oxidación del citocromo, la muestra se trató con 2 mM de ferricianuro potásico en 100 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0), mientras que, para la reducción, se trató con 0,1% de borohidruro sódico, en lugar de ferricianuro. La concentración de citocromo  $c_{551}$  (C) en el sobrenadante se da mediante la siguiente ecuación:

$$C = E((A_{551} - A_{541})_{red} - (A_{551} - A_{541})_{ox})$$

$$E(\text{coeficiente de extinción molar}) = 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

5 En la Tabla 1 se muestra el nivel de expresión de citocromo  $c_{551}$  en GORS6-35 (pGOC101)-1, GORS6-35 (pGOC101)-2, GORS6-35 (pGOC102) o GORS6-35 (pVK102). GORS6-35 (pGOC101)-2 y GORS6-35 (pGOC102) expresaron 1,6 y 1,3 veces más citocromo  $c_{551}$  que lo que lo hizo GORS-6-35 (pVK102).

Tabla 1

Cepas	Estabilidad del plásmido (%)	Contenido de citocromo $c_{551}$ * (nmoles/mg de proteína soluble)
GORS6-35 (pVK102)	91	0,807
GORS6-35 (pGOC101)-1	50	0,733
GORS6-35 (pGOC101)-2	> 99	1,297
GORS6-35 (pGOC102)	88	1,070

\*: El contenido contiene aquellos de tanto el citocromo  $c_{551}$  I como II.

El incremento del contenido de citocromo  $c_{551}$  en GORS6-35 que posee pGOC102 sugiere que el promotor original del gen del citocromo  $c_{551}$  existe posiblemente dentro de los 117 pb en dirección de su gen de estructura.

10 Ejemplo 4. Producción de 2KGA a partir de L-sorbosa mediante GORS6-35 amplificado mediante citocromo  $c_{551}$

Se inoculó *B. megaterium* DSM No. 4026 (Publicación de Patente Europea 0278477) procedente de un medio inclinado de agar SCM (Tabla 2) en 150 ml de SCM. En el mismo medio de cultivo de siembra SCM, se inocularon células de GORS6-35 (pGOC101)-2 o GORS6-35 (pVK102) procedentes de un cultivo de agar en el medio NS2 que contiene 30  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina, o células GORS6-35 o *G. oxydans* DSM No. 4025 procedentes de un cultivo de agar en el medio NS2. El cultivo de siembra se continuó hasta que el pH del caldo estuvo entre 6,5 y 6,0 a 30°C; habitualmente tarda 15 a 24 h. La porción (7,5 ml) del caldo de siembra se inoculó en 50 ml de medios de producción (Tabla 3) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Estas fermentaciones principales se llevaron a cabo a 30°C, 180 rpm en un agitador giratorio durante 5 días. Como se muestra en la Tabla 4, la fermentación mixta que usa GORS6-35 (pGOC101)-2 dio como resultado una mejor productividad de 2KGA que aquellas mediante *G. oxydans* DSM No. 4025, GORS6-35, y GORS6 (pVK102): producción más rápida de 2 KGA a partir de 11% de L-sorbosa, y producción más rápida y mayor rendimiento a partir de 14% de L-sorbosa. La cepa recombinante produjo 105,1 g/l de 2KGA a partir de 11% de L-sorbosa en 3 días, y 130,8 y 133,3 g/l a partir de 14% de L-sorbosa en 4 y 5 días, respectivamente, mientras que el vector control GORS6-35 (pVK100) produjo 96,3 g/l de 2KGA a partir de 11% de L-sorbosa en 3 días, y 99,9 y 112,6 g/l a partir de 14% en 4 y 5 días, respectivamente.

Tabla 2. Medio de cultivo de siembra (SCM)

Ingrediente	Conc. (%)
Extracto de levadura	0,3
Extracto de carne de res	0,3
Licor de maceración del maíz	0,3
Peptona	1,0
Urea	0,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
CaCO <sub>3</sub> *	0,1
L-Sorbosa	2,0

---

pH 7,1

---

\*: El CaCO<sub>3</sub> se añadió después de ajustar el pH.

150 ml del medio en un matraz Erlenmeyer de 500 ml

Para el medio inclinado de agar SCM, se añadieron 2% de agar al medio SCM

---

Tabla 3. Medio de producción

L-Sorbosa*	11 %	14 %
Urea*	2,4	3,1
CSL	1,6	2,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,016	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	0,2
CaCO <sub>3</sub> **	0,8	1,0

---

pH 6,7

---

\*: La L-sorbosa y la urea se sometieron a autoclave de forma separada.

\*\* : El CaCO<sub>3</sub> se añadió después de ajustar el pH.

100 ml del medio en un matraz Erlenmeyer de 500 ml

---

Tabla 4

Cepa	Conc. de sorbosa (% p/v)	2KGA producido (g/l)		
		3 días	4 días	5 días
GORS6-35 (pGOC101)-2	11	105,1	106,2	
	14	103,1	130,8	133,3
GORS6-35 (pVK102)	11	96,3	106,9	
	14	84,1	99,9	112,6
GORS6-35	11	95,5	104,7	
	14	90,6	104,7	104,8
DSM No. 4025	11	102,2	106,4	
	14	81,8	95,6	107,7

---

Ejemplo 5. Producción de 2KGA mediante el transconjugante de *P. putida* que posee el gen del citocromo  $c_{551}$  junto con genes de AADH de *G. oxydans* DSM No. 4025

Se construyeron cuatro transconjugantes para  $\text{Nal}^r$  *P. putida* ATCC 21812, *P. putida* que posee pSSA102R (vector pVK100 que posee un fragmento de ADN de 2,7 kb que incluye el gen de la Enzima A clonado a partir de *G. oxydans* DSM 4025; el gen que codifica la AADH que convierte L-sorbosa en 2KGA; T. Hoshino et al., Solicitud de Patente Europea n° 9611500.8) y pGOC402, *P. putida* que posee pVK102 y pGOC402, *P. putida* que posee pSSA102R y pMMB22, y *P. putida* que posee pVK102 y pMMB22, mediante el método de emparejamiento conjugacional triparental como se describe en el Ejemplo 3-(2). Las células de estos cuatro transconjugantes mantenidas en el medio de agar MB que contiene 10  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina se inocularon en 10 ml de medio MB suplementado con 10  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina, 50  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina y 10 mM de IPTG, y se incubaron a 30°C durante 18 h. Las células resultantes se centrifugaron y se lavaron con NaCl al 0,9%. La mezcla de reacción de células en reposo, que consiste en 20 unidades de  $\text{OD}_{600}$  de células, 4% de L-sorbosa, 0,3% de NaCl, 1% de  $\text{CaCO}_3$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  de pirroloquinolina quinona (PQQ), se incubó a 30°C durante 48 h con agitación. La cantidad de 2KGA producida mediante *P. putida* que posee pSSA102R y pGOC402 fue 36,4 g/l, mientras que las de las otras tres cepas estaban por debajo de 0,5 g/l. La expresión del citocromo  $c_{551}$  proporcionó un enlace fisiológico desde AADH de *G. oxydans* DSM No. 4025 a la cadena de transporte de electrones de *P. putida*.

Ejemplo 6. Conjugado de AADH citocromo  $c_{551}$

Los plásmidos con el gen que codifica conjugados de AADH-citocromo  $c_{551}$  se construyeron como se ilustra en la Fig. 4. Aquí, como genes de AADH, se usaron los genes de la Enzima A/B3 y la Enzima B (T. Hoshino et al., Solicitud de Patente Europea n° 9611500.8). El ligador entre AADH y el citocromo  $c_{551}$  se construyó imitando ADH de *A. acetii* (Inoue T. et al., J. Bacteriol. 171:3115-3122, 1989). Los plásmidos se introdujeron en  $\text{Nal}^r$  *P. putida* ATCC 21812, y el transconjugante resultante se sometió al análisis de transferencia Western con el anticuerpo preparado contra AADH o citocromo  $c_{551}$ . El análisis mostró que los conjugados construidos contenían el polipéptido tanto de AADH como de citocromo en una molécula. Los transconjugantes que poseen el gen del conjugado de Enzima A/B3-citocromo  $c_{551}$  y el gen del conjugado Enzima B-citocromo  $c_{551}$  se usaron en la reacción de células en reposo como se describe en el Ejemplo 5. Como resultado, los primeros transconjugantes produjeron 7,8 g/l de 2KGA a partir de 40 g/l de L-sorbosa, y los últimos produjeron 9,0 g/l de L-sorbosa a partir de 40 g/l de D-sorbitol en 40 h.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### 30 (1) INFORMACIÓN GENERAL

###### (i) SOLICITANTE

NOMBRE: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DIRECCIÓN: Grenzacherstrasse 124

CIUDAD: Basilea

35 PAÍS: Suiza

CÓDIGO POSTAL: CH-4070

TELÉFONO: 061 - 688 25 05

FAX: 061 - 688 13 95

TELEX: 962292/965542 hlr c

40

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nuevo Citocromo c

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6

(iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco

45 (B) ORDENADOR: Macintosh

(C) SISTEMA OPERATIVO: Macintosh

(D) PROGRAMA: Microsoft Word 5.1a

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID NO. 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 744 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 1:

```

CAAGGCGGAG TTGTCCGGCA AAGACTGACA TTTCTGTTG CGGCCGTTAT ATAGGGGCTG 60
CTCGCAGATG TCGGCACCTT GTCCGGCCTG CGACGCAGCA AGGTAAAGGA AGCTAAAATG 120
AAAAACAAA CCACTCTGGG CGGGCGCCTT GCACTTGCGAG CACTGCTGGC CGGAACGACC 180
GGGGCACTGG CGTTCAGCAA CATCGAACGT CCCGCACCGG CCGCTGATAC TGCAGCTACC 240
GAAGAAGCAC CTGCTGCCGC TGCTGGCGCC GCCACTTCGA TCTACGACGG CGTTTACTACT 300
GCAGCCCAGG CCGAAGCTGG CCAGGCTGCA TGGATGACCA GCTGCGCAAG CTGCCACGGC 360
CCGACCGCTC GCGGCTCGTC GGGTGGTCCG CGCGTTATCG GCCCTGTTCAT CAACAACAAG 420
TATGCTGACA AGCCGCTGCT GGACTACTTC AACTACACCC GCGACAACAT GCCGATGGGC 480

GCGCCTCACT CGTTGAGCGA CGATACCTAT GTTGAAATCG TTGCGTTCAT TCTGCAATCG 540
CACGGCGCAG AGCCGGGCGA GACGGAAGTG ACCTCGGACG AAGCGCTGCT CGGCAGCCTG 600
ATGATGGGCC GTAACCCCAA CTAAACGCAG GGTGCGCAAC CGCTTGACGG TAAGCAACCT 660
ACCAGATTGG CCGGCTACGG TCGGCCAATC CTCCTTTACC AACCCCTCCAT CCCAAACAAG 720
GTAAAACCTG ATGAAGACGT CGTC 744
    
```

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 168 restos
- (B) TIPO: aminoácido
- 15 (C) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 2:

```

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

Asn Pro Asn
          143

```

(3) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 52 restos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 3:

5

Ala Asp Thr Ala Ala Thr Glu Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Asp Gly Val Tyr Thr Ala Ala Gln Ala  
 20 25 30  
 Glu Ala Gly Gln Ala Ala Trp Met Thr Ser Xaa Ala Ser Xaa His  
 35 40 45  
 Gly Pro Thr Ala Arg Gly Ser  
 50 52

(4) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 restos

5 (B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 4:

Gly Pro Arg Val Ile Gly Pro Val Ile Asn Asn Lys Tyr Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Leu Leu Asp Tyr Phe Asn Tyr Thr Arg Asp Asn Met Pro  
 20 25 30  
 Met Gly Ala Pro His Ser Leu Ser Asp Asp Thr Tyr Val Glu  
 35 40 44

(5) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 5:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 restos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 5:

Ile Leu Gln Ser His Gly Ala Glu Pro Gly Glu Thr Glu  
 1 5 10 13  
 15

(6) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO. 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 50 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO. 6:

ATCAACAACA AGTATGCTGA CAAGCCGCTG CTGGACTACT TCAACTACAC 50

## REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica, con la expresión en una célula hospedante procarionta o eucariota, un polipéptido que tiene actividad de citocromo c, seleccionándose dicha secuencia de ADN entre:
- 5 (a) la secuencia de ADN identificada mediante SEC ID NO: 1 o la hebra complementaria de la misma;
- (b) secuencias de ADN que tienen actividad de citocromo c que se hibridan a las secuencias de ADN definidas en (a) en condiciones estándar, que se usan para detectar señales de hibridación específicas, y
- (c) secuencias de ADN que, salvo por la degeneración del código genético, se hibridarían a las secuencias de ADN definidas en (a) o (b) que tienen actividad de citocromo c, y cuyas secuencias codifican un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos.
- 10 2. Una secuencia de ADN como se especifica en la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de ADN que codifica un polipéptido que tiene actividad de alcohol/aldehído deshidrogenasa.
3. Un polipéptido que tiene actividad de citocromo c y que es codificado por una secuencia de ADN según se reivindica en la reivindicación 1 ó 2.
- 15 4. Un polipéptido según la reivindicación 3, que tiene actividad de citocromo c obtenible u obtenido a partir de un microorganismo que pertenece al género *Gluconobacter* seleccionado del grupo que consiste en citocromos c551 I y II que muestran respectivamente las siguientes propiedades fisicoquímicas:
- (a) peso molecular de  $18,0 \pm 1$  kDa para c551 I y  $16,8 \pm 1,0$  kDa para c551 II según se determina mediante análisis de SDS-PAGE;
- 20 (b) máximos de absorción de la forma reducida a 551 nm, 522 nm y 417 nm como picos alfa, beta y gamma, respectivamente;
- (c) contenido hemo de 1 mol de hemo/mol de proteína;
- (d) punto isoeléctrico de alrededor de 3,95 para c551 I y 3,75 para c551 II.
- 25 5. Un vector adecuado para la expresión en una célula hospedante procarionta o eucariota, que comprende la secuencia de ADN según se reivindica en la reivindicación 1 ó 2.
6. Una célula hospedante que comprende el vector según la reivindicación 5.
7. Una célula hospedante según se reivindica en la reivindicación 6, célula hospedante en la que se ha integrado en su genoma la secuencia de ADN según se reivindica en la reivindicación 1 ó 2.
- 30 8. Una célula hospedante según se reivindica en la reivindicación 6 ó 7, que es de origen eucariota, y preferiblemente una célula de mamífero o vegetal.
9. Una célula hospedante según se reivindica en la reivindicación 6 ó 7, que es de origen procarionta.
10. Una célula hospedante según la reivindicación 9, seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter acetii*, *Acetobacter hansenii*, y *Gluconobacter oxydans*.
- 35 11. Una célula hospedante según se reivindica en la reivindicación 10, que es *Gluconobacter oxydans* DSM No. 4025.
12. Un procedimiento para producir citocromo c551, que comprende cultivar una célula hospedante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 en un medio de cultivo apropiado, y recuperar el cultivo del citocromo c551.
- 40 13. Uso del citocromo c551 como se reivindica en la reivindicación 1, para la producción de vitamina C.

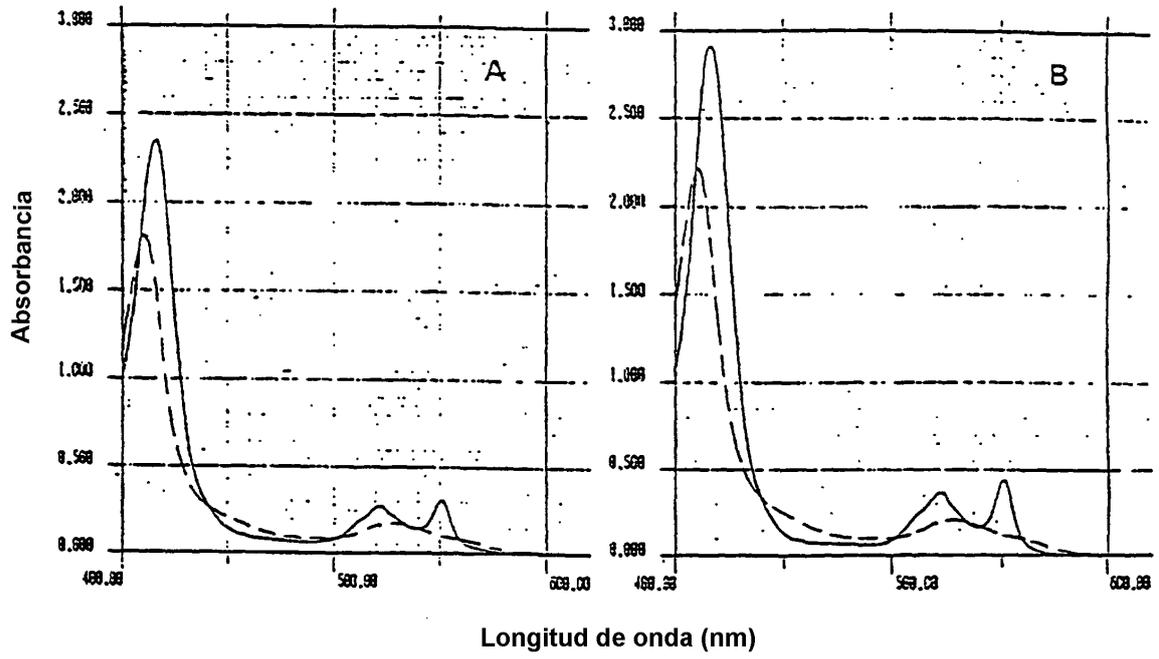


Fig. 1

[A] Secuencias peptídicas determinadas con citocromo *c*<sub>551</sub> II natural

Péptido I:

LysTyrAlaAspLysProLeuLeuAspTyrPheAsnTyrThrArgAspAsnMetProMetGlyAla  
c1

Péptido II:

AlaAspThrAlaAlaThrGluGluAlaProAlaAlaAlaAlaGlyAlaAlaThrSerIleTyrAspGly  
ValTyrThrAlaAlaGlnAlaGluAlaGlyGlnAlaAlaTrpMetThrSer  
c6

IleAsnAsnLysTyrAla  
c5

Péptido III:

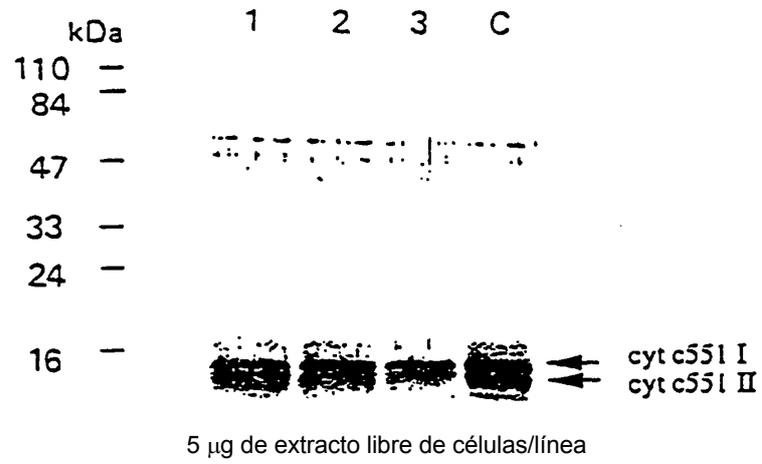
c1, c5 y c6: las secuencias subrayadas se usaron para preparar oligonucleótidos.

\*: Se encontró más tarde que el Péptido III es la secuencia en la cabeza del Péptido I

[B] Oligonucleótidos sintetizados como sondas y cebador

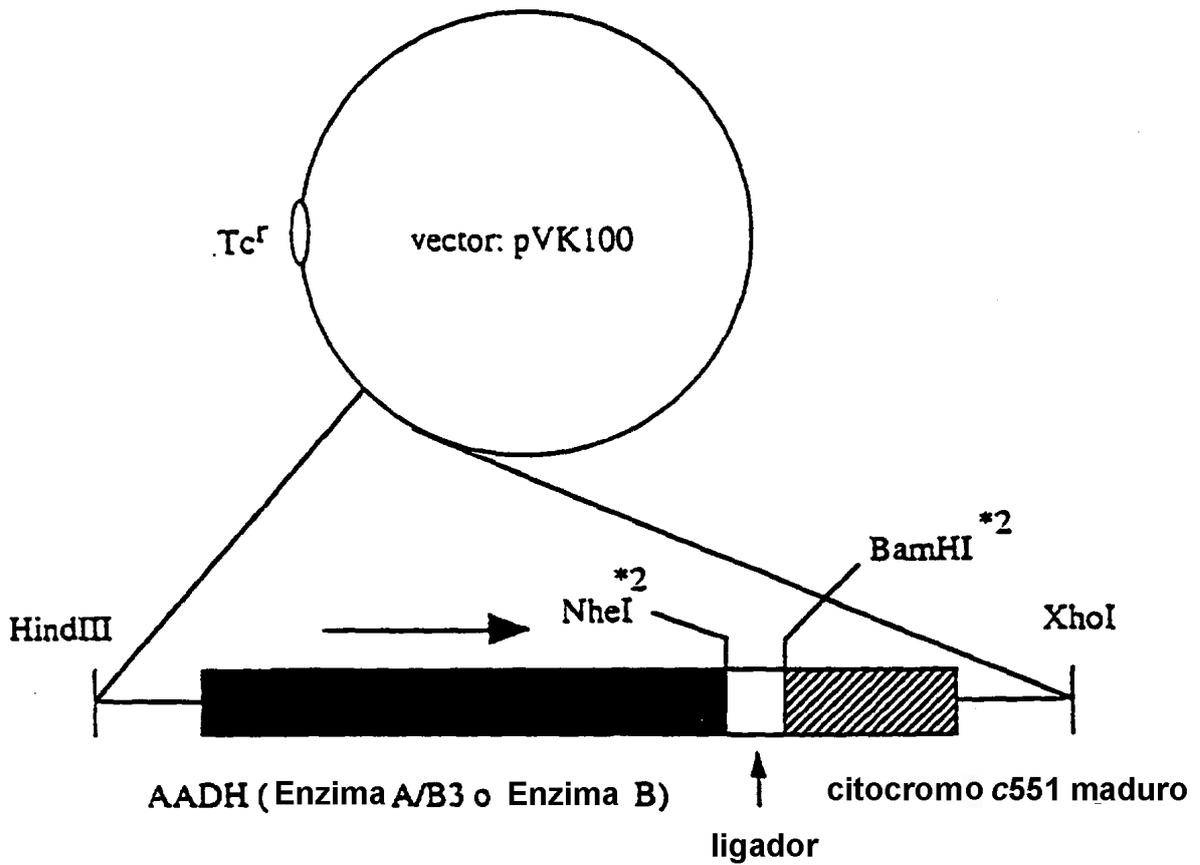
c1: GATTATTTAATTATAC  
C C C C C  
c1R: GTATAATTAAAATAATC  
G G G G G  
c5: ATTAATAATAAATATGC  
C C C G C  
A  
c5R: GCATATTTATTATTAAT  
G C G G G  
T  
c6: CAAGCTGCTTGGATGAC  
G C C  
A A  
G G  
c6R: GTCATCCAAGCAGCTTG  
G G C  
T T  
C C

Fig. 2



1. GOS2R (pG0C101R)
2. GOS2R (pG0C101)
3. GOS2R (pVK102)
- C. cyt c551 I y II purificados (50 ng cada uno)

Fig. 3



El conjugado de AADH-citocromo  $c_{551}$  se construyó a imitación de alcohol deshidrogenasa (ADH) de *A. acetii* que tiene en su C-terminal la secuencia similar al citocromo *c*.

\*1: La secuencia entre el dominio de deshidrogenasa y el dominio de citocromo *c* de ADH (PALNNRGFLPVKPP correspondiente a los aminoácidos 582 a 595 de ADH madura) se usó como un ligador para conectar el dominio de AADH con el dominio de citocromo  $c_{551}$ .

\*2: Los sitios de restricción, Nhe I y Bam HI, se introdujeron para ligar las tres partes (AADH, ligador y citocromo  $c_{551}$ ).

Fig. 4