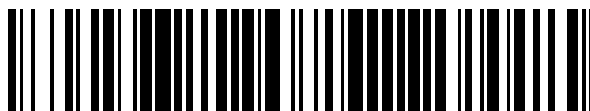


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 057**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2003** **E 03701537 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012** **EP 1472354**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol en organismos transgénicos**

30 Prioridad:

29.01.2002 DE 10203352

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.02.2013

73 Titular/es:

ORGANO BALANCE GMBH (100.0%)

GUSTAV-MEYER-ALLEE 25

13355 BERLIN, DE

72 Inventor/es:

LANG, CHRISTINE y

VEEN, MARKUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 396 057 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

Procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol en organismos transgénicos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol mediante el cultivo de organismos, en particular, levaduras. Asimismo, la invención se refiere a los constructos de ácidos nucleicos que se necesitan para la fabricación de organismos genéticamente modificados, así como a los organismos genéticamente modificados, en particular, las levaduras mismas.

El 7-dehidrocolesterol, también denominado colest-5,7-dienol o provitamina D3, así como sus productos intermedios biosintéticos del metabolismo de los esteroides, como el zimosterol, el farnesol, el geraniol, el escualeno, el lanosterol, el colest-5,7,24-trienol y el colest-5,7,22,24-tetraenol, y sus productos secuenciales biosintéticos del metabolismo de los esteroides, como la vitamina D3 y el colesterol, son compuestos con un alto valor económico.

La importancia económica del 7-dehidrocolesterol estriba sobre todo en la obtención de vitamina D3 a partir de 7-dehidrocolesterol a través de radiación UV.

Así pues, disponer de un procedimiento rentable para la fabricación de 7-dehidrocolesterol tiene una enorme importancia.

Son procedimientos especialmente rentables los procedimientos biotecnológicos que aprovechan los organismos optimizados mediante una modificación genética que fabrican 7-dehidrocolesterol.

Mientras que el metabolismo de los esteroides en bacterias, hongos, levaduras y algunos insectos conduce esencialmente de zimosterol a ergosterol (provitamina D2) a través de fecosterol, episterol, ergosta-5,7-dienol y ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol, el metabolismo de los esteroides en mamíferos conduce esencialmente de zimosterol a 7-dehidrocolesterol (provitamina D3) a través de colest-7,24-dienol y latosterol.

El 7-dehidrocolesterol (provitamina D3) se transforma en colesterol a través de la 7-dehidrocolesterol reductasa y el colesterol, en hormonas esteroideas, corticoides y ácidos biliares como la progesterona, la testosterona, el estradiol, la aldosterona, la cortisona y el colato.

Algunos genes del metabolismo del 7-dehidrocolesterol en mamíferos son conocidos y están clonados, como por ejemplo

ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa humana (también llamada proteína de fijación al emopamilo o EBP), [ACCESSION NM_006579](#) y una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa murina (Braverman, N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3 β -hydroxysteroid- $\Delta 8$, $\Delta 7$ -isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *Nat.Genet.* 22(3), 291-294),

ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa humana (también llamada esterol-C5-desaturasa), [ACCESSION AB016247](#) y una $\Delta 5$ -desaturasa murina (Nishi, S. et al., (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 1490 (1-2), 106-108),

ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa humana (también llamada 24-dehidrocolesterol reductasa o DHCR24), [ACCESSION NM_014762](#) y una $\Delta 24$ -reductasa murina (Waterham, H.R. et al. (2001): Mutations in the 3 β -hydroxysteroid $\Delta 24$ -reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am.J.Hum.Genet.* 69(4), 685-694) y

ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa humana (Chang, C. C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.* 1993, Oct 5;268(28): 20747-55) y una esterol-aciltransferasa murina (Uelman, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26192-201).

Los genes del metabolismo del ergosterol son ampliamente conocidos y están clonados, como por ejemplo

ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa (ERG2) (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids*. Aug; 26(8): 628-32.),

ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa (ERG3) (Arthington, B.A. et al. (1991): Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene*. Jun 15; 102(1): 39-44.),

- 5 ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa (ERG 4) (Lai. M.H. et al., (1994); The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. *Gene*. Mar11; 140(1):41-9.),

ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa (HMG) (Bason M.E. et al, (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* 8: 3797-3808),

- 10 ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa truncada (*t*-HMG) (Polakowski T, Stahl U, Lang C. (1998) Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl. Microbiol Biotechnol*. Jan; 49(1): 66-71),

- 15 ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa (ERG11) (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 45(3):237-45),

ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa (ERG9) (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul15; 88(14): 6038-42),

- 20 ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa (SAT1) y (SAT2) (Yang, H. :Sterol esterification. in yeast: a two-gene process. *Science*. 1996 May 31; 272(5266):1353-6), así como otra esterol aciltransferasa (J. Biol. Chem. 1996, Sep 27;271(39):24157-63),

ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa (ERG1) (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Gene* 107: 155-160),

ácidos nucleicos que codifican una C24-metiltransferasa (ERG6) (Hardwick, K.G. et al.,: SED6 is identical to ERG6, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. *Yeast*. Feb; 10(2): 265-9) y

- 25 ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 22$ -desaturasa (ERG5) (Skaggs, B.A. et al,: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, *Gene*. 1996 Feb22;169(1):105-9.).

Por otro lado, se conocen procedimientos que tienen por objeto un aumento del contenido en productos intermedios específicos y productos finales del metabolismo de los esteroides en levaduras y hongos.

- 30 De la patente EP 486 290 se conoce que el contenido en escualeno y otros esteroides específicos, como es el zimosterol, puede aumentarse en las levaduras aumentando la tasa de expresión de la HMG-CoA-reductasa y, al mismo tiempo, interrumpiendo la ruta metabólica de la zimosterol-C24-metiltransferasa (ERG6) y de la ergosta-5,7,24(28)-trienol-22-dehidrogenasa (ERG5).

- 35 Por T. Polakowski, *Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe Saccharomyces cerevisiae*, Shaker Verlag Aachen, 1999, página 59 a 66, se conoce que el aumento de la tasa de expresión de la HMG-CoA-reductasa sola, sin interrupción de la ruta metabólica ulterior como se indica en el documento EP 486 290, conduce solo a un aumento del contenido en esteroides tempranos, así como en escualeno, mientras que el contenido en esteroides posteriores, como el ergosterol, no se modifica de forma significativa, o incluso presenta tendencia a reducirse en el caso del ergosterol.

- 40 El documento WO 99/16886 describe un procedimiento para la fabricación de ergosterol en levaduras que sobreexpresan una combinación de los genes *t*HMG, ERG9, SAT1 y ERG1.

Tainaka et al., J. Ferment. Bioeng. 1995, 79, 64-66, describen también que la sobreexpresión de ERG11 (lanosterol-C14-demetilasa) conduce a un enriquecimiento de 4,4-dimetilzimosterol, pero no de ergosterol. El transformante mostró, frente al tipo silvestre, un contenido en zimosterol aumentado en el factor de 1,1 a 1,47 en función de las condiciones de fermentación.

- 5 Avruch et al., Can. J. Biochem 1976, 54(7), 657-665, así como Xu et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 155(1), 509-517, describen que con una inhibición específica de la C24-metiltransferasa y también con una mutación en el locus *erg6* en *S. cerevisiae* se detectan, además de zimosterol, también trazas de colesterol.

De la publicación WO98/45457 se conocen plantas con constructos de ADN que tienen como consecuencia la expresión de una Δ -24-25-reductasa.

- 10 El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol con propiedades ventajosas, como una producción superior.

Por consiguiente, se encontró un procedimiento según la reivindicación 1.

- 15 Una actividad aumentada respecto al tipo silvestre, en el caso de que el organismo de partida no presente dicha actividad, indica que la actividad se causa. En el caso de que el organismo de partida presente ya la actividad, una actividad aumentada respecto al tipo silvestre significa una actividad aumentada en un porcentaje.

Se entiende por actividad de la Δ 8- Δ 7-isomerasa la actividad enzimática de una Δ 8- Δ 7-isomerasa, también llamada Δ 8- Δ 7-esterolisomerasa.

Se entiende por una Δ 8- Δ 7-isomerasa una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir zimosterol en colest-7,24-dienol.

- 20 En consecuencia, se entiende por actividad de la Δ 8- Δ 7-isomerasa la cantidad de zimosterol convertida o la cantidad formada de colest-7,24-dienol en un tiempo determinado por la acción de la proteína Δ 8- Δ 7-isomerasa.

De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la Δ 8- Δ 7-isomerasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad convertida de zimosterol o la cantidad formada de colest-7,24-dienol se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína Δ 8- Δ 7-isomerasa.

- 25 Preferiblemente este aumento de la actividad de la Δ 8- Δ 7-isomerasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la Δ 8- Δ 7-isomerasa del tipo silvestre.

- 30 Se entiende por actividad de la Δ 5-desaturasa la actividad enzimática de una Δ 5-desaturasa, también llamada latosterol-5-desaturasa o esterol-C5-desaturasa.

Se entiende por una Δ 5-desaturasa una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir colest-7,24-dienol en colest-5,7,24-trienol.

En consecuencia, se entiende por actividad de la Δ 5-desaturasa la cantidad de colest-7,24-dienol convertida o la cantidad formada de colest-5,7,24-trienol en un tiempo determinado por la acción de la proteína Δ 5-desaturasa.

- 35 De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la Δ 5-desaturasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad convertida de colest-7,24-dienol o la cantidad formada de colest-5,7,24-trienol se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína Δ 5-desaturasa.

- 40 Preferiblemente este aumento de la actividad de la Δ 5-desaturasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la Δ 5-desaturasa del tipo silvestre.

Se entiende por actividad de la $\Delta 24$ -reductasa la actividad enzimática de una $\Delta 24$ -reductasa, también llamada 24-dehidrocolesterol-reductasa.

Se entiende por una $\Delta 24$ -reductasa una proteína que presenta la actividad enzimática de transformar el doble enlace entre C24 y C25 de los compuestos de colesterol en un enlace simple, como por ejemplo colest-5,7,24-trienol en 7-dehidrocolesterol o zimosterol en lanosterol o colest-7,24-dienol en colest-7-enol.

En consecuencia, se entiende por actividad de la $\Delta 24$ -reductasa preferiblemente la cantidad de colest-5,7,24-trienol convertida o la cantidad formada de 7-dehidrocolesterol en un tiempo determinado por la proteína $\Delta 24$ -reductasa.

De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la $\Delta 24$ -reductasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de colest-5,7,24-trienol o la cantidad formada de 7-dehidrocolesterol se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína $\Delta 24$ -reductasa.

Preferiblemente este aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa del tipo silvestre.

Se entiende por tipo silvestre el organismo de partida correspondiente no modificado genéticamente. Preferiblemente y en particular en los casos en los que el organismo o el tipo silvestre no puede asignarse de forma unívoca, se entiende por tipo silvestre un organismo de referencia para el aumento de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, el aumento de la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa, el aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa, la reducción de la actividad de la C24-metiltransferasa que se describe más adelante, la reducción de la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa que se describe más adelante, el aumento de la actividad de la HMG-CoA-reductasa que se describe más adelante, el aumento de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa que se describe más adelante, el aumento de la actividad de la escualeno epoxidasa que se describe más adelante, el aumento de la actividad de la escualeno sintetasa que se describe más adelante y el aumento de la actividad de la esterol-aciltransferasa que se describe más adelante, así como para el aumento del contenido en 7-dehidrocolesterol y/o sus productos intermedios o secuenciales. Este organismo de referencia es preferiblemente la cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* AH22.

El aumento de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa y la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa, así como de la actividad de la HMG-CoA-reductasa, la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno epoxidasa, la actividad de la escualeno sintetasa y la actividad de la esterol-aciltransferasa que se describe más adelante puede seguir diferentes vías de manera independiente entre sí, por ejemplo, desactivando los mecanismos de regulación inhibidores en el nivel de expresión o de proteínas, o mediante el aumento de la expresión génica de los ácidos nucleicos correspondientes, es decir, ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 24$ -reductasa, una HMG-CoA-reductasa, una lanosterol-C14-demetilasa, una escualeno epoxidasa, una escualeno sintetasa o una esterol-aciltransferasa frente al tipo silvestre.

El aumento de la expresión génica de los ácidos nucleicos correspondiente frente al tipo silvestre también puede tener lugar a través de diferentes vías, por ejemplo, mediante la inducción de los genes correspondientes a través de activadores, a saber mediante la inducción del gen de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, del gen de $\Delta 5$ -desaturasa, del gen de $\Delta 24$ -reductasa, del gen de HMG-CoA-reductasa, del gen de lanosterol-C14-demetilasa, del gen de escualeno epoxidasa, del gen de escualeno sintetasa o del gen de esterol-aciltransferasa a través de activadores o mediante la incorporación de una o varias copias génicas de los ácidos nucleicos correspondientes, es decir, mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 24$ -reductasa, una HMG-CoA-reductasa, una lanosterol-C14-demetilasa, una escualeno epoxidasa, una escualeno sintetasa o una esterol aciltransferasa.

Por aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 24$ -reductasa, una HMG-CoA-reductasa, una lanosterol-C14-demetilasa, una escualeno epoxidasa, una escualeno sintetasa o una esterol-aciltransferasa se entiende también según la invención la manipulación de la expresión de las $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasas, $\Delta 5$ -desaturasas, $\Delta 24$ -reductasas, HMG-CoA-reductasas, lanosterol-C14-

demetilasas, escualeno epoxidasas, escualeno sintetasa o esterol-aciltransferasas endógenas propias del organismo, en particular propias de las levaduras.

5 Esto puede conseguirse, por ejemplo, cambiando la secuencia promotora del ADN para genes que codifican $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 24$ -reductasa, HMG-CoA-reductasa, lanosterol-C14-demetilasa, escualeno epoxidasa, escualeno sintetasa o esterol-aciltransferasa. Una modificación de este tipo, que tiene como consecuencia una alta tasa de expresión del gen correspondiente, puede tener lugar por ejemplo mediante la delección o la inserción de secuencias de ADN.

10 Como se ha descrito antes, es posible modificar la expresión de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 24$ -reductasa, HMG-CoA-reductasa, lanosterol-C14-demetilasa, escualeno epoxidasa, escualeno sintetasa o esterol-aciltransferasa endógenas mediante la aplicación de estímulos exógenos. Esto puede tener lugar mediante condiciones fisiológicas, es decir, mediante la aplicación de sustancias externas.

15 También puede conseguirse una expresión modificada o aumentada de los genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 24$ -reductasa, HMG-CoA-reductasa, lanosterol-C14-demetilasa, escualeno epoxidasa, escualeno sintetasa o esterol-aciltransferasa endógenas haciendo que una proteína reguladora no existente en el organismo no transformado entre en interacción con el promotor de estos genes.

Tal regulador puede representar una proteína quimérica, que consta de un dominio de enlace de ADN y un dominio activador de la transcripción, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 96/06166.

En una realización preferida el aumento de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa respecto al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.

20 En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.

Para ello, básicamente puede utilizarse cualquier gen de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, es decir, cualquier ácido nucleico que codifique una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.

25 En el caso de secuencias genómicas $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el organismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

30 Ejemplos de genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa son ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa murina (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 1, proteína: SEQ. ID. nº 2) o una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa humana (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 3, proteína: SEQ. ID. nº 4) (Braverman, N. et al., (1999): Mutations in the gene encoding 3 β -hydroxysteroid-delta8, delta7-isomerase cause X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome, Nat. Genet. 22 (3), 291-294), pero también ácidos nucleicos que codifican proteínas que, por ejemplo, en virtud de una amplia especificidad del sustrato muestran la actividad de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, como por ejemplo ácidos nucleicos que codifican una C8-
35 isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG2), (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 5, proteína: SEQ. ID. nº 6), (Ashman, W.H. et al. (1991): Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. Lipids. Aug;26(8):628-32.).

En los organismos transgénicos según la invención existe así en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otro gen de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.

40 El número de genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres, preferentemente del todo más de cinco.

Todos los ácidos nucleicos mencionados en la descripción pueden ser, por ejemplo, una secuencia ARN-ADN o una secuencia de ADNc.

Son genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa preferidos los ácidos nucleicos que codifican proteínas que presentan una alta especificidad de sustrato para zimosterol. En consecuencia se prefieren en particular genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa y las $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasas correspondientes de animales mamíferos y sus equivalentes funcionales.

5 En consecuencia, en el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 2 o una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente del todo el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 2, y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.

10 La secuencia SEQ. ID. nº 2 representa la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Mus musculus*.

Otros ejemplos de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasas y genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de aminoácidos correspondientes retrotraducidas a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 2.

15 La $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Homo sapiens* (SEQ. ID. nº 4) muestra por ejemplo con la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Mus musculus* (SEQ. ID. nº 2) una identidad del 74%.

Otros ejemplos de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasas y genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa pueden detectarse también de una forma conocida partiendo de la secuencia SEQ. ID. nº 1 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

20 Por el concepto "sustitución" se entiende en la descripción el intercambio de uno o varios aminoácidos por uno o varios aminoácidos. Preferentemente se realizan los llamados intercambios conservadores, en los que el aminoácido reemplazado tiene una propiedad similar a la del aminoácido original, por ejemplo, intercambio de Glu por Asp, Gln por Asn, Val por Ile, Leu por Ile, Ser por Thr.

25 La delección es la sustitución de un aminoácido por un enlace directo. Son posiciones preferidas para las delecciones los términos del polipéptido y los enlaces entre los diferentes dominios de proteínas.

Las inserciones son incorporaciones de aminoácidos en la cadena de polipéptidos, donde formalmente un enlace directo se sustituye por uno o varios aminoácidos.

30 Por identidad entre dos proteínas se entiende la identidad de los aminoácidos a través de toda la longitud de la proteína correspondiente, en particular la identidad que se calcula mediante comparación con ayuda del software Lasergene de la empresa DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (EE.UU.), utilizando el método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr; 5(2):151-1) ajustando los siguientes parámetros:

	Parámetro de alineación múltiple:	
	Penalización por huecos	10
35	Penalización por longitud de los huecos	10
	Parámetro de alineación por parejas:	
	K-tupla	1
	Penalización por huecos	3
	Ventana	5
40	Diagonales salvadas	5

45 Por una proteína que presenta una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 2, se entiende así una proteína que, en una comparación de su secuencia con la secuencia SEQ. ID. nº 2, en particular según el algoritmo de parámetros anterior con el juego de parámetros anterior presenta una identidad de al menos el 30%.

En otra realización especialmente preferida, para el aumento de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Mus musculus* (SEQ. ID. nº 2).

5 Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

10 Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 1.

La secuencia SEQ. ID. nº 1 representa el ADNc de *Mus musculus*, que codifica la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de la secuencia SEQ. ID. nº 2.

15 Todos los genes de $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento
20 Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En una realización preferida el aumento de la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa frente al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 5$ -desaturasa.

25 En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 5$ -desaturasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa.

Para ello puede utilizarse en principio cualquier gen de $\Delta 5$ -desaturasa, es decir cualquier ácido nucleico que codifique una $\Delta 5$ -desaturasa.

30 En el caso de secuencias genómicas $\Delta 5$ -desaturasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el organismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la $\Delta 5$ -desaturasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

Ejemplos de genes de $\Delta 5$ -desaturasa son ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa murina (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 7, proteína: SEQ. ID. nº 8) o una $\Delta 5$ -desaturasa humana (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 9, proteína: SEQ. ID. nº 10) (Nishi, S. *et al.*, (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta, 1490, (1-2), 106-108), pero también ácidos nucleicos que codifican proteínas que, por ejemplo, en virtud de una amplia especificidad de sustrato presentan la actividad de una $\Delta 5$ -desaturasa, como por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican una C5-desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG3) (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 11, proteína: SEQ. ID. nº 12), (Arthington, B.A. *et al.* (1991): Cloning, disruption and sequence
40 of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. Gene. Jun15; 102(1): 39-44).

Así pues, en los organismos transgénicos según la invención, en esta realización preferida frente al tipo silvestre existe al menos otro gen de $\Delta 5$ -desaturasa.

El número de genes de $\Delta 5$ -desaturasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres y de manera especialmente preferente del todo más de cinco.

5 Son genes de $\Delta 5$ -desaturasa preferidos ácidos nucleicos que codifican proteínas que presentan una alta especificidad de sustrato para colest-7,24-dienol. En consecuencia, se prefieren en particular genes de $\Delta 5$ -desaturasa y las $\Delta 5$ -desaturasas correspondientes de animales mamíferos y sus equivalentes funcionales.

10 En consecuencia, en el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen las secuencias de aminoácidos SEQ. ID. nº 8 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que muestren una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90%, y más preferentemente del todo al menos el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 8 y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 5$ -desaturasa.

La secuencia SEQ. ID. nº 8 representa la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 5$ -desaturasa de *Mus musculus*.

15 Otros ejemplos para $\Delta 5$ -desaturasas y genes de $\Delta 5$ -desaturasa pueden detectarse fácilmente por ejemplo a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes retrotraducidas de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 2.

La $\Delta 5$ -desaturasa de *Homo sapiens* (SEQ. ID. nº 10) muestra por ejemplo con la $\Delta 5$ -desaturasa de *Mus musculus* (SEQ. ID. nº 8) una identidad del 84%.

20 Otros ejemplos de $\Delta 5$ -desaturasas y genes de $\Delta 5$ -desaturasa pueden detectarse fácilmente de un modo conocido también por ejemplo a partir de la secuencia SEQ. ID. nº 7 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante hibridación y técnicas de RCP.

25 Por una proteína que presenta una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 8, se entiende así una proteína que, en la comparación de su secuencia con la secuencia SEQ. ID. nº 8, en particular según el algoritmo de programa anterior con el juego de parámetros anterior, presenta una identidad de al menos el 30%.

En otra realización especialmente preferida, para el aumento de la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 5$ -desaturasa de *Mus musculus* (SEQ. ID. nº 8).

30 Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos por ejemplo mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

35 Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 7.

40 La secuencia SEQ. ID. nº 7 representa el ADNc de *Mus musculus*, que codifica la $\Delta 5$ -desaturasa de la secuencia SEQ. ID. nº 8.

Todos los genes de $\Delta 5$ -desaturasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener

lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 5 En una realización preferida el aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa frente al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 24$ -reductasa.

En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 24$ -reductasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa.

- 10 Para ello puede utilizarse en principio cualquier gen de $\Delta 24$ -reductasa, es decir cualquier ácido nucleico que codifique una $\Delta 24$ -reductasa.

En el caso de secuencias genómicas $\Delta 24$ -reductasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el organismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la $\Delta 24$ -reductasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

- 15

Ejemplos de genes de $\Delta 24$ -reductasa son ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa murina (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 13, proteína: SEQ. ID. nº 14) o una $\Delta 24$ -reductasa humana (ácido nucleico: SEQ. ID. nº 15, proteína: SEQ. ID. nº 16), (Waterham, H.R. *et al.*: Mutations in the 3beta-Hydroxysterol Delta24-Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. H. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)), pero también ácidos nucleicos que codifican proteínas que, por ejemplo, en virtud de una amplia especificidad de sustrato presentan la actividad de una $\Delta 24$ -reductasa, como por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG4), (ácidos nucleicos: SEQ. ID. nº 17, proteína: SEQ. ID. nº 18), (Lai, M.H. *et al.* (1994): The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. Gene. Mar11; 140 (1): 41-9).

- 20

- 25 Así pues, en los organismos transgénicos según la invención existe en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otro gen de $\Delta 24$ -reductasa.

El número de genes de $\Delta 24$ -reductasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, especialmente preferiblemente más de tres y de manera especialmente preferible del todo más de cinco.

- 30 Son genes de $\Delta 24$ -reductasa preferidos los ácidos nucleicos que codifican proteínas que presentan una alta especificidad de sustrato para colest-5,7,24-trienol. En consecuencia se prefieren en particular genes de $\Delta 24$ -reductasa y las $\Delta 24$ -reductasas correspondientes de animales mamíferos y sus equivalentes funcionales.

Por consiguiente, en el procedimiento aquí descrito se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 14, o bien una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que muestran una identidad de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 50%, más preferentemente al menos 70%, aún más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente del todo de al menos el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 14 y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 24$ -reductasa.

- 35

La secuencia SEQ. ID. nº 14 representa la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus*.

- 40 Otros ejemplos de $\Delta 24$ -reductasas y genes de $\Delta 24$ -reductasa pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de aminoácidos correspondientes retrotraducidas a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 14.

La $\Delta 24$ -reductasa de *Homo sapiens* (SEQ. ID. nº 16) muestra por ejemplo con la $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus* (IC. sec. nº 14) una identidad del 96%.

- 45

Otros ejemplos de $\Delta 24$ -reductasas y genes de $\Delta 24$ -reductasa pueden detectarse también de una forma conocida partiendo de la secuencia SEQ. ID. nº 13 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

5 Por una proteína que presenta una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 14 se entiende en consecuencia una proteína que, en una comparación de su secuencia con la secuencia SEQ. ID. nº 14, en particular según el algoritmo de programa anterior con el juego de parámetros anterior, presenta una identidad de al menos el 30%.

10 En otra realización especialmente preferida, para el aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa se incorporan ácidos nucleicos en organismos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus* (SEQ. ID. nº 14).

Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos por ejemplo mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

15 Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 13.

20 La secuencia SEQ. ID. nº 13 representa el ADN genómico de *Mus musculus*, que codifica la $\Delta 24$ -reductasa de la secuencia SEQ. ID. nº 14.

25 Todos los genes de $\Delta 24$ -reductasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

30 En otra realización preferida del procedimiento según la invención se cultivan organismos que, frente al tipo silvestre, aparte de las modificaciones genéticas aquí descritas presentan una actividad reducida de al menos una de las actividades del grupo de la actividad de la C24-metiltransferasa y la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa.

En otra realización especialmente preferida se cultivan organismos que, frente al tipo silvestre, además de las modificaciones genéticas aquí descritas presentan una actividad reducida de la C24-metiltransferasa y una actividad reducida de la $\Delta 22$ -desaturasa.

35 Por actividad reducida se entiende tanto la actividad reducida como la desactivación completa de la actividad. Una reducción de una actividad abarca así desde una reducción en cantidad de la proteína correspondiente en el organismo hasta la falta completa de la proteína correspondiente, que se comprueba por ejemplo mediante la falta de detección de la actividad enzimática correspondiente o una falta de detección inmunológica de las proteínas correspondientes.

40 Se entiende por actividad de la C24-metiltransferasa la actividad enzimática de una C24-metiltransferasa.

Por una C24-metiltransferasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir el zimosterol en fecosterol (ergosta-8,24(28)dienol).

Por consiguiente, por actividad de la C24-metiltransferasa se entiende la cantidad convertida de zimosterol o la cantidad de fecosterol formada en un tiempo determinado por la acción de la proteína C24-metiltransferasa.

De este modo, en el caso de una actividad reducida de la C24-metiltransferasa frente al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de zimosterol o la cantidad formada de fecosterol se reducen en un tiempo determinado mediante la proteína C24-metiltransferasa.

Preferiblemente esta reducción de la actividad de la C24-metiltransferasa tiene lugar a al menos el 90%, más preferentemente a al menos el 70%, más preferentemente a al menos el 50%, más preferentemente a al menos el 30%, más preferentemente a al menos un 10%, aún más preferentemente a al menos el 5%, en particular al 0% de la actividad de la C24-metiltransferasa del tipo silvestre. En consecuencia, especialmente preferida resulta una desactivación de la actividad de la C24-metiltransferasa en el organismo.

Por actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa se entiende la actividad enzimática de una $\Delta 22$ -desaturasa.

Por una $\Delta 22$ -desaturasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir ergosta-5,7-dienol en ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol.

Por consiguiente, se entiende por actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa la cantidad convertida de ergosta-5,7-dienol o la cantidad formada de ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol en un tiempo determinado por la acción de la proteína $\Delta 22$ -desaturasa.

En el caso de una actividad reducida de la $\Delta 22$ -desaturasa frente al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad convertida de ergosta-5,7-dienol o la cantidad formada de ergosta-5,7,22,24-tetraen-3 β -ol se ve reducida en un tiempo determinado por la acción de la proteína $\Delta 22$ -desaturasa.

Preferiblemente esta reducción de la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa tiene lugar a al menos el 90%, más preferentemente a al menos el 70%, más preferentemente a al menos el 50%, más preferentemente a al menos el 30%, más preferentemente a al menos el 10%, aún más preferentemente a al menos el 5%, en particular al 0% de la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa del tipo silvestre. Especialmente preferida es, pues, una desactivación de la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa en el organismo.

La reducción de la actividad de la C24-metiltransferasa y/o la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa puede tener lugar de manera independiente entre sí mediante diferentes mecanismos biológicos celulares, por ejemplo, mediante la inhibición de la actividad correspondiente en el nivel de proteínas, por ejemplo mediante la adición de inhibidores de la enzima correspondiente o mediante la reducción de la expresión génica frente al tipo silvestre de los ácidos nucleicos correspondientes que codifican una C24-metiltransferasa o una $\Delta 22$ -desaturasa.

En una realización preferida del procedimiento según la invención, la reducción de la actividad de la C24-metiltransferasa y/o la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa frente al tipo silvestre tiene lugar mediante una reducción de la expresión génica de los ácidos nucleicos correspondientes que codifican una C24-metiltransferasa o una $\Delta 22$ -desaturasa.

La reducción de la expresión génica de los ácidos nucleicos que codifican una C24-metiltransferasa o una $\Delta 22$ -desaturasa, frente al tipo silvestre, también puede tener lugar mediante diferentes vías, por ejemplo, mediante

a) la incorporación de secuencias de ácidos nucleicos que pueden transcribirse a una secuencia de ácidos nucleicos antisentido que es capaz de inhibir la actividad de la C24-metiltransferasa y/o la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa, por ejemplo, inhibiendo la expresión de C24-metiltransferasa endógena y/o la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa.

b) la sobreexpresión (que conduce a la cosupresión) de secuencias homólogas de ácidos nucleicos de C24-metiltransferasa y/o $\Delta 22$ -desaturasa.

c) la introducción de mutaciones sin-sentido en el endógeno mediante la introducción de oligonucleótidos de ARN/ADN en el organismo.

d) la incorporación de factores específicos fijadores del ADN, por ejemplo, factores del tipo de transcripción de dedos de cinc, que provocan una reducción de la expresión génica o

e) la generación de mutantes "knockout", por ejemplo, con ayuda de mutagénesis de ADN-T o recombinación homóloga.

- 5 En una realización preferida del procedimiento según la invención, la reducción de la expresión génica de los ácidos nucleicos que codifican una C24-metiltransferasa o una $\Delta 22$ -desaturasa tiene lugar mediante la generación de mutantes "knockout", de manera especialmente preferente mediante recombinación homóloga.

Así pues, se utiliza preferentemente un organismo que no presenta ningún gen funcional de C24-metiltransferasa y/o $\Delta 22$ -desaturasa.

- 10 En una realización preferida la generación de mutantes "knockout", es decir, la delección del locus de destino del gen de C24-metiltransferasa y/o de $\Delta 22$ -desaturasa, con una integración simultánea de un casete de expresión que contiene al menos uno de los ácidos nucleicos descritos antes o a continuación, que codifican una proteína cuya actividad está aumentada en comparación con el tipo silvestre, tiene lugar mediante recombinación homóloga.

- 15 Para ello pueden utilizarse constructos de ácidos nucleicos que, junto a los casetes de expresión que se describen a continuación, que contienen promotor, secuencia codificadora y, en su caso, terminador y, junto a un marcador de selección descrito a continuación en los extremos 3' y 5', contienen secuencias de ácidos nucleicos que son idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos al principio y al final del gen que va a someterse a delección.

- 20 Preferiblemente el marcador de selección puede volver a eliminarse después de la selección mediante sistemas de recombinasa, por ejemplo, mediante señales loxP en los extremos 3' y 5' del marcador de selección utilizando una recombinasa Cre (sistema Cre-LoxP).

En el organismo preferido *Saccharomyces cerevisiae* el gen de C24-metiltransferasa significa el gen *ERG6* (ID sec. nº 19). El SEQ. ID. nº 20 representa la C24-metiltransferasa correspondiente de *Saccharomyces cerevisiae* (Hardwick, K.G. *et al.*: SED6 is identical to ERG6, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. Yeast. Feb; 10(2); 265-9).

- 25 En el organismo preferido *Saccharomyces cerevisiae* el gen de $\Delta 22$ -desaturasa significa el gen *ERG5* (SEQ. ID. nº 21). La SEQ. ID. nº 22 representa la $\Delta 22$ -desaturasa correspondiente de *Saccharomyces cerevisiae* (Skaggs, B.A. *et al.*: Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis, Gene. 1996 Feb22; 169(1):105-9).

- 30 En otra realización preferida del procedimiento según la invención se cultivan organismos que, además de las modificaciones aquí descritas frente al tipo silvestre, presentan una actividad aumentada de al menos una de las actividades, seleccionadas del grupo de actividad de la HMG-CoA-reductasa, la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno epoxidasa, la actividad de la escualeno sintetasa o la actividad de la esterol aciltransferasa.

- 35 Por actividad de la HMG-CoA-reductasa se entiende la actividad enzimática de una HMG-CoA-reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A-reductasa).

Por una HMG-CoA-reductasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A-reductasa en mevalonato.

- 40 Por consiguiente, se entiende por actividad de la HMG-CoA-reductasa la cantidad convertida de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A o la cantidad formada de mevalonato durante un tiempo determinado por la acción de la proteína HMG-CoA-reductasa.

Así pues, en el caso de una actividad aumentada de la HMG-CoA-reductasa frente al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de 3-hidroxi-3-meil-glutaril-coenzima-A o la cantidad formada de mevalonato se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína HMG-CoA-reductasa.

Preferiblemente este aumento de la actividad de la actividad de la HMG-CoA-reductasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos el 300%, aún más preferentemente de al menos el 500%, en particular al menos el 600% de la actividad de la HMG-CoA-reductasa del tipo silvestre.

5 Por actividad de la lanosterol-C14-demetilasa se entiende la actividad enzimática de una lanosterol-C14-demetilasa.

Por una lanosterol-C14-demetilasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir lanosterol en 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol.

10 En consecuencia, por actividad de la lanosterol-C14-demetilasa se entiende la cantidad de lanosterol convertida o la cantidad formada de 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol en un tiempo determinado por la acción de la proteína lanosterol-C14-demetilasa.

Así pues, en el caso de una actividad aumentada de la lanosterol-C14-demetilasa frente al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad convertida de lanosterol o la cantidad formada de 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína lanosterol-C14-demetilasa.

15 Preferiblemente este aumento de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos el 300%, aún más preferentemente del 500%, en particular al menos el 600% de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa del tipo silvestre.

Por actividad de la escualeno epoxidasa se entiende la actividad enzimática de una escualeno epoxidasa.

20 Por una escualeno epoxidasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir el escualeno en epóxido de escualeno.

En consecuencia, se entiende por actividad de la escualeno epoxidasa la cantidad convertida de escualeno o la cantidad formada de epóxido de escualeno en un tiempo determinado por la acción de la proteína escualeno epoxidasa.

25 De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la escualeno epoxidasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de escualeno o la cantidad formada de epóxido de escualeno se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína escualeno epoxidasa.

30 Preferiblemente este aumento de la actividad de la escualeno epoxidasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la escualeno epoxidasa del tipo silvestre.

Por actividad de la escualeno sintetasa se entiende la actividad enzimática de una escualeno sintetasa.

Se entiende por una escualeno sintetasa una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir pirofosfato de farnesilo en escualeno.

35 En consecuencia, se entiende por actividad de la escualeno sintetasa la cantidad convertida de pirofosfato de farnesilo o la cantidad formada de escualeno en un tiempo determinado por la acción de la proteína escualeno sintetasa.

De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la escualeno sintetasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de pirofosfato de farnesilo o la cantidad formada de escualeno se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína escualeno sintetasa.

40 Preferiblemente este aumento de la actividad de la escualeno sintetasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más

preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la escualeno sintetasa del tipo silvestre.

Por actividad de la esterol-aciltransferasa se entiende la actividad enzimática de una esterol-aciltransferasa.

5 Se entiende por una esterol-aciltransferasa una proteína que presenta la actividad enzimática de convertir 7-dehidrocolesterol en 7-dehidrocolesterol acetilado correspondiente.

En consecuencia, se entiende por actividad de la esterol-aciltransferasa la cantidad de 7-dehidrocolesterol convertida o la cantidad formada de 7-dehidrocolesterol acetilado en un tiempo determinado por la acción de la proteína esterol-aciltransferasa.

10 De este modo, en el caso de una actividad aumentada de la esterol-aciltransferasa respecto al tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre la cantidad convertida de 7-dehidrocolesterol o la cantidad formada de 7-dehidrocolesterol acetilado se ve aumentada en un tiempo determinado por la acción de la proteína esterol-aciltransferasa.

15 Preferiblemente este aumento de la actividad de la esterol-aciltransferasa es de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 100%, más preferentemente de al menos del 300%, todavía más preferentemente de al menos el 500%, en particular, al menos el 600% de la actividad de la esterol-aciltransferasa del tipo silvestre.

En una realización preferida, el aumento de la actividad de la HMG-CoA-reductasa respecto al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa.

20 En una realización especialmente preferida del procedimiento según la invención, el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa se realiza incorporando en el organismo un constructo de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa, cuya expresión en el organismo, comparada con el tipo silvestre, está sujeta a una regulación reducida.

Por una regulación reducida, comparada con el tipo silvestre, se entiende una regulación reducida en comparación con el tipo silvestre definido aquí, preferiblemente la ausencia de regulación en el nivel de expresión o de proteínas.

25 La regulación reducida puede conseguirse preferiblemente a través de un promotor vinculado funcionalmente con la secuencia codificadora en el constructo de ácidos nucleicos, en donde dicho promotor, en comparación con el promotor del tipo silvestre, está sujeto en el organismo a una regulación reducida.

Por ejemplo, el promotor ADH medio en la levadura está sujeto solo a una regulación reducida y, por lo tanto, es preferido especialmente como promotor en el constructo de ácidos nucleicos aquí descrito.

30 Este fragmento del promotor *ADH12s*, en adelante también llamado *ADH1*, muestra una expresión casi constitutiva (Ruohonen, L, Penttilä, M, Keranen, S. (1991) Optimization of Bacillus alpha-amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun;7(4):337-462; Lang C, Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of Aspergillus niger RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. Dec; 44(1-2):147-56.), de manera que la regulación transcripcional ya no tiene lugar a través de productos intermedios de la biosíntesis del ergosterol.

35 Otros promotores preferidos con regulación reducida son promotores constitutivos, como por ejemplo el promotor TEF1 de la levadura, el promotor GPD de la levadura o el promotor PGK de la levadura (Mumberg D, Muller R, Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr 14;156(1):119-22; Chen CY, Oppermann H, Hitzeman, RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11;12(23):8951-70.

La regulación reducida puede conseguirse en otra realización preferida utilizando como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa un ácido nucleico cuya expresión en el organismo, comparada con el ácido nucleico ortólogo propio del organismo, está sujeta a una regulación reducida.

Especialmente preferida es la utilización de un ácido nucleico que solo codifica el área catalítica de la HMG-CoA-reductasa ((t-)HMG-CoA-reductasa truncada) como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa. Este ácido nucleico (t-HMG), descrito en los documentos EP 486 290 y WO 99/16886, codifica solo la parte catalíticamente activa de la HMG-CoA-reductasa, y el dominio de membrana responsable de la regulación en el nivel de la proteína falta. De este modo, este ácido nucleico está sujeto, sobre todo en la levadura, a una regulación reducida y conduce a un aumento de la expresión génica de la HMG-CoA-reductasa.

En una realización especialmente preferida se incorporan ácidos nucleicos preferiblemente a través del constructo de ácidos nucleicos descrito aquí, que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 24 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que muestran una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 24 y que presentan la propiedad de una HMG-CoA-reductasa.

La secuencia SEQ. ID. nº 24 representa la secuencia de aminoácidos de la HMG-CoA-reductasa truncada (t-HMG).

Otros ejemplos de HMG-CoA-reductasas y, con ello, de t-HMG-CoA-reductasas reducidas en el área catalítica o de los genes codificadores pueden detectarse fácilmente a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de ácidos nucleicos retrotraducidas correspondientes a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 24.

Otros ejemplos de HMG-CoA-reductasas y, con ello, de t-HMG-CoA-reductasas reducidas en el área catalítica o de los genes codificadores pueden detectarse fácilmente de un modo conocido a partir de la secuencia SEQ. ID. nº 23 de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

De manera especialmente preferente se utiliza un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 23 como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa truncada.

En una realización especialmente preferida la regulación reducida puede conseguirse utilizando como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa un ácido nucleico cuya expresión en el organismo, comparada con el ácido nucleico ortólogo propio del organismo, está sujeta a una regulación reducida, y utiliza un promotor que, comparado con el promotor del tipo silvestre, está sujeto en el organismo a una regulación reducida.

En una realización preferida el aumento de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa respecto al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una lanosterol-C14-demetilasa.

En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una lanosterol-C14-demetilasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa.

Para ello, básicamente puede utilizarse cualquier gen de lanosterol-C14-demetilasa (ERG11), es decir, cualquier ácido nucleico que codifique una lanosterol-C14-demetilasa. En el caso de secuencias genómicas lanosterol-C14-demetilasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el microorganismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la lanosterol-C14-demetilasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

Ejemplos de genes de lanosterol-C14-demetilasa son ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Kalb VF, Loper JC, Dey CR, Woods CW, Sutter TR (1986) Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 45(3):237-45), *Candida albicans* (Lamb DC, Kelly DE, Ba1dwin BC, Gozzo F, Boscott P, Richards WG, Kelly SL (1997) Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal stereoisomers. FEMS Microbiol Lett 149(1):25-30), *Homo sapiens* (Stromstedt, M, Rozman, D, Waterman, MR. (1996) The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 alpha-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. Arch Biochem Biophys 1996 May 1;329(1):73-81c) o *Rattus norvegicus*, Aoyama Y, Funae Y, Noshiro M, Horiuchi T, Yoshida Y. (1994) Occurrence of a P450 showing

high homology to yeast lanosterol 14-demethylase (P450 (14DM)) in the rat liver. Biochem Biophys Res Commun. Jun 30;201(3):1320-6)

En los organismos transgénicos según la invención existe así en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otro gen de lanosterol-C14-demetilasa.

- 5 El número de genes de lanosterol-C14-demetilasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres, preferentemente del todo más de cinco.

10 En el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 26 o una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente del todo el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 26 y que presentan la propiedad enzimática de una lanosterol-C14-demetilasa.

15 La secuencia SEQ. ID. nº 26 representa la secuencia de aminoácidos de la lanosterol-C14-demetilasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros ejemplos de lanosterol-C14-demetilasa y de genes de lanosterol-C14-demetilasa pueden detectarse fácilmente a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de ácidos nucleicos retrotraducidas correspondientes a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 26.

20 Otros ejemplos de lanosterol-C14-demetilasa y de genes de lanosterol-C14-demetilasa pueden detectarse fácilmente de un modo conocido a partir de la SEQ. ID. nº 25 de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

25 Por una proteína que presenta una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 26, se entiende en consecuencia una proteína que, en una comparación de su secuencia con la secuencia SEQ. ID. nº 26, en particular según el algoritmo de programa anterior con el juego de parámetros anterior, presenta una identidad de al menos el 30%.

En otra realización preferida en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la lanosterol-C14-demetilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. nº 26).

30 Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

35 Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 25.

40 La secuencia SEQ. ID. nº 25 representa el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF S0001049), que codifica la lanosterol-C14-demetilasa de la secuencia SEQ. ID. nº 26.

Todos los genes de lanosterol-C14-demetilasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos

puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En una realización preferida el aumento de la actividad de la escualeno epoxidasa respecto al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una escualeno epoxidasa.

En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una escualeno epoxidasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa.

Para ello, básicamente puede utilizarse cualquier gen de escualeno epoxidasa (ERG1), es decir, cualquier ácido nucleico que codifique una escualeno epoxidasa. En el caso de secuencias genómicas escualeno epoxidasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el microorganismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la escualeno epoxidasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa son ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Jandrositz, A., et al (1991) The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. Gene 107 :155-160), de *Mus musculus* (Kosuga, K, Hata, S, Osumi, T, Sakakibara, J, Ono, T. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA for mouse squalene epoxidase, Biochim Biophys Acta, Feb 21; 1260(3): 345-8b), de *Rattus norvegicus* (Sakakibara, J, Watanabe, R, Kanai, Y, Ono T. (1995) Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase. J Biol Chem Jan 6;270(1):17-20c) o de *Homo sapiens* (Nakamura Y, Sakakibara J, Izumi T, Shibata A, Ono T. (1996) Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells., J. Biol. Chem. 1996, Apr 5;271(14):8053-6).

En los organismos transgénicos según la invención existe así en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otra escualeno epoxidasa.

El número de genes de escualeno epoxidasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres, preferentemente del todo más de cinco.

En el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 28 o una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente del todo el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 28 y que presentan la propiedad enzimática de una escualeno epoxidasa.

La secuencia SEQ. ID. nº 28 representa la secuencia de aminoácidos de la escualeno epoxidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros ejemplos de escualeno epoxidasas y genes de escualeno epoxidasa pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de aminoácidos correspondientes retrotraducidas a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 28.

Otros ejemplos de escualeno epoxidasa y genes de escualeno epoxidasa pueden detectarse también de una forma conocida partiendo de la secuencia SEQ. ID. nº 27 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

En otra realización preferida en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la escualeno epoxidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. nº 28).

Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 27.

La secuencia SEQ. ID. nº 27 representa el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YGR175C), que codifica la escualeno epoxidasa de la secuencia SEQ. ID. nº 28.

Todos los genes de escualeno epoxidasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En una realización preferida el aumento de la actividad de la escualeno sintetasa frente al tipo silvestre tiene lugar mediante un aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una escualeno sintetasa.

En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una escualeno sintetasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa.

Para ello puede utilizarse en principio cualquier gen de escualeno sintetasa (ERG9), es decir cualquier ácido nucleico que codifique una escualeno sintetasa. En el caso de secuencias genómicas escualeno sintetasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el organismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la escualeno sintetasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNc correspondientes.

Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa son ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG9), (Jennings, S.M., (1991): Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. Jul15; 88(14): 6038-42), ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa de *Botryococcus braunii* Okada (Devarenne, T. P. *et al.*: Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga Botryococcus braunii, raceB, Arch. Biochem. Biophys. 2000, Jan15, 373(2):307-17), ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa de *Potato tuber* (Yoshioka H. *et al.*: cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase and expression of the genes in potato tuber infected with Phytophthora infestans, Plant. Cell. Physiol. 1999, Sep; 40(9):993-8), o ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa de *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi, H. *et al.*: Molecular cloning and characterization of two cDNAs for Glycyrrhiza glabra squalene synthase, Biol. Pharm. Bull. 1999, Sep; 22(9): 947-50).

En los organismos transgénicos según la invención existe así en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otro gen de escualeno sintetasa.

El número de genes de escualeno sintetasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres, preferentemente del todo más de cinco.

En el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 30 o una secuencia derivada de esta secuencia mediante

sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente del todo el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 30 y que presentan la propiedad enzimática de una escualeno sintetasa.

- 5 La secuencia SEQ. ID. nº 30 representa la secuencia de aminoácidos de la escualeno sintetasa (ERG9) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros ejemplos de escualeno sintetasa y genes de escualeno sintetasa pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de aminoácidos correspondientes retrotraducidas a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 30.

Otros ejemplos de escualeno sintetasa y genes de escualeno sintetasa pueden detectarse también de una forma conocida partiendo de la secuencia SEQ. ID. nº 29 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

- 15 En otra realización preferida en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la escualeno sintetasa de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. nº 30).

Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

- 20 Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 29.

- 25 La secuencia SEQ. ID. nº 29 representa el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YHR190W), que codifica la escualeno sintetasa de la secuencia SEQ. ID. nº 30.

30 Todos los genes de escualeno sintetasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 35 En una realización preferida el aumento de la actividad de la esterol-aciltransferasa frente al tipo silvestre tiene lugar mediante el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una esterol-aciltransferasa.

En otra realización preferida el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una esterol-aciltransferasa tiene lugar mediante la incorporación en el organismo de uno o varios ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.

- 40 Para ello puede utilizarse en principio cualquier gen de esterol-aciltransferasa (SAT1 o SAT2), es decir cualquier ácido nucleico que codifique una esterol-aciltransferasa. En el caso de secuencias genómicas esterol-aciltransferasa-ácido nucleico de fuentes eucarióticas que contienen intrones, para el caso de que el organismo huésped no esté en disposición o no pueda ponerse en disposición de expresar la esterol-aciltransferasa correspondiente, deben utilizarse preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, como los ADNs correspondientes.

Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican una esteroil-aciltransferasa son ácidos nucleicos que codifican una esteroil-aciltransferasa de *Saccharomyces cerevisiae* (SAT1) o (SAT2), (Yang, H.: Sterol esterification. in yeast: a two-gene process. Science. 1996 May 31; 272(5266):1353-6), otro ácido nucleico que codifica otra esteroil aciltransferasa de *Saccharomyces cerevisiae* (J. Biol. Chem. 1996, Sep 27; 271(39):24157-63), ácidos nucleicos que codifican una esteroil-aciltransferasa humana (Chang, C. C. et al., Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 1993, Oct 5;268(28): 20747-55) y ácidos nucleicos que codifican una esteroil-aciltransferasa murina (Uelmen, P.J.: Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, J. Biol. Chem. 1995 Nov 3; 270(44): 26192-201).

En los organismos transgénicos según la invención existe así en esta realización preferida frente al tipo silvestre al menos otro gen de esteroil-aciltransferasa.

El número de genes de esteroil-aciltransferasa en los organismos transgénicos según la invención es de al menos dos, preferiblemente más de dos, de manera especialmente preferente más de tres, preferentemente del todo más de cinco.

En el procedimiento descrito aquí se utilizan preferentemente ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 32 o SEQ. ID. nº 50 o una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 70%, aún más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente del todo el 95% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 32 o SEQ. ID. nº 50, y que presentan la propiedad enzimática de una esteroil-aciltransferasa.

La secuencia SEQ. ID. nº 32 representa la secuencia de aminoácidos de la esteroil-aciltransferasa SAT1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia SEQ. ID. nº 50 representa la secuencia de aminoácidos de la esteroil-aciltransferasa SAT2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

SAT1 y SAT2 se diferencian porque tienen una especificidad de sustrato distinta.

Otros ejemplos de esteroil-aciltransferasas y genes de esteroil-aciltransferasa pueden detectarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diversos organismos de secuencia genómica conocida mediante comparaciones de homología de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de aminoácidos correspondientes retrotraducidas a partir de las bases de datos con la SEQ. ID. nº 32 o 50.

Otros ejemplos de esteroil-aciltransferasa y genes de esteroil-aciltransferasa pueden detectarse también de una forma conocida partiendo de la secuencia SEQ. ID. nº 31 o 49 a partir de diversos organismos de secuencia genómica no conocida, mediante técnicas de hibridación y RCP.

En otra realización preferida en los organismos se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos de la esteroil-aciltransferasa SAT1 de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. nº 32) o SAT2 de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ. ID. nº 50).

Pueden obtenerse secuencias apropiadas de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante la retrotraducción de la secuencia de polipéptidos según el código genético.

Preferentemente se utilizan para ello los codones que se utilizan con frecuencia conforme al uso del codón específico del organismo. El uso del codón puede determinarse fácilmente a partir de evaluaciones informáticas de otros genes conocidos de los organismos correspondientes.

Si la proteína debe expresarse por ejemplo en la levadura, con frecuencia resulta ventajoso emplear el uso del codón en la retrotraducción.

En una realización especialmente preferida en el organismo se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 31 o 49.

La secuencia SEQ. ID. nº 31 representa el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YNR019W) que codifica la esterol-aciltransferasa SAT1 de la secuencia SEQ. ID. nº 32.

- 5 La secuencia SEQ. ID. nº 49 representa el ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YCR048W) que codifica la esterol-aciltransferasa SAT2 de la secuencia SEQ. ID. nº 50.

10 Todos los genes de esterol-aciltransferasa mencionados aquí pueden fabricarse de modo conocido mediante síntesis química a partir de los módulos de nucleótidos, por ejemplo, mediante condensación de fragmentos de módulos de nucleótidos complementarios solapados de la doble hélice. La síntesis química de los oligonucleótidos puede tener lugar por ejemplo, de forma conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2ª edición, Wiley Press New York, página 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el relleno de huecos con ayuda del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligación, así como los procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook *et al.* (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 15 Por organismos según la invención se entienden, por ejemplo, bacterias, en particular bacterias del género *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus spec.* o *Streptomyces spec.*,

por ejemplo, levaduras, es particular levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Klyveromyces spec.*,

por ejemplo, hongos, en particular hongos del género *Aspergillus spec.*, *Penicillium spec* o *Dictyostelium spec.*,

- 20 así como por ejemplo *líneas celulares de insectos* que son capaces de fabricar zimosterol y/o sus productos intermedios o secuenciales como tipo silvestre o mediante una modificación genética previa.

Son organismos especialmente preferidos las levaduras, en particular de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, en particular las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae AH22*, *Saccharomyces cerevisiae GRF*, *Saccharomyces cerevisiae DBY747* y *Saccharomyces cerevisiae BY4741*.

- 25 En el caso de levaduras como organismos u organismos genéticamente modificados, para el aumento de al menos una de las actividades, seleccionada del grupo de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa y la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa, como se ha descrito antes, pueden sobreexpresarse los ácidos nucleicos correspondientes.

- 30 La sobreexpresión puede tener lugar tanto de forma homóloga, mediante la incorporación de ácidos nucleicos propios de las levaduras, como de forma heteróloga, mediante la incorporación de ácidos nucleicos de otros organismos, en particular mamíferos, o de variantes naturales o artificiales derivadas de ellos. Preferiblemente en las levaduras se utilizan genes de mamíferos, pues estos presentan una mejor especificidad de sustrato en la dirección del 7-dehidrocolesterol.

- 35 La determinación de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa, la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa, la actividad de la C24-metiltransferasa, la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa, la actividad de la HMG-CoA-reductasa, la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno epoxidasa, la actividad de la escualeno sintetasa y la actividad de la esterol-aciltransferasa del organismo genéticamente modificado según la invención, así como del organismo de referencia tiene lugar en las siguientes condiciones:

- 40 La determinación de la actividad de la HMG-CoA-reductasa tiene lugar tal como se describe en Th. Polakowski, Molekularbiologische Beeinflussung des Ergosterolstoffwechsels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Shaker Verlag Aachen, 1999, ISBN 3-8265-6211-9.

Por consiguiente, se obtienen 10^9 células de levaduras de un cultivo de 48 horas mediante centrifugación (3500xg, 5 min) y se lavan en 2 ml de tampón I (100 mM de tampón de potasio, pH 7,0). El sedimento celular se incluye en 500 μ l de tampón 1 (proteínas citosólicas) o 2 (100 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7,0; 1% tritón X-100)

(proteínas totales) y se añade 1 µl 500 mM de PMSF en isopropanol. A las células se añaden 500 µl de perlas de vidrio ($d = 0,5$ mm) y las células se rompen cinco veces durante un minuto mediante agitación vorticial. El líquido entre las perlas de vidrio se transfiere a una nueva pipeta de Eppendorf. Los restos celulares o los componentes de membrana se separan mediante una centrifugación de 15 minutos ($14.000\times g$). El sobrenadante se transfiere a una nueva pipeta de Eppendorf y representa la fracción de proteína.

La actividad de la HMG-CoA se determina mediante la medición del uso de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ en la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que se añade como sustrato.

En una preparación de prueba de 1000 µl se añaden 20 µl de isolato de proteína de levadura con 910 µl de tampón I; 50 µl 0,1 mM DTT y 10 µl 16 mM $\text{NADPH} + \text{H}^+$. La prueba se atempera a 30° y se mide durante 7,5 min a 340 nm en el fotómetro. La reducción de NADPH que se mide en este período es la tasa de descomposición sin adición de sustrato y se tiene en cuenta como valor de fondo.

A continuación tiene lugar la adición de sustrato (10 µl 30 mM HMG-CoA) y se mide durante otros 7,5 minutos. El cálculo de la actividad de la HMG-CoA-reductasa tiene lugar mediante la determinación de la tasa de descomposición de NADPH específica.

La determinación de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa tiene lugar tal como se describe en Omura, T. y Sato, R. (1964) The carbon monoxide binding pigment in liver microsomes. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378. En esta prueba la cantidad de enzima P450 puede semi-cuantificarse como holoenzima con hemo fijado. La holoenzima (activa) (con hemo) puede reducirse mediante CO y solo la enzima con CO reducido muestra un máximo de absorción a 450 nm. Así, el máximo de absorción a 450 nm es una medida para la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa.

Para realizar la determinación de la actividad se diluye una fracción microsómica (4-10 mg/ml de proteína en 100 mM de tampón de fosfato de potasio) 1:4, de manera que la proteína utilizada para la prueba presenta una concentración de 2 mg/ml. La prueba se realiza directamente en una cubeta.

A los microsomas se les añade una punta de espátula de ditionita ($\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$). Con un espectrofotómetro se adopta la línea base en el área de 380-500 nm.

A continuación se distribuyen de 20-30 burbujas de CO por la muestra. La absorción se mide a continuación en el mismo rango. La cantidad de absorción a 450 nm corresponde a la proporción de enzima P450 en la preparación de prueba.

La determinación de la actividad de la escualeno epoxidasa se realiza tal como se describe en Leber, R., Landl, K., Zinser, E., Ahorn, H., Spok, A., Kohlwein, SD, Turnowski, F., Daum, G. (1998) Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles, Mol. Biol. Cell. 1998, Feb; 9(2):375-86.

Este método contiene de 0,35 a 0,7 mg de proteína microsómica o de 3,5 a 75 µg de partículas lipídicas de proteína en 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 mM FAD, 3 mM NADPH, 0,1 mM de inhibidor de escualeno 2,3-epoxidasa ciclasa U18666A, 32 µM de $[\text{}^3\text{H}]$ escualeno dispersados en 0,005% Tween 80 en un volumen total de 500 µl.

La prueba se realiza a 30°C . Después de un pretratamiento de 10 minutos, se inicia la reacción añadiendo escualeno y, después de 15, 30 y 45 minutos se finaliza mediante la extracción de lípidos con 3 ml de cloroformo/metanol (2:1 vol/vol) y 750 µl de MgCl_2 al 0,035%.

Los lípidos se secan con nitrógeno y se redisuelven en 0,5 ml de cloroformo/metanol (2:1 vol/vol). Para una cromatografía en capa fina se añaden partes en una placa de gel de sílice 60 (0,2 mm) y se separan con cloroformo como eluyente. Las posiciones que contienen $[\text{}^3\text{H}]$ 2,3-oxidoescualeno y $[\text{}^3\text{H}]$ escualeno se raspan y se cuantifican con un contador de centelleo.

La determinación de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa tiene lugar con una ligera variación tal como se describe en Silve S. et al.: Emopamil-binding Protein, a Mammalian Protein That Binds a Series of Structurally Diverse

Neuroprotective Agents, Exhibits 8-7 Sterol Isomerase Activity in Yeast, J Biol Chem 1996 Sep 13; 271(37): 22434-40:

Microsomas procesados a partir de 10 ml de volumen de cultivo se incuban durante 3 h en presencia de 75 μ M colest-8-en-3-ol a 30 °C. Los esteroides se extraen a continuación 4 veces con 5 ml de hexano y se depuran. Las alícuotas se analizan mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

La determinación de la actividad de la Δ^5 -desaturasa tiene lugar con una ligera variación tal como se describe en Nishi, S. et al. (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim. Biophys. Acta 1490 (1-2), 106-108:

Microsomas procesados a partir de 10 ml de volumen de cultivo se incuban durante 3 h en presencia de 75 μ M de latosterol y 2 mM NADH a 30 °C. Los esteroides se extraen a continuación 4 veces con 5 ml de hexano y se depuran. Las alícuotas se analizan mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

La determinación de la actividad de la Δ^24 -reductasa puede realizarse tal como se indica a continuación:

Microsomas procesados a partir de 10 ml de volumen de cultivo se incuban durante 3 h en presencia de 75 μ M de colest-5,7,24-trienol a 30 °C. Los esteroides se extraen a continuación 4 veces con 5 ml de hexano y se depuran. Las alícuotas se analizan mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS).

La determinación de la actividad de la C24-metiltransferasa puede realizarse tal como se indica a continuación:

La proteína *Erg6p* (C24-metiltransferasa) es detectable al 80% en partículas lipídicas de la levadura (Athendstaedt, K., Zweytick, D., Jandrositz, A. Kohlwein, SD, Daum, G: Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 1999 Oct; 181(20): 6441-8). Para la determinación de la actividad enzimática se procesan partículas lipídicas de un volumen de cultivo (48 h) de 100 ml (según un método descrito en Athenstaedt K, Zweytick D, Jandrositz A, Kohlwein SD, Daum G: Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1999 Oct; 181(20): 6441-8).

El contenido en proteínas se determina mediante una prueba enzimática Biorad y para cada preparación de prueba se utilizan 3 mg de proteína en un volumen de 500 μ l. A la prueba se le añaden 50 μ M de [metil- 3 H₃]-S-adenosil-metionina y 50 μ M de zimosterol y la preparación se incuba durante 10 minutos a 35 °C. A continuación se añade el mismo volumen (500 μ l) de cloroformo/metanol (4:1) y, a continuación, se extraen los esteroides.

Mediante medición de centelleo puede determinarse la cantidad de zimosterol con [metil- 3 H₃]-S-adenosil-metionina incorporada, pues con la extracción de cloroformo/metanol solo se extraen sustancias liposolubles. Para la cuantificación, las descomposiciones radiactivas se determinan también para 50 μ M de [metil- 3 H₃]-S-adenosil-metionina mediante medición de centelleo.

Este procedimiento es una variación del procedimiento descrito en Nes WD, Guo D., Zhou W.: Substrate-based inhibitors of the (S)-adenosyl-L-methionine: delta24(25)- to delta24(28)-sterol methyl transferase from *Saccharomyces cerevisiae*, Arch. Biochem. Biophys. 1997 Jun 1; 342 (1): 68-81.

La determinación de la actividad de la Δ^22 -desaturasa (ERG5p) puede realizarse tal como se indica a continuación:

Diversas concentraciones de ergosta-5,7-dienol, depuradas a partir de mutantes *erg5* de *S. cerevisiae* (Parks et al., 1985. Yeast sterols. Yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 111:333-346) y 50 μ g de dilauroilfosfatidilcolina se mezclan y se tratan con ultrasonidos, hasta que surge una suspensión blanca. Se añaden microsomas procesados (1 ml) (3 mg/ml de proteína). Al principio de la reacción enzimática se añade a la prueba NADPH (concentración final, 1 mM). La preparación se incuba durante 20 minutos a 37 °C. La reacción se detiene añadiendo 3 ml de metanol y los esteroides se saponifican mediante la adición de 2 ml de KOH en agua al 60% (peso/volumen). La preparación se incuba durante 2 horas a 90 °C. Después del enfriado la preparación se extrae tres veces con 5 ml de hexano y se concentra mediante evaporación rotativa. A continuación, los esteroides se silitizan 1 hora a 60 °C con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (50 μ l en 50 μ l de toluol). Los esteroides se analizan mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) (por ejemplo, modelo VG 12-250 de cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas; VG Biotech, Manchester, Reino Unido). El producto intermedio de

Δ 22-desaturada surgido puede identificarse dependiendo de la cantidad utilizada de sustrato. Como referencia sirven microsomas que no se incuban con sustrato.

Este procedimiento es una variación del procedimiento descrito en Lamb et al: Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol Δ 22-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul; 43(7): 1725-8.

La determinación de la actividad de la escualeno sintetasa puede realizarse tal como se describe a continuación:

Las pruebas contienen 50 mM Mops, pH 7,2, 10 mM $MgCl_2$, 1% (v/v) Tween-80, 10% (v/v) 2-propanol, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA, NADPH, FPP (o PSPP) y microsomas (3 mg de contenido en proteína) en un volumen total de 200 μ l en tubos de ensayo. Las reacciones con sustrato radiactivo [1-^3H]FPP (15-30 mCi/ μ mol) se incuban a 30 °C durante 30 minutos y la preparación de suspensión se llena con un volumen de 1:1 (v/v) de KOH:metanol acuoso al 40%. Se añade NaCl líquido para la saturación de la solución y también se añaden 2 ml de ligroína que contiene 0,5% (v/v) de escualeno.

La suspensión se agita mediante vórtice durante 30 segundos. Se añade cada vez 1 ml de la capa de ligroína en una pipeta Pasteur en una columna de aluminio empaquetada de 0,5 x 6 cm (80-200 mesh, Fisher). La columna está preequilibrada con 2 ml de ligroína con escualeno al 0,5% (v/v). A continuación, la columna se eluye con 5 x 1 ml de toluol que contiene escualeno al 0,5% (v/v). La radiactividad del escualeno se mide con un contador de centelleo (Beckman) en líquido de centelleo Cytoscint (ICN).

Este procedimiento es una variación de los procedimientos descritos en Radisky et al. *Biochemistry.* 2000 Feb 22; 39(7):1748-60, Zhang et al (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 133-143 y Poulter, C. D. et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3734-3739.

La determinación de la actividad de la esterol-aciltransferasa puede realizarse tal como se describe a continuación:

A partir de un precultivo de 20 ml, que se incubaba durante 2 días, se inocula un cultivo principal de 200 ml al 1% y se incubaba durante la noche en el medio completo. Las células se recolectan y, a continuación, se lavan en doble volumen de tampón HP (100 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,4; 0,5 mM de EDTA; 1 mM de glutatión; 20 μ M de leupeptina; 64 μ M de benzamidina; 2 mM de PMSF) y se resuspenden en tampón HP.

Después de añadir 1 g de perlas de vidrio las células se rompen 8 veces durante un minuto mediante agitación vortical. El sobrenadante se ultracentrifuga a 105.000 xg. El sedimento se incluye en 1 ml de tampón ACAT (100 mM tampón de fosfato de potasio pH 7,4; 1 mM glutatión).

La prueba enzimática tiene lugar en un volumen de 500 μ l. El sustrato ergosterol se incluye en 62,5 ml 0,5 de tampón ACAT mediante agitación vortical fuerte. 250 μ l de esta solución se utiliza como sustrato para la prueba. A ello se añaden 20 μ l de extracto de proteína, 50 μ l de agua y 130 μ l 0,5 de tampón ACAT.

La preparación se incubaba durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se añaden 50 μ l de 14C-oleoil-CoA (600.000 dpm) y la reacción se detiene después de un minuto mediante la adición de 4 ml de cloroformo/metanol (2:1). A ello se añaden 500 μ l H_2O . Para la separación de fases la suspensión se centrifuga brevemente a 2000 xg. La fase inferior se concentra en un matraz cónico hasta que se seca y se redisuelve en 100 μ l de cloroformo/metanol (4:1) y se aplica en una placa de cromatografía en capa fina o DC (gel de sílice 60 F254). La cromatografía en capa fina se realiza con petroéter/dietiléter/ácido acético 90:10:1 como eluyente. Las manchas de la fracción de esteriléster se recortan y en un contador de centelleo se determina la cantidad de descomposiciones radiactivas. A través de la cantidad de las moléculas de 14C-oleoil-CoA fijadas al esteriléster puede determinarse la actividad enzimática.

En una realización preferida del procedimiento según la invención la fabricación de 7-dehidrocolesterol tiene lugar mediante el cultivo de organismos, en particular levaduras, según la reivindicación 1, que presentan además una actividad reducida de al menos una de las actividades seleccionadas del grupo de la actividad de la C24-metiltransferasa y la actividad de la Δ 22-desaturasa y presentan además una actividad aumentada de la HMG-CoA-reductasa, una actividad aumentada de la lanosterol-C14-demetilasa y una actividad aumentada de la escualeno epoxidasa.

Otras realizaciones preferidas del procedimiento según la invención se mencionan en las reivindicaciones secundarias.

En el procedimiento según la invención para la fabricación de 7-dehidrocolesterol, preferiblemente al paso de cultivo de los organismos genéticamente modificados, en adelante también llamados organismos transgénicos, se añade una recolección de los organismos y un aislamiento de 7-dehidrocolesterol.

La recolección de los organismos tiene lugar de un modo conocido correspondiendo al organismo de que se trate. Los microorganismos, como las bacterias, los musgos, las levaduras y los hongos o las células vegetales que se cultivan mediante fermentación en sustratos líquidos, pueden separarse mediante centrifugación, decantación y filtración.

El aislamiento de 7-dehidrocolesterol a partir de la biomasa recolectada tiene lugar conjuntamente de forma conocida, por ejemplo, mediante la extracción y, en su caso, otros procesos de limpieza químicos o físicos, como son los métodos de precipitación, cristalografía, procesos térmicos de separación, como son los procesos de rectificación o procesos de separación física, como por ejemplo, la cromatografía.

La fabricación de organismos transgénicos, en particular levaduras, puede tener lugar preferiblemente mediante la transformación de los organismos de partida, en particular levaduras, con un constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 40. La fabricación de los organismos transgénicos tiene lugar en esta realización con un constructo de ácidos nucleicos.

En una realización especialmente preferida el constructo de ácidos nucleicos descrito aquí contiene además al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación, que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.

No obstante, la fabricación de los organismos transgénicos también puede tener lugar preferiblemente mediante la transformación de los organismos de partida, en particular las levaduras, con una combinación de constructos de ácidos nucleicos según la reivindicación 42.

En una realización especialmente preferida la combinación de constructos de ácidos nucleicos descrita aquí contiene además al menos un constructo de ácidos nucleicos, seleccionado del grupo de constructo de ácidos nucleicos que contienen ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, constructo de ácidos nucleicos que contienen ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, constructo de ácidos nucleicos que contienen ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, constructo de ácidos nucleicos que contienen ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y constructo de ácidos nucleicos que contienen ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, que siempre están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación, que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.

Los constructos de ácidos nucleicos en los que la secuencia codificadora de ácidos nucleicos está vinculada funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos, sobre todo levaduras, se denominan en adelante también casetes de expresión.

Los constructos de ácidos nucleicos que contienen este casete de expresión son, por ejemplo, vectores o plásmidos.

En consecuencia, la invención se refiere también a los constructos de ácidos nucleicos aquí incluidos, en particular constructos de ácidos nucleicos que funcionan como casete de expresión, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.

En una realización preferida este constructo de ácidos nucleicos abarca además al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.

Preferiblemente las señales de regulación contienen uno o varios promotores que garantizan la transcripción y la traducción en organismos, en particular en levaduras.

Los casetes de expresión contienen señales de regulación, es decir, secuencias de ácidos nucleicos reguladoras, que controlan la expresión de la secuencia codificadora en la célula huésped. Según una realización preferida, el casete de expresión abarca corriente arriba, es decir, en el extremo 5' de la secuencia codificadora, un promotor y, corriente abajo, es decir, en el extremo 3', un terminador y, en su caso, otros elementos reguladores que están vinculados operativamente con la secuencia intermedia codificadora para al menos uno de los genes descritos aquí.

Se entiende por vinculación operativa la disposición secuencial de promotor, secuencia codificadora, en su caso, terminador y, en su caso, otros elementos reguladores, de manera que cada uno de los elementos reguladores puede desempeñar su función según lo previsto en la expresión de la secuencia codificadora.

A continuación se describen a modo de ejemplo los constructos de ácidos nucleicos, los casetes de expresión y los plásmidos preferidos para levaduras y hongos y el procedimiento para fabricar levaduras transgénicas, así como las propias levaduras transgénicas.

Básicamente como promotor del casete de expresión resulta adecuado cualquier promotor que pueda controlar la expresión de genes externos en organismos, en particular en levaduras.

Preferiblemente se utiliza en particular un promotor que en la levadura está sujeto a una regulación reducida, como por ejemplo el promotor ADH medio.

Este fragmento del promotor *ADH12s*, en adelante también denominado *ADH1*, muestra una expresión casi constitutiva (Ruohonen L., Penttilä M., Keranen S. (1991) Optimization of Bacillus alpha-amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. May-Jun; 7 (4): 337-462; Lang C., Looman AC. (1995) Efficient expression and secretion of Aspergillus niger RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Dec; 44(1-2): 147-56), de manera que la regulación transcripcional ya no tiene lugar mediante productos intermedios de la biosíntesis del ergosterol.

Otros promotores preferidos con regulación reducida son promotores constitutivos, como por ejemplo el promotor TEF1 de la levadura, el promotor GPD de la levadura o el promotor PGK de la levadura (Mumberg D., Muller R., Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene. 1995 Apr. 14; 156(1): 119-22; Chen, CY., Oppermann, H., Hitzeman, RA. (1984) Homologous versus heterologous gene expression in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. Dec 11; 12(23): 8951-70).

El casete de expresión también puede contener promotores inducibles, en particular un promotor químicamente inducible a través del que es posible controlar la expresión de los ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 24$ -reductasa, una HMG-CoA-reductasa, una lanosterol-C14-demetilasa, una escualeno epoxidasa, una escualeno sintetasa o una esterol-aciltransferasa en el organismo en un momento determinado.

Pueden utilizarse, promotores tales como el promotor Cupl de la levadura (Etcheverry T. (1990) Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. Methods Enzymol. 1990; 185:319-29), el promotor Gall-10 de la levadura (Ronicke V., Graulich W., Mumberg D., Muller R., Funk M. (1997) Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Methods Enzymol. 283:313-22) o el promotor Pho5 de la levadura (Bajwa W., Rudolph H., Hinnen A. (1987) PHO5 upstream sequences confer phosphate control on the constitutive PHO3 gene. Yeast. 1987 Mar; 3(1): 33-42).

Como terminador del casete de expresión resulta adecuado básicamente cualquier terminador que pueda controlar la expresión de genes externos en los organismos, en particular en las levaduras.

Se prefiere el terminador de triptófano de la levadura (terminador TRP1).

La fabricación de un casete de expresión tiene lugar preferiblemente mediante la fusión de un promotor adecuado con los ácidos nucleicos descritos aquí que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, una $\Delta 5$ -desaturasa, una $\Delta 24$ -reductasa, una HMG-CoA-reductasa, una lanosterol-C14-demetilasa, una escualeno epoxidasa, una escualeno sintetasa o una

esterol-aciltransferasa y, en su caso, un terminador según las técnicas de recombinación y clonación habituales, como las que se describen en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), o en T. J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F. M. et al., *Current protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Los ácidos nucleicos según la invención pueden fabricarse sintéticamente u obtenerse de forma natural, o bien contener una mezcla de componentes sintéticos y naturales de ácidos nucleicos, así como constar de diferentes porciones de genes heterólogos de diversos organismos.

Como se ha descrito antes, se prefieren secuencias sintéticas de nucleótidos con codones que son preferidos por las levaduras. Estos codones preferidos por las levaduras pueden determinarse a partir de codones que tienen la máxima frecuencia de proteínas que se expresan en la mayor parte de las especies de levaduras interesantes.

En la preparación de un casete de expresión pueden manipularse diversos fragmentos de ADN para obtener una secuencia de nucleótidos que lee de forma apropiada en la dirección correcta y que está provista de un marco de lectura correcto. Para la unión de los fragmentos de ADN entre sí a los fragmentos pueden unirse adaptadores o engarzadores.

De manera apropiada las regiones del promotor o del terminador pueden estar dotadas en la dirección de transcripción de un engarzador o un poliengarzador que contiene uno o varios sitios de restricción para la inserción de esta secuencia. Por regla general el engarzador tiene de 1 a 10, en su mayoría de 1 a 8, preferiblemente de 2 a 6 sitios de restricción. Por lo general, dentro de las áreas reguladoras, el engarzador tiene un tamaño de menos de 100 bp, con frecuencia de menos de 60 bp, si bien de al menos 5 bp. El promotor puede ser tanto nativo u homólogo como externo o heterólogo respecto al organismo huésped. El casete de expresión contiene preferiblemente en la dirección de transcripción 5'-3' el promotor, una secuencia de ácidos nucleicos codificadora o un constructo de ácidos nucleicos y una región para la terminación transcripcional. Pueden intercambiarse diferentes áreas de terminación según se prefiera.

También pueden utilizarse manipulaciones que proporcionen sitios de restricción adecuados o que eliminen el ADN o los sitios de restricción superfluos. Donde entran en consideración inserciones, deleciones o sustituciones, como por ejemplo transiciones y transversiones, es posible utilizar mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción o la ligación.

En el caso de manipulaciones adecuadas, tales como por ejemplo, restricción, *chewing-back* (mascadura) o relleno de partes sobresalientes (colgantes) de extremos romos (*bluntends*) pueden proporcionarse extremos complementarios de los fragmentos para la ligación.

La invención también se refiere a la utilización de los ácidos nucleicos aquí descritos, de los constructos de ácidos nucleicos aquí descritos o de las proteínas aquí descritas para la fabricación de organismos transgénicos, en particular, levaduras.

Preferiblemente estos organismos transgénicos, en particular las levaduras, presentan respecto al tipo silvestre un contenido aumentado en 7-dehidrocolesterol.

Así pues, la invención se refiere también al uso de los ácidos nucleicos aquí descritos o de los constructos de ácidos nucleicos según la invención para el aumento del contenido en 7-dehidrocolesterol y/o sus productos intermedios y/o secuenciales biosintéticos.

Las proteínas y los ácidos nucleicos aquí descritos pueden utilizarse para la fabricación de 7-dehidrocolesterol en organismos transgénicos.

La transferencia de genes externos al genoma de un organismo, en particular de levadura, recibe el nombre de transformación.

Para ello, en particular en el caso de las levaduras, pueden utilizarse métodos conocidos para la transformación.

Son métodos adecuados para la transformación de levaduras, por ejemplo, el método LiAC, tal como se describe en Schiestl RH., Gietz RD. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier, *Curr Genet. Dec*; 16(5-6):339-46, la electroporación tal como se describe en Manivasakam P., Schiestl RH. (1993) High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res. Sep* 11; 21(18):4414-5, o la fusión de protoplastos, tal como se describe en Morgan AJ. (1983) Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation, *Experientia Suppl.* 46:155-66.

Preferiblemente el constructo que va a expresarse se clona en un vector, en particular, en plásmidos, que resultan adecuados para transformar levaduras, como por ejemplo, los sistemas de vectores Yep24 (Naumovski L., Friedberg EC. (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol Oct*; 152(1):323-31), Yep13 (Borach JR., Strathern JN., Hicks JB. (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene. *Gene.* 1979 Dec; 8(1); 121.33), la serie pRS de vectores (centromérico y episomal) (Sikorski RS., Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* May; 122(1); 19-27), así como los sistemas de vectores YCp19 o pYEXBX.

En consecuencia, la invención se refiere también a vectores, en particular a plásmidos que contienen los ácidos nucleicos, los constructos de ácidos nucleicos o los casetes de expresión descritos aquí.

La invención también puede explicarse con un procedimiento para la fabricación de organismos genéticamente modificados, en donde en el organismo de partida se introduce funcionalmente un ácido nucleico aquí descrito o un constructo de ácidos nucleicos aquí descrito.

La invención se refiere también a los organismos genéticamente modificados según la reivindicación 40.

En una realización preferida el organismo genéticamente modificado presenta frente al tipo silvestre, además de las modificaciones genéticas aquí descritas, una actividad reducida de al menos una de las actividades, seleccionada del grupo de la actividad de la C24-metiltransferasa y la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa.

La reducción de al menos una de las actividades respecto al tipo silvestre se consigue preferiblemente mediante una reducción de la expresión génica de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de los ácidos nucleicos que codifican una C24-metiltransferasa y los ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 22$ -desaturasa.

Un organismo genéticamente modificado especialmente preferido no presenta ningún gen funcional de C24-metiltransferasa y/o gen de $\Delta 22$ -desaturasa además de las modificaciones genéticas aquí descritas.

Especialmente preferidos son los organismos genéticamente modificados, mencionados aquí, en los que la modificación genética aumenta respecto al tipo silvestre además al menos una de las actividades seleccionadas del grupo de la actividad de la HMG-CoA-reductasa, la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno epoxidasa, la actividad de la escualeno sintetasa y la actividad de la esterol-aciltransferasa.

Preferiblemente, tal como se ha mencionado antes, el aumento de al menos una de estas actividades frente al tipo silvestre tiene lugar mediante el aumento de la expresión génica de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.

Preferiblemente el aumento respecto al tipo silvestre de la expresión génica de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, tiene lugar mediante el aumento del número de copias de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa en el organismo.

Por consiguiente, la invención se refiere preferentemente a un organismo genéticamente modificado descrito aquí que contiene dos o más ácidos nucleicos de al menos un ácido nucleico seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.

En particular la invención se refiere preferentemente a un organismo genéticamente modificado que, además de las modificaciones genéticas aquí descritas, contiene dos o más ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.

Los organismos genéticamente modificados descritos aquí presentan frente al tipo silvestre una cantidad aumentada de 7-dehidrocolesterol.

Son organismos genéticamente modificados preferidos según la invención las levaduras o los hongos genéticamente modificados, en particular las levaduras genéticamente modificadas según la invención, en particular la especie de levadura genéticamente modificada según la invención *Saccharomyces cerevisiae*, en particular las cepas de levadura genéticamente modificadas *Saccharomyces cerevisiae* AH22, *Saccharomyces cerevisiae* GRF, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747 y *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Aumento del contenido en 7-dehidrocolesterol significa en el marco de la presente invención preferiblemente la capacidad obtenida artificialmente de una biosíntesis aumentada de al menos uno de estos compuestos en el organismo genéticamente modificado frente al organismo no modificado genéticamente.

En consecuencia, por tipo silvestre se entiende, como se mencionó al principio, el organismo no modificado genéticamente, en particular el organismo de referencia mencionado aquí.

Por aumento en el contenido de 7-dehidrocolesterol en comparación con el tipo silvestre se entiende en particular el aumento en el organismo del contenido de uno de los compuestos mencionados aquí en al menos un 50%, preferiblemente un 100%, más preferentemente un 200%, de manera especialmente preferente un 400% en comparación con el tipo silvestre.

La determinación del contenido en al menos uno de los compuestos mencionados tiene lugar según uno de los métodos analíticos conocidos y se refiere preferiblemente a los compartimentos del organismo en los que se producen esteroides.

La invención se explica mediante los ejemplos que se incluyen a continuación, si bien no está limitada a los mismos:

I. Condiciones experimentales generales

1. Restricción

La restricción de los plásmidos (1 a 10 µg) se realizó en preparaciones de 30 µl. El ADN se incluyó en 24 µl de H₂O, y se mezcló con 3 µl del tampón correspondiente, 1 ml RSA (albúmina de suero de bovino) y 2 µl de enzima. La concentración enzimática era de 1 unidad/µl o de 5 unidades/µl según la cantidad de ADN. En algunos casos a la preparación se le añadió también 1 µl de RNasa para descomponer el ARN-t. La preparación de restricción se incubó durante 2 horas a 37 °C. La restricción se controló con un minigel.

2. Electroforesis en gel

Las electroforesis en gel se realizaron en aparatos de minigel o minigel ancho. Los minigeles (aprox. 20 ml, 8 bolsas) y los minigeles anchos (50 ml, 15 o 30 bolsas) constaban de agarosa al 1% en TAE. Como tampón de electroforesis se utilizó 1 x TAE. Las muestras (10 µl) se mezclaron con 3 µl de solución de parada y se aplicaron en el gel. Como solución estándar sirvió ADN-I cortado con *Hind*III (bandas en: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Para la separación se creó una tensión de 80 V durante 45 a 60 minutos. A continuación el gel se coloreó en

solución de bromuro de etidio y se sujetó bajo luz UV con el sistema de documentación por vídeo INTAS o se fotografió con un filtro naranja.

3. Elución en gel

Se utilizó una elución en gel para aislar los fragmentos deseados. La preparación de restricción se aplicó en varias
5 bolsas de un minigel y se separó. Sólo $\square$ -HindIII y una "traza sacrificial" se colorearon en una solución de bromuro de etidio, se observaron con luz UV y se marcó el fragmento deseado. De este modo se impidió que el ADN del resto de bolsas se dañara por la acción del bromuro de etidio y la luz UV. Con la colocación uno al lado de la pieza de gel coloreada y no coloreada a partir de la marca pudo recortarse el fragmento deseado a partir de la pieza de gel no coloreada. La pieza de agarosa con el fragmento que debía aislarse se introdujo en una manguera de diálisis, se
10 cerró sin burbujas con poco tampón TAE y se colocó en el aparato de minigel Biorad. El tampón de electroforesis constó de 1 x TAE y la tensión fue de 100 V durante 40 minutos. A continuación la polaridad de la corriente se cambió durante 2 minutos para volver a desprender el ADN pegado en la manguera de diálisis. El tampón de la manguera de diálisis que contenía los fragmentos de ADN se transfirió a tubos de reacción y con ello se realizó una precipitación con etanol. Además, a la solución de ADN se le añadió 1/10 del volumen de 3 M de acetato de sodio,
15 ARNt (1 μ l por 50 μ l de solución) y 2,5 veces el volumen de etanol al 96% helado. La preparación se incubó durante 30 minutos a -20 °C y, después, se centrifugó a 12000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN se secó y se incluyó en 10 a 50 μ l de H₂O (según la cantidad de ADN).

4. Tratamiento de Klenow

Con el tratamiento de Klenow los extremos sobrenadantes de los fragmentos de ADN se rellenan de manera que
20 surgen extremos romos ("blunt-ends"). Por cada μ g de ADN se pipeteó la siguiente preparación:

25	Sedimento de ADN	+ 11 μ l	H ₂ O
		+ 1,5 μ l	10 x tampón Klenow
		+ 1 μ l	0,1 M DTT
		+ 1 μ l	nucleótidos (dNTP 2 mM)
		+ 1 μ l	polimerasa Klenow (1 unidad/ μ l)

El ADN debía proceder en este caso de una precipitación de etanol para evitar que las impurezas inhibieran la polimerasa de Klenow. La incubación se realizó durante 30 minutos a 37 °C y mediante otros 5 minutos a 70 °C se detuvo la reacción. El ADN se obtuvo de la preparación mediante una precipitación de etanol y se incluyó en 10 μ l de H₂O.

30 5. Ligación

Los fragmentos de ADN que debían ligarse se unieron. El volumen final de 13,1 μ l contenía aprox. 0,5 μ l de ADN con una relación vector-inserto de 1:5. La muestra se incubó durante 45 segundos a 70 °C, se enfrió a temperatura ambiente (aprox. 3 minutos) y, después, se incubó durante 10 minutos en hielo. Acto seguido, se añadieron los
35 tampones de ligación: 2,6 μ l 500 mM TrisHCl pH 7,5 y 1,3 μ l 100 mM de MgCl₂, y se incubó otros 10 minutos en hielo. Tras la adición de 1 μ l 500 mM de DTT y 1 μ l 10 mM de ATP y una nueva incubación de 10 minutos en hielo se añadió 1 μ l de ligasa (1 unidad/ μ l). Todo el procedimiento debía tener lugar sin vibraciones para no volver a separar los extremos de ADN que estaban uno junto al otro. La ligación tuvo lugar durante la noche a 14 °C.

6. Transformación de E. Coli

Células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) NM522 se transformaron con el ADN de la preparación de ligación.
40 Como control positivo se utilizó una preparación con 50 μ g del plásmido pScl3 y, como control cero, una preparación sin ADN. Para cada preparación de transformación se pipetearon 100 μ l de solución PEG al 8%, 10 μ l de ADN y 200 μ l de células competentes (*E. coli* NM522) en el tubo de una centrifugadora de sobremesa. Las preparaciones se colocaron durante 30 minutos en hielo y se agitaron un poco.

A continuación, tuvo lugar el shock térmico: 1 minuto a 42 °C. Para la regeneración se añadió a las células 1 ml de medio LB y se incubó durante 90 minutos a 37 °C en un agitador. 100 μ l de la preparación no diluida, 100 μ l de una dilución 1:10 y 100 μ l de una dilución 1:100 se colocaron en placas de LB + ampicilina y se incubaron a 37 °C durante la noche.

7. Aislamiento del plásmido de *E. coli* (minipreparación)

Se tomaron colonias de *E. coli* y se concentraron durante la noche en 1,5 ml de medio de LB + ampicilina en el tubo de una centrifugadora de sobremesa a 37 °C y a 120 rpm. Al día siguiente las células se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm y 4 °C y el sedimento se incluyó en 50 µl de tampón TE.

- 5 Cada preparación se mezcló con 100 µl 0,2 N NaOH, solución de SDS al 1% y se colocó durante 5 minutos en hielo (lisis de las células). A continuación se añadieron 400 µl de solución de acetato de Na/NaCl (230 µl H₂O, 130 µl 3 M de acetato de sodio, 40 µl 5 M de NaCl), la preparación se mezcló y se colocó en hielo durante otros 15 minutos (precipitación de proteínas). Después de una centrifugación de 15 minutos a 11.000 rpm el sobrenadante, que contenía el ADN plásmido, se transfirió a una pipeta de Eppendorf. Si el sobrenadante no estaba totalmente claro, se
- 10 centrifugó otra vez. El sobrenadante se mezcló con 360 µl de isopropanol helado y se incubó durante 30 minutos a -20 °C (precipitación de ADN). El ADN se centrifugó (15 minutos, 12.000 rpm, 4 °C), el sobrenadante se desechó, el sedimento se lavó en 100 µl de etanol al 96% helado, se incubó durante 15 minutos a -20 °C y se centrifugó de nuevo (15 minutos, 12.000 rpm, 4 °C). El sedimento se secó en un Speed Vac y después se incluyó en 100 µl de H₂O. El ADN plásmido se caracterizó mediante un análisis de restricción. Para ello se restringieron 10 µl de cada
- 15 preparación y se separaron mediante electroforesis en gel en un minigel ancho (véase más arriba).

8. Procesamiento del plásmido de *E. coli* (maxipreparación)

- Para aislar cantidades mayores de ADN plásmido, se utilizó el método de maxipreparación. Dos matraces con 100 ml de medio de LB + ampicilina se inocularon con una colonia o con 100 µl de un cultivo congelado que portaba el plásmido que debía aislarse y, después, se incubó durante la noche a 37 °C y 120 rpm. El producto (200 ml) se
- 20 transfirió al día siguiente a un recipiente GSA y se centrifugó a 4000 rpm (2600 x g) durante 10 minutos. El sedimento celular se incluyó en 6 ml de tampón TE. Para la descomposición de la pared celular se añadieron 1,2 ml de solución de lisozima (20 mg/ml tampón TE) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la lisis de las células con 12 ml 0,2 N NaOH, solución SDS al 1% y otra incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas se precipitaron mediante la adición de 9 ml de solución de 3 M acetato de sodio refrigerado (pH 4,8) y una incubación de 15 minutos en hielo. Después de la centrifugación (GSA:
 - 25 13.000 rpm (27.500 x g), 20 minutos, 4 °C), el sobrenadante, que contenía el ADN, se transfirió a un nuevo recipiente GSA y el ADN se precipitó con 15 ml de isopropanol helado y una incubación de 30 minutos a -20 °C. El sedimento de ADN se lavó en 5 ml de etanol helado y se secó al aire (aprox. 30 - 60 minutos). A continuación se incluyó en 1 ml de H₂O. Se realizó una comprobación del plásmido mediante análisis de restricción. La
 - 30 concentración se determinó mediante la aplicación de diluciones en un minigel. Para reducir el contenido en sal se realizó una microdiálisis de 30 a 60 minutos (tamaño del poro 0,025 µm).

9. Transformación de la levadura

- Para la transformación de la levadura se utilizó un cultivo previo de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AH22. Un matraz con 20 ml de medio YE se inoculó con 100 µl de cultivo congelado y se incubó durante la noche a 28 °C y
- 35 120 rpm. El cultivo principal tuvo lugar en las mismas condiciones en un matraz con 100 ml de medio YE, que se inocularon con 10 µl, 20 µl o 50 µl del cultivo previo.

9.1 Creación de células competentes

- Al día siguiente los matraces se contaron mediante una cámara Thoma y se siguió trabajando con el matraz que tenía un número de células de $3 - 5 \times 10^7$ células/ml. Las células se recolectaron mediante centrifugación (GSA: 5000 rpm (4000 x g) 10 minutos). El sedimento celular se incluyó en 10 ml de tampón TE y se distribuyó entre dos tubos de centrifugadora de sobremesa (5 ml en cada uno). Las células se centrifugaron durante 3 minutos a 6000 rpm y se
- 40 lavaron otras dos veces con sendos tampones TE de 5 ml. A continuación el sedimento celular se incluyó en 330 µl de tampón de acetato de litio por cada 10^9 células, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se agitó durante una hora a 28 °C. De este modo, las células resultaron ser competentes para la transformación.

9.2 Transformación

Para cada preparación de transformación, en el tubo de una centrifugadora de sobremesa se pipetearon 15 µl de ADN de esperma de arenque (10 mg/ml), 10 µl del ADN a transformar (aprox. 0,5 µg) y 330 µl de células

competentes y se incubaron durante 30 minutos a 28 °C (sin agitar). A continuación se añadieron 700 µl de PEG 6000 al 50% y se incubó durante otra hora a 28 °C, sin agitación. Acto seguido se procedió a un shock térmico de 5 minutos a 42 °C.

- 5 100 µl de la suspensión se colocaron en el medio de selección (YNB, Difco) para seleccionar una prototrofia de leucina. En el caso de la selección en la resistencia a G418 después del shock térmico tiene lugar una regeneración de las células (véase punto 9.3 Fase de regeneración).

9.3 Fase de regeneración

- 10 Como el marcador de selección es la resistencia frente a G418, las células necesitaron tiempo para la expresión del gen de resistencia. Las preparaciones de transformación se mezclaron con 4 ml de medio YE y se incubaron durante la noche a 28 °C en el agitador (120 rpm). Al día siguiente la células se centrifugaron (6000 rpm, 3 minutos), se incluyeron en un 1 ml de medio YE y de ellas 100 µl o 200 µl se colocaron en placas YE + G418. Las placas se incubaron a 28 °C durante varios días.

10. Condiciones para la RCP

- 15 Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa deben optimizarse para cada caso concreto y no son válidas de manera ilimitada para todas las preparaciones. Así, entre otros, puede variarse la cantidad utilizada de ADN, la concentración de sal y la temperatura de fusión. Para el problema que nos ocupa resultó favorable utilizar una pipeta de Eppendorf, que era adecuada para su uso en el termociclador, para reunir las siguientes sustancias: A 2 µl (= 0,1 U) de Taq polimerasa Super se añadieron 5 µl de tampón Super, 8 µl de dNTPs (0,625 µM de cada), cebador 5', cebador 3' y 0,2 µg de matrices de ADN, disueltas en agua suficiente para dar un volumen total de 50 µl para la preparación de la RCP. La preparación se centrifugó brevemente y se recubrió con una gota de aceite. Se seleccionaron entre 37 y 40 ciclos para la amplificación.

II. Ejemplos

Los ejemplos 1 a 5 son ejemplos comparativos, mientras que el ejemplo 6 es un ejemplo según la invención.

Ejemplo 1

- 25 Expresión y sobreexpresión de una HMG-CoA-reductasa truncada, una escualeno epoxidasa (ERG1) y/o una lanosterol-C14-demetilasa (ERG11), en parte mediante la delección de *ERG5* y *ERG6* en *S. cerevisiae* GRF18 o GRFura3

1.1 Fabricación de los plásmidos pFlat1 y pFlat3 y pFlat4

- 30 Para la fabricación del vector de expresión pFlat3 el plásmido YEp24 (Naumovski, L., Friedberg EC (1982) Molecular cloning of eucaryotic genes required for excision repair of UV-irradiated DNA: isolation and partial characterization of the RAD3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol Oct; 152(1): 323-31) se linealizó mediante restricción con *SphI* y se integró un fragmento de *SphI* de 900 bp del vector pPT2B (Lang C., Looman AC (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Dec.; 44(1-2): 147-56), que contenía el promotor *ADH1* y el terminador *TRP1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y un sitio de clonación múltiple del vector pUC19 (Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 1985; 33(1): 103-19).

El sitio de clonación múltiple se amplió mediante un poliengarzador que contenía los sitios de restricción *NotI* y *XhoI*. El poliengarzador se integró a través del punto de corte *SalI* del vector. El plásmido resultante se llama pFlat1.

- 40 Para la fabricación del vector pFlat3, el vector pFlat1 se linealizó mediante la enzima *NcoI* y se sometió a tratamiento de Klenow para producir extremos romos (blunt ends). A continuación, a partir del plásmido YDpL (Berben, G., Dumont, J., Guilliquet, V., Bolle, P.A. and Hilger, F. (1991) The YDp Plasmids: a Uniform Set of Vectors Bearing Versatile Disruption Cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7: 475-477) se integró un fragmento *BamHI*

convertido en extremo romo mediante tratamiento de Klenow de la polimerasa, que contenía el gen *LEU2* de la levadura.

Para la fabricación del vector pFlat4, el vector pFlat1 se linealizó mediante la enzima *NcoI* y se sometió a tratamiento de Klenow para producir extremos romos (blunt ends). A continuación, a partir del plásmido YDpH (Berben et al. 1991) se integró un fragmento *BamHI* convertido en extremo romo mediante tratamiento de Klenow de la polimerasa, que contenía el gen *HIS3* de la levadura.

1.2 Integración de *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, *ERG2* o *ERG3* o del gen de la $\Delta 24$ -reductasa en los vectores pFlat1, pFlat3 y pFlat4

En primer lugar se utilizó una RCP para insertar un sitio de restricción *NotI* en el sitio codificador 5' de los genes *ERG1*, *ERG11*, *ERG4*, $\Delta 24$ -reductasa, *ERG2* o *ERG3* y un sitio de restricción *XhoI* en el sitio codificador 3' de los genes y las regiones codificadoras correspondientes se amplificaron. A continuación, los amplificados se trataron con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI*. Paralelamente los plásmidos pFlat1, pFlat3 y pFlat4 se trataron con las enzimas *NotI* y *XhoI*. Mediante ligación con la T4-ligasa los amplificados cortados se integraron después en los plásmidos cortados. La figura 7 muestra a modo de ejemplo el plásmido pFlat-3-*ERG4*.

Secuencias cebadoras para la clonación de *ERG1*, *ERG11*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, $\Delta 24$ -reductasa:

Cebador *ERG1*-5' (SEQ. ID. nº 51):

CTGCGGCCGC ATCATGTCTG CTGTTAACGT TGC

Cebador *ERG1*-3' (SEQ. ID. nº 52):

TTCTCGAGTT AACCAATCAA CTCACCAAAC

Cebador *ERG11*-5' (SEQ. ID. nº 53):

CTGCGGCCGCAGGATGTCTGCTACCAAGTCAATCG

Cebador *ERG11*-3' (SEQ. ID. nº 54):

ATCTCGAGCTTAGATCTTTTGTCTTGATTCTC

Cebador *ERG2*-5' (SEQ. ID. nº 55):

CTGCGGCCGCACCATGAAGTTTTTCCCACT CC

Cebador *ERG2*-3' (SEQ. ID. nº 56):

TTCTCGAGTTAGAACTTTTTGTTTTGCAACAAG

Cebador *ERG3*-5' (SEQ. ID. nº 57):

CTGCGGCCGCAATATGGATTTGGTCTTAGAAGTCG

Cebador *ERG3*-3' (SEQ. ID. nº 58):

AACTCGAGTCAGTTGTTCTTCTTGGTATTTG

Cebador *ERG4*-5' (SEQ. ID. nº 59):

CTGCGGCCGCACTATGGCAAAGGATAATAGTGAG

Cebador *ERG4*-3' (SEQ. ID. nº 60):

TTCTCGAGCTAGAAAACATAAGGAATAAAGAC

Cebador Δ24R-5' (SEQ. ID. nº 47):

CTGCGGCCGCAAGATGGAGCCCCGCGTGTCGC

Cebador Δ24R-3' (SEQ. ID. nº 48):

AACTCGAGTCAGTGCCTTGCCGCCTTGC

5 1.3 Fabricación de los vectores de integración pUG6-*tHMG*, pUG6-*ERG1*, pUG6-*ERG11*

1.3.1 pUG6-*tHMG*

La secuencia de ADN para el casete de expresión del promotor *ADH1*-terminador *tHMG*-triptófano se aisló a partir del vector YepH2 (Polakowski, T., Stahl, U., Lang, C. (1998): Overexpression of a cytosolic HMG-CoA reductase in yeast leads to squalene accumulation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 66-71) mediante restricción con las enzimas *EcoRV* y *Bsp68I* (*NruI*) utilizando métodos estándar. El fragmento de ADN obtenido se clonó en el vector pUG6 (Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul 1; 24(13):2519-24) por ligación de extremos romos en el punto de corte de *EcoRV* y dio lugar al vector con la designación pUG6-*tHMG* (figura 1).

1.3.2 pUG6-*ERG1*

La secuencia de ADN para el casete de expresión del promotor *ADH1*-terminador *ERG1*-triptófano se aisló a partir del vector pFlat3-*ERG1* mediante restricción con las enzimas *NheI* y *Bsp68I* (*NruI*) utilizando métodos estándar. El fragmento de ADN obtenido se clonó según un tratamiento de Klenow en el vector pUG6 (Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24) por ligación de extremos romos en el punto de corte de *EcoRV* y dio lugar al vector con la designación pUG6-*ERG1* (figura 2).

1.3.3 pUG6-*ERG11*

La secuencia de ADN para el casete de expresión del promotor *ADH1*-terminador *ERG11*-triptófano se aisló a partir del vector pFlat3-*ERG11* mediante restricción con las enzimas *EcoRV* y *Bsp68I* (*NruI*) utilizando métodos estándar. El fragmento de ADN obtenido se clonó en el vector pUG6 (Güldener, U et al. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24) por ligación de extremos romos en el punto de corte de *EcoRV* y dio lugar al vector con la designación pUG6-*ERG11* (figura 3).

1.4. Transformación integradora de los casetes de expresión en las cepas de levadura GRP o GRFura3

Tras el aislamiento de plásmidos se amplificaron fragmentos de los vectores pUG6- *tHMG*, pUG6-*ERG1* y pUG6-*ERG11* mediante RCP de manera que los fragmentos resultantes constaran de los siguientes componentes: *loxP*-*kanMX*-*loxP*-promotor *ADH1*-gen de destino-terminador de triptófano, en donde por gen de destino se entiende *tHMG*, *ERG1* o *ERG11* y por *kanMX*, un gen de resistencia a la kanamicina.

Como cebadores se seleccionaron secuencias de oligonucleótidos que, en el área de recocido, contenían las secuencias más allá de los casetes a amplificar del vector pUG6-gen de destino y, en los extremos 5' y 3', contenían colgantes 40 pares de bases cada vez de la secuencia 5' o de la secuencia 3' del locus de integración. De este modo se garantiza que, por un lado, todo el fragmento, incluido *KanMX* y gen de destino se amplifican y, por otro lado, que este fragmento puede transformarse a continuación en levadura e integrarse mediante recombinación homóloga en el locus del gen de destino de la levadura. A este respecto, en función del locus del gen de destino de la levadura se utilizaron como cebador las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

Para la integración en el locus génico URA3:

URA3-Crelox-5' (SEQ. ID nº 33):

5'-ATGTCGAAAG CTACATATAA GGAACGTGCT GCATCTCATC CCAGCTGAAG CTTCGTACGC-3'

URA3-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 34):

5'-TTAGTTTTGC TGGCCGCATC TTCTCAAATA TGCTTCCCAG GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

Para la integración en el locus génico LEU2:

LEU2-Crelox-5' (SEQ. ID. nº 35):

5 5'-GAATACTCAG GTATCGTAAG ATGCAAGAGT TCGAATCTCT CCAGCTGAAG CTTCGTACGC-3'

LEU2-Crelox-3' (SEQ. ID. nº 36):

5'-TCTACCCTAT GAACATATTC CATTTTGTAA TTTCGTGTCG GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

Para la integración en el locus génico HIS3:

HIS3-Crelox-5' (SEQ. ID. No. 37):

10 5'-ATGACAGAGC AGAAAGCCCT AGTAAAGCGT ATTACAAATG CCAGCTGAAG CTTCGTACGC-3'

HIS3-Crelox-3' (SEQ. ID. No. 38):

5'-CTACATAAGA ACACCTTTGG TGGAGGGAAC ATCGTTGGTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

Para la integración en el locus génico ERG6:

ERG6-Crelox-5' (SEQ. ID. nº 39):

15 5'-ATGAGTGAAA CAGAATTGAG AAAAAGACAG GCCCAATTCA CCAGCTGAAG CTTCGTACGC-3'

ERG6-Crelox-3' (SEQ. ID. nº 40):

5'-TTATTGAGTT GCTTCTTGGG AAGTTTGGGA GGGGGTTTCG GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

Para la integración en el locus génico ERG5:

ERG5-Crelox-5' (SEQ. ID. nº 41):

20 5'-ATGAGTTCTG TCGCAGAAAA TATAATACAA CATGCCACTC CCAGCTGAAG CTTCGTACGC-3'

ERG5-Crelox-3' (SEQ. ID. nº 42):

5'-TTATTCGAAG ACTTCTCCAG TAATTGGGTC TCTCTTTTTC GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG-3'

25 Como marcador de selección sirvió la resistencia frente a geneticina (G418). Las cepas resultantes contenían una copia del gen de destino correspondiente (*tHMG*, *ERG1* o *ERG11*) bajo el control del promotor *ADH* y el terminador de triptófano. Al mismo tiempo fue posible suprimir el gen correspondiente del locus de destino mediante la integración del casete de expresión. Para volver a eliminar a continuación el gen para la resistencia frente a G418, la cepa de levadura surgida se transformó con el vector pSH47 que contenía la recombinasa *cre* (Guldener, U, Heck, S, Fielder, T, Beinhauer, J, Hegemann, JH. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. Jul 1;24(13):2519-24.). A través de este vector la recombinasa *cre* se expresó en la

30 levadura, lo que tuvo como consecuencia que el área comprendida entre las dos secuencias *loxP* se recombinara, lo que a su vez tuvo como consecuencia que solo quedara una de las dos secuencias *loxP* y los casetes de expresión promotor *ADH1-gen de destino*-terminador de triptófano en el locus de destino.

35 La consecuencia es que la cepa de la levadura vuelve a perder su resistencia a G418 y, con ello, resulta apropiada para integrar o eliminar otros genes en la cepa de la levadura mediante este sistema "cre-lox". El vector pSH47 puede eliminarse de forma selectiva a continuación mediante cultivo en medio FOA.

De esta manera es posible integrar uno detrás de otro varios genes de destino en la cepa de la levadura bajo el control del promotor ADH1 y el terminador de triptófano en diversos locus de destino.

- 5 Primero se integra un gen de destino en el locus *URA3*, o se usa una cepa *ura3* para que la cepa de levadura para uracilo sea auxótrofa, pues el vector pSH47 contiene un gen *URA3* para la selección de cepas protótrofas para uracilo. La figura 4 muestra un ejemplo metódico.

Con este método se fabricaron las cepas de delección o integración de levadura que se incluyen en la tabla 1, en donde, del modo conocido, el gen está en minúsculas en el caso de delección, y está en mayúsculas en el caso de integración.

Tabla 1

Nº	Nombre de la cepa	Modificación respecto a la cepa de levadura GRF
I	GRFtH1	<i>ura3, tHMG:leu2</i>
II	GRFtH1E1	<i>ERG1:ura3, tHmG:leu2</i>
III	GRFtH1E11	<i>ura3, tHMG:leu2, ERG11:his3</i>
IV	GRFtH1E1E11	<i>ERGI:ura3, tHMG:leu2, ERG11:his3</i>
V	GRFtH1E1E11 <i>erg5erg6</i>	<i>ura3, tHMG:leu2, ERG1:erg6, ERG11:erg5</i>
VI	GRFtH1 <i>erg5erg6</i>	<i>ura3, tHMG: leu2, erg5, erg6</i>

10

Las cepas de levadura se cultivaron durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 µl de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

- 15 Los esteroides y el escualeno se extrajeron después de 3 días (Parks LW, Bottema CD, Rodriguez RJ, Lewis TA. (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. Methods Enzymol. 1985;111:333-46) y se analizaron mediante cromatografía de gases. Se produjeron los siguientes valores (véase tabla 2).

Tabla 2

Nº	Nombre de la cepa	Contenido en esteroides 1 a 11 en [superficie pico/gTS]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I	GRFtH1	9,9	0,8	0,3	1,2	1,1	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7
II	GRFtH1E1	6,8	1,9	0,4	1,5	2,2	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9
III	GRFtH1E11	9,9	0,4	0,7	2,3	1,9	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
IV	GRFtH1E1E11	6,0	1,2	0,9	3,0	2,3	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2
V	GRFtH1E1E11 <i>erg5erg6</i>	5,8	0,8	0,4	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0
VI	GRFtH1 <i>erg5erg6</i>	9,9	0,8	0,3	12,6	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0

- 1 = escualeno
- 2 = lanosterol
- 3 = dimetil-zimosterol
- 4 = zimosterol
- 5 5 = fecosterol
- 6 = episterol
- 7 = colest-7,24-dienol
- 8 = colest-8-enol
- 9 = colest-5,7,24 trienol
- 10 10 = 7-dehidrocolesterol
- 11 = ergosterol

Ejemplo 2

Expresión del gen heterólogo que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa (Ebp) del ratón (*Mus musculus*) en la levadura.

15 La secuencia de ADNc de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Mus musculus* (Moebius, F.F., Soellner, K.E.M., Fiechter, B., Huck, C.W., Bonn, G., Glossmann, H. (1999): Histidine77, Glutamic Acid123, Threonine126, Asparagine194, and Tryptophan197 of Human Emopamil Protein Are Required for in Vivo Sterol $\Delta 8$ - $\Delta 7$ Isomerisation. *Biochem.* 38, 1119-1127.) se amplificó mediante RCP a partir del clon de ADNc IMAGp998A22757 (huésped: *E. coli* DH10B) del "Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH" (Berlin).

20 Los cebadores utilizados aquí son los oligómetros de ADN Ebp-5' (SEQ. ID. nº 43) y Ebp-3' (SEQ. ID. nº 44). El fragmento de ADN obtenido se trató con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* y, a continuación, se integró mediante una reacción de ligasa en los vectores pFlat3 y pFlat1 (figura 4), que también se trataron antes con las enzimas *NotI* y *XhoI*. Los vectores resultantes pFlat1-*EBP* y pFlat3-*EBP* (figura 5a) contenían el gen *EBP* bajo el control del promotor *ADH* y el terminador de triptófano.

25 El vector de expresión pFlat3-*EBP* se transformó a continuación en las cepas de levadura I a VI de la tabla 1 del ejemplo 1, así como en la cepa GRFura3. Las cepas de levadura así obtenidas se cultivaron a continuación durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 µl de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

30 Los esteroides se extrajeron después de 3 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se analizaron mediante cromatografía de gases. La influencia de la expresión de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa de *Mus musculus* en combinación con la expresión de los genes propios de la levadura transcripcionalmente desregulados *tHMG* y/o *ERG1* y/o *ERG11* y/o la delección de los genes propios de la levadura *ERG6* y *ERG5* se incluye en la tabla 3. Las abreviaturas significan lo siguiente: - = reducción; 0 = ninguna modificación; / = no existente; +, ++, +++, +++++ = enriquecido a fuertemente enriquecido.

Tabla 3

Nº	Nombre de la cepa	Influencia de las modificaciones genéticas en el contenido en esterol frente a la cepa de levadura GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VII	GRFtH1 pFlat3-Ebp	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
VIII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
IX	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
X	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp	0	0	0	-	0	0	+	/	/	/	0
XI	GRFtH1E1E11 $erg5$ $erg6$ pFlat3-Ebp	0	0	0	--	/	/	+	/	++	/	/
XII	GRFtH1 $erg5erg6$ pFlat3-Ebp	0	0	0	-	/	/	+	/	+	/	/

- 1 = escualeno
- 2 = lanosterol
- 3 = dimetil-zimosterol
- 4 = zimosterol
- 5 = fecosterol
- 6 = episterol
- 7 = colest-7,24-dienol
- 8 = colest-8-enol
- 9 = colest-5,7,24 trienol
- 10 = 7-dehidrocolesterol
- 11 = ergosterol

Ejemplo 3

Expresión del gen heterólogo que codifica una $\Delta 5$ -desaturasa (Sc5d) del ratón (*Mus musculus*) en la levadura.

La secuencia de ADNc de la $\Delta 5$ -desaturasa de *Mus musculus* (Nishi S., Hideaki, N., Ishibashi, T. (2000): cDNA cloning of the mammalian sterol C5-desaturase and the expression in yeast mutant. Biochim. Biophys. A 1490, 106-108.) se amplificó mediante RCP a partir del clon de ADNc IMAGp998K144618 (huésped: *E. coli* DH10B) del "Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH" (Berlín). Los cebadores utilizados aquí son los oligómetros de ADN Sc5d-5' (SEQ. ID. nº 45) y Sc5d-3' (SEQ. ID. nº 46). El fragmento de ADN obtenido se trató con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* y, a continuación, se integró mediante una reacción de ligasa en el vector pFlat3 (figura 4), que también se trató antes con las enzimas *NotI* y *XhoI*. El vector resultante pFlat3-SC5D (figura 5b) contenía el gen SC5D bajo el control del promotor ADH y el terminador de triptófano.

El vector de expresión pFlat3-SC5D se transformó a continuación en las cepas de levadura I a VI de la tabla 1 del ejemplo 1, así como en la cepa GRFura3. Las cepas de levadura así obtenidas se cultivaron a continuación durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 µl de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

Los esteroides se extrajeron después de 3 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se analizaron mediante cromatografía de gases. La influencia de la expresión de una $\Delta 5$ -desaturasa de *Mus musculus* en combinación con la expresión de los genes propios de la levadura transcripcionalmente desregulados *tHMG* y/o *ERG1* y/o *ERG11* y/o la delección de los genes propios de la levadura *ERG6* y *ERG5* se incluye en la tabla 4. Las abreviaturas significan lo siguiente: - = reducción; 0 = ninguna modificación; / = no existente; +, ++, +++, ++++ = enriquecido a fuertemente enriquecido.

Tabla 4

Nº	Nombre de la cepa	Influencia de las modificaciones genéticas en el contenido en esteroles frente a la cepa de levadura GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XIII	GRFtH1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
XIV	GRFtH1E1 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XV	GRFtH1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XVI	GRFtH1E1E11 pFlat3-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XVII	GRFtH1E1E11 <i>erg5</i> <i>erg6</i> pFlat3-Sc5d	0	-	0	---	/	/	/	/	+++	+	/
XVIII	GRFtH1 <i>erg5erg6</i> pFlat3-Sc5d	0	0	0	--	/	/	/	/	++	/	/

- 1 = escualeno
- 2 = lanosterol
- 3 = dimetil-zimosterol
- 4 = zimosterol
- 5 = fecosterol
- 6 = episterol
- 7 = colest-7,24-dienol
- 8 = colest-8-enol
- 9 = colest-5,7,24 trienol
- 10 = 7-dehidrocolesterol
- 11 = ergosterol

Ejemplo 4

Expresión del gen heterólogo que codifica una $\Delta 24$ -reductasa (D24R) del ratón (*Mus musculus*) en la levadura.

La secuencia de ADNc de la $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus* (Waterham, H.R., Koster, J., Romeijn, G.J., Hennekam, R.C., Vreken, P., Andersson, H.C., FitzPatrick, D.R., Kelly, R.I. and Wanders, R.J., Mutations in the 3 β -Hydroxysterol $\Delta 24$ -Reductase Gene Cause Desmosterolosis, an Autosomal Recessive Disorder of Cholesterol Biosynthesis, Am. J. Hum. Genet. 69 (4), 685-694 (2001)) se amplificó mediante RCP a partir del clon de ADNc IMAGp998K179532 (huésped: *E. coli* DH10B) del "Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH" (Berlín).

Los cebadores utilizados aquí son los oligómetros de ADN D24R-5' (SEQ. ID. nº 47) y D24R-3' (SEQ. ID. nº 48). El fragmento de ADN obtenido se trató con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* y, a continuación, se integró mediante una reacción de ligasa en el vector pFlat4 (figura 6), que también se trató antes con las enzimas *NotI* y *XhoI*. El vector resultante pFlat4-D24R (figura 5d) contenía el gen *D24R* bajo el control del promotor *ADH1* y el terminador de triptófano.

El vector de expresión pFlat4-*D24R* se transformó a continuación en las cepas de levadura I a VI de la tabla 1 del ejemplo 1, así como en la cepa GRFura3. Las cepas de levadura así obtenidas se cultivaron a continuación durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 µl de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

Los esteroides se extrajeron después de 3 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se analizaron mediante cromatografía de gases. La influencia de la expresión de una $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus* en combinación con la expresión de los genes propios de la levadura transcripcionalmente desregulados *tHMG* y/o *ERG1* y/o *ERG11* y/o la delección de los genes propios de la levadura *ERG6* y *ERG5* se incluye en la tabla 5. Las abreviaturas significan lo siguiente: - = reducción; 0 = ninguna modificación; / = no existente; +, ++, +++, ++++ = enriquecido a fuertemente enriquecido.

Tabla 5

Nº	Nombre de la cepa	Influencia de las modificaciones genéticas en el contenido en esterol frente a la cepa de levadura GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XIX	GRFtH1 pFlat4-D24R	0	0	0	0	0	0	/	/	/	/	0
XX	GRFtH1E1 pFlat4-D24R	0	-	-	-	0	0	/	/	/	+	0
XXI	GRFtH1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXII	GRFtH1E1E11 pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	+	/	+	0
XXIII	GRFtH1E1E11 <i>erg5</i> <i>erg6</i> pFlat4-D24R	0	-	-	---	/	/	0	+	+	+++	/
XXIV	GRFtH1 <i>erg5erg6</i> pFlat4-D24R	0	-	-	--	/	/	0	+	+	++	/

- 1 = escualeno
- 2 = lanosterol
- 3 = dimetil-zimosterol
- 4 = zimosterol
- 5 = fecosterol
- 6 = episterol
- 7 = colest-7,24-dienol
- 8 = colest-8-enol
- 9 = colest-5,7,24 trienol

10 = 7-dehidrocolesterol

11 = ergosterol

Ejemplo 5

5 Expresión conjunta de los genes heterólogos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa (Ebp) del ratón (*Mus musculus*) y una C5-desaturasa (Sc5d) del ratón (*Mus musculus*) en la levadura.

10 Los vectores de expresión pFlat1-EBP (del ejemplo 2) y pFlat3-SC5D (del ejemplo 3) se transformaron a continuación en las cepas de levadura I a VI de la tabla 1 del ejemplo 1, así como en la cepa GRFura3. Las cepas de levadura así obtenidas se cultivaron a continuación durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 μ l de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

15 Los esteroides se extrajeron después de 3 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se analizaron mediante cromatografía de gases. La influencia de la expresión de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa y una C5-desaturasa de *Mus musculus* en combinación con la expresión de los genes propios de la levadura transcripcionalmente desregulados *tHMG* y/o *ERG1* y/o *ERG11* y/o la delección de los genes propios de la levadura *ERG6* y *ERG5* se incluye en la tabla 6. Las abreviaturas significan lo siguiente: - = reducción; 0 = ninguna modificación; / = no existente; +, ++, +++, ++++ = enriquecido a fuertemente enriquecido.

Tabla 6

Nº	Nombre de la cepa	Influencia de las modificaciones genéticas en el contenido en esteroles frente a la cepa de levadura GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XXV	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	0	0	/	/	+	/	0
XXVI	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVII	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	--	0	0	/	/	+	/	0
XXVIII	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	-	--	0	0	/	/	++	/	0
XXIX	GRFtH1E1E11 $erg5$ $erg6$ pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	-	0	--	/	/	/	/	+++	+	/
XXX	GRFtH1 $erg5erg6$ pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d	0	0	0	-	/	/	/	/	++	+	/

1 = escualeno

20 2 = lanosterol

3 = dimetil-zimosterol

- 4 = zimosterol
 5 = fecosterol
 6 = episterol
 7 = colest-7,24-dienol
 8 = colest-8-enol
 9 = colest-5,7,24 trienol
 10 = 7-dehidrocolesterol
 11 = ergosterol

Ejemplo 6

- 10 Expresión conjunta de los genes heterólogos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa (Ebp) del ratón (*Mus musculus*), que codifica una C5-desaturasa (Sc5d) del ratón (*Mus musculus*) y una $\Delta 24$ -reductasa del ratón (*Mus musculus*) en la levadura.

- 15 Los vectores de expresión pFlat1-EBP (del ejemplo 2) y pFlat3-SC5D (del ejemplo 3) y pFlat4-D24R (del ejemplo 4) se transformaron en las cepas de levadura I a VI de la tabla 1 del ejemplo 1, así como en la cepa GRFura3. Las cepas de levadura así obtenidas se cultivaron a continuación durante 48 horas en medio WMVIII a 28 °C y 160 rpm en un volumen de cultivo de 20 ml. A continuación, 500 μ l de este precultivo se transfirieron a un cultivo principal de 50 ml del mismo medio y se cultivaron durante 3 días a 28 °C y 160 rpm en un matraz Erlenmeyer.

- 20 Los esteroides se extrajeron después de 3 días tal como se describe en el ejemplo 1 y se analizaron mediante cromatografía de gases. La influencia de la expresión de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa y una C5-desaturasa y una $\Delta 24$ -reductasa de *Mus musculus* en combinación con la expresión de los genes propios de la levadura transcripcionalmente desregulados *tHMG* y/o *ERG1* y/o *ERG11* y/o la delección de los genes propios de la levadura *ERG6* y *ERG5* se incluye en la tabla 7. Las abreviaturas significan lo siguiente: - = reducción; 0 = ninguna modificación; / = no existente; +, ++, +++, ++++ = enriquecido a fuertemente enriquecido.

Tabla 7

Nº	Nombre de la cepa	Influencia de las modificaciones genéticas en el contenido en esteroles frente a la cepa de levadura GRF										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
XXXI	GRFtH1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	0	0	/	/	/	+	0
XXXII	GRFtH1E1 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	--	0	0	/	/	/	+	0
XXXIII	GRFtH1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	--	0	0	/	/	/	+	0
XXXIV	GRFtH1E1E11 pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	-	--	0	0	/	/	/	++	0

XXXV	GRFtH1E1E11 <i>erg5</i> <i>erg6</i> pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	-	0	---	/	/	/	/	+	++++	/
XXXVI	GRFtH1 <i>erg5erg6</i> pFlat3-Ebp/ pFlat1-Sc5d/ pFlat4-D24R	0	0	0	-	/	/	/	/	++	+++	/

- 1 = escualeno
 2 = lanosterol
 3 = dimetil-zimosterol
 5 4 = zimosterol
 5 = fecosterol
 6 = episterol
 7 = colest-7,24-dienol
 8 = colest-8-enol
 10 9 = colest-5,7,24 trienol
 10 = 7-dehidrocolesterol
 11 = ergosterol

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol
y/o sus productos intermedios y/o secuenciales biosintéticos
en organismos transgénicos

<130> 0050

10 <140>
<141>

<160> 60

15 <170> Versión de la patente 2.0

<210> 1
<211> 693
20 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
25 <222> (1) .. (693)

<400> 1

atg acc acc aat acg gtc ccc ttg cac ccg tac tgg ccc agg cac ctg	48
Met Thr Thr Asn Thr Val Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Arg His Leu	
1 5 10 15	
aag ctg gac aac ttc gtg cct aat gac ctc ccg act tcg cat atc ctg	96
Lys Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Leu Pro Thr Ser His Ile Leu	
20 25 30	
gtt ggc ctc ttc tcc atc tct ggg ggc cta att gtg atc acg tgg ctg	144
Val Gly Leu Phe Ser Ile Ser Gly Gly Leu Ile Val Ile Thr Trp Leu	
35 40 45	
ttg tct agc cga gct tcc gtc gtc cca ctt gga gct ggg cgg cga ctg	192
Leu Ser Ser Arg Ala Ser Val Val Pro Leu Gly Ala Gly Arg Arg Leu	
50 55 60	
gcc ttg tgc tgg ttt gct gtg tgt acc ttc att cac ctt gtg atc gag	240
Ala Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Thr Phe Ile His Leu Val Ile Glu	
65 70 75 80	
ggc tgg ttc tct ctc tac aat ggc atc ctt tta gaa gac caa gcc ttc	288
Gly Trp Phe Ser Leu Tyr Asn Gly Ile Leu Leu Glu Asp Gln Ala Phe	
85 90 95	
tta tcc caa ctc tgg aaa gag tat tcc aag gga gat agc cga tat atc	336
Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ser Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile	
100 105 110	
ctt agt gac agc ttc gtc gtc tgt atg gag act gtc aca gct tgt ctc	384
Leu Ser Asp Ser Phe Val Val Cys Met Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu	
115 120 125	

ES 2 396 057 T3

tgg gga cca ctc agc cta tgg gta gtg att gcc ttt ctc cgc caa cag 432
 Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln Gln
 130 135 140

5

ccc ttc cgc ttt gtc cta cag ctt gtg gtg tct atg ggc cag ata tac 480
 Pro Phe Arg Phe Val Leu Gln Leu Val Val Ser Met Gly Gln Ile Tyr
 145 150 155 160

10

ggg gat gtg ctg tac ttc ctg aca gag cta cac gaa gga ctc cag cat 528
 Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu Leu His Glu Gly Leu Gln His
 165 170 175

15

ggg gag ata ggc cac ccc gtt tat ttc tgg ttc tat ttt gtt ttc ctg 576
 Gly Glu Ile Gly His Pro Val Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Leu
 180 185 190

20

aat gct gta tgg ttg gtg ata cca agc atc ctt gtg ctt gat gcc ata 624
 Asn Ala Val Trp Leu Val Ile Pro Ser Ile Leu Val Leu Asp Ala Ile
 195 200 205

25

aag cat ctc act agt gcc cag agc gtg ctg gac agc aaa gtc atg aaa 672
 Lys His Leu Thr Ser Ala Gln Ser Val Leu Asp Ser Lys Val Met Lys
 210 215 220

att aag agc aag cat aac taa 693
 Ile Lys Ser Lys His Asn
 225 230

30

<210> 2
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35

<400> 2
 Met Thr Thr Asn Thr Val Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Arg His Leu
 1 5 10 15

40

Lys Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Leu Pro Thr Ser His Ile Leu
 20 25 30

Val Gly Leu Phe Ser Ile Ser Gly Gly Leu Ile Val Ile Thr Trp Leu
 35 40 45

45

Leu Ser Ser Arg Ala Ser Val Val Pro Leu Gly Ala Gly Arg Arg Leu
 50 55 60

50

Ala Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Thr Phe Ile His Leu Val Ile Glu
 65 70 75 80

Gly Trp Phe Ser Leu Tyr Asn Gly Ile Leu Leu Glu Asp Gln Ala Phe
 85 90 95

55

Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ser Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile
 100 105 110

Leu Ser Asp Ser Phe Val Val Cys Met Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu

ES 2 396 057 T3

	115		120		125	
	Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln Gln					
	130		135		140	
5	Pro Phe Arg Phe Val Leu Gln Leu Val Val Ser Met Gly Gln Ile Tyr					
	145		150		155	160
	Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu Leu His Glu Gly Leu Gln His					
10		165		170		175
	Gly Glu Ile Gly His Pro Val Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Leu					
		180		185		190
15	Asn Ala Val Trp Leu Val Ile Pro Ser Ile Leu Val Leu Asp Ala Ile					
		195		200		205
	Lys His Leu Thr Ser Ala Gln Ser Val Leu Asp Ser Lys Val Met Lys					
	210		215		220	
20	Ile Lys Ser Lys His Asn					
	225		230			
25	<210> 3					
	<211> 693					
	<212> ADN					
	<213> Homo sapiens					
30	<220>					
	<221> CDS					
	<222> (1)..(693)					
	<400> 3					
35	atg act acc aac gcg ggc ccc ttg cac cca tac tgg cct cag cac cta 48					
	Met Thr Thr Asn Ala Gly Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Gln His Leu					
	1 5 10 15					
	aga ctg gac aac ttt gta cct aat gac cgc ccc acc tgg cat ata ctg 96					
40	Arg Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Arg Pro Thr Trp His Ile Leu					
	20 25 30					
	gct ggc ctc ttc tct gtc aca ggg gtc tta gtc gtg acc aca tgg ctg 144					
45	Ala Gly Leu Phe Ser Val Thr Gly Val Leu Val Val Thr Thr Trp Leu					
	35 40 45					
	ttg tca ggt cgt gct gcg gtt gtc cca ttg ggg act tgg cgg cga ctg 192					
	Leu Ser Gly Arg Ala Ala Val Val Pro Leu Gly Thr Trp Arg Arg Leu					
50	50 55 60					
	tcc ctg tgc tgg ttt gca gtg tgt ggg ttc att cac ctg gtg atc gag 240					
	Ser Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Gly Phe Ile His Leu Val Ile Glu					
	65 70 75 80					
55	ggc tgg ttc gtt ctc tac tac gaa gac ctg ctt gga gac caa gcc ttc 288					
	Gly Trp Phe Val Leu Tyr Tyr Glu Asp Leu Leu Gly Asp Gln Ala Phe					
	85 90 95					

ES 2 396 057 T3

	tta tct caa ctc tgg aaa gag tat gcc aag gga gac agc cga tac atc	336
	Leu Ser Gln Leu Trp Lys Glu Tyr Ala Lys Gly Asp Ser Arg Tyr Ile	
	100 105 110	
5	ctg ggt gac aac ttc aca gtg tgc atg gaa acc atc aca gct tgc ctg	384
	Leu Gly Asp Asn Phe Thr Val Cys Met Glu Thr Ile Thr Ala Cys Leu	
	115 120 125	
10	tgg gga cca ctc agc ctg tgg gtg gtg atc gcc ttt ctc cgc cag cat	432
	Trp Gly Pro Leu Ser Leu Trp Val Val Ile Ala Phe Leu Arg Gln His	
	130 135 140	
15	ccc ctc cgc ttc att cta cag ctt gtg gtc tct gtg ggc cag atc tat	480
	Pro Leu Arg Phe Ile Leu Gln Leu Val Val Ser Val Gly Gln Ile Tyr	
	145 150 155 160	
20	ggg gat gtg ctc tac ttc ctg aca gag cac cgc gac gga ttc cag cac	528
	Gly Asp Val Leu Tyr Phe Leu Thr Glu His Arg Asp Gly Phe Gln His	
	165 170 175	
25	gga gag ctg ggc cac cct ctc tac ttc tgg ttt tac ttt gtc ttc atg	576
	Gly Glu Leu Gly His Pro Leu Tyr Phe Trp Phe Tyr Phe Val Phe Met	
	180 185 190	
30	aat gcc ctg tgg ctg gtg ctg cct gga gtc ctt gtg ctt gat gct gtg	624
	Asn Ala Leu Trp Leu Val Leu Pro Gly Val Leu Val Leu Asp Ala Val	
	195 200 205	
35	aag cac ctc act cat gcc cag agc acg ctg gat gcc aag gcc aca aaa	672
	Lys His Leu Thr His Ala Gln Ser Thr Leu Asp Ala Lys Ala Thr Lys	
	210 215 220	
40	gcc aag agc aag aag aac tga	693
	Ala Lys Ser Lys Lys Asn	
	225 230	
45	<210> 4	
	<211> 230	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 4	
	Met Thr Thr Asn Ala Gly Pro Leu His Pro Tyr Trp Pro Gln His Leu	
	1 5 10 15	
55	Arg Leu Asp Asn Phe Val Pro Asn Asp Arg Pro Thr Trp His Ile Leu	
	20 25 30	
60	Ala Gly Leu Phe Ser Val Thr Gly Val Leu Val Val Thr Thr Trp Leu	
	35 40 45	
65	Leu Ser Gly Arg Ala Ala Val Val Pro Leu Gly Thr Trp Arg Arg Leu	
	50 55 60	
70	Ser Leu Cys Trp Phe Ala Val Cys Gly Phe Ile His Leu Val Ile Glu	
	65 70 75 80	

ES 2 396 057 T3

	Gly	Trp	Phe	Val	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Phe	
					85					90					95		
5	Leu	Ser	Gln	Leu	Trp	Lys	Glu	Tyr	Ala	Lys	Gly	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	
				100					105					110			
	Leu	Gly	Asp	Asn	Phe	Thr	Val	Cys	Met	Glu	Thr	Ile	Thr	Ala	Cys	Leu	
			115					120					125				
10	Trp	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Trp	Val	Val	Ile	Ala	Phe	Leu	Arg	Gln	His	
		130					135					140					
	Pro	Leu	Arg	Phe	Ile	Leu	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Val	Gly	Gln	Ile	Tyr	
	145					150					155					160	
15	Gly	Asp	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Thr	Glu	His	Arg	Asp	Gly	Phe	Gln	His	
					165					170					175		
	Gly	Glu	Leu	Gly	His	Pro	Leu	Tyr	Phe	Trp	Phe	Tyr	Phe	Val	Phe	Met	
20				180					185					190			
	Asn	Ala	Leu	Trp	Leu	Val	Leu	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Val	
			195					200					205				
25	Lys	His	Leu	Thr	His	Ala	Gln	Ser	Thr	Leu	Asp	Ala	Lys	Ala	Thr	Lys	
		210					215					220					
	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Asn											
30	225					230											
	<210>	5															
	<211>	669															
	<212>	ADN															
35	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(669)															
40	<400>	5															
	atg	aag	ttt	ttc	cca	ctc	ctt	ttg	ttg	att	ggg	gtt	gta	ggc	tac	att	48
	Met	Lys	Phe	Phe	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Gly	Tyr	Ile	
	1				5					10					15		
45	atg	aac	gta	ttg	ttc	act	acc	tgg	ttg	cca	acc	aat	tac	atg	ttc	gat	96
	Met	Asn	Val	Leu	Phe	Thr	Thr	Trp	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Met	Phe	Asp	
				20					25				30				
50	cca	aaa	act	ttg	aac	gaa	ata	tgt	aac	tcg	gtg	att	agc	aaa	cac	aac	144
	Pro	Lys	Thr	Leu	Asn	Glu	Ile	Cys	Asn	Ser	Val	Ile	Ser	Lys	His	Asn	
				35				40					45				
	gca	gca	gaa	ggg	tta	tcc	act	gaa	gac	ctg	tta	cag	gat	gtc	aga	gac	192
55	Ala	Ala	Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	Arg	Asp	
		50					55					60					
	gca	ctt	gcc	tct	cat	tac	ggg	gac	gaa	tac	atc	aac	agg	tac	gtc	aaa	240

ES 2 396 057 T3

	Ala	Leu	Ala	Ser	His	Tyr	Gly	Asp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Arg	Tyr	Val	Lys	
	65					70					75					80	
5	gaa	gaa	tgg	gtc	ttc	aac	aat	gct	ggt	ggt	gcg	atg	ggc	caa	atg	atc	288
	Glu	Glu	Trp	Val	Phe	Asn	Asn	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Gly	Gln	Met	Ile	
					85					90					95		
10	atc	cta	cac	gct	tcc	gta	tcc	gag	tac	tta	att	cta	ttc	gga	acc	gct	336
	Ile	Leu	His	Ala	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Leu	Ile	Leu	Phe	Gly	Thr	Ala	
				100					105					110			
15	gtt	ggt	act	gaa	ggg	cac	aca	ggt	gtt	cac	ttt	gct	gac	gac	tat	ttt	384
	Val	Gly	Thr	Glu	Gly	His	Thr	Gly	Val	His	Phe	Ala	Asp	Asp	Tyr	Phe	
			115					120					125				
20	acc	atc	tta	cat	ggt	acg	caa	atc	gca	gca	ttg	cca	tat	gcc	act	gaa	432
	Thr	Ile	Leu	His	Gly	Thr	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Pro	Tyr	Ala	Thr	Glu	
		130					135					140					
25	gcc	gaa	gtt	tac	act	cct	ggt	atg	act	cat	cac	ttg	aag	aag	gga	tac	480
	Ala	Glu	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Met	Thr	His	His	Leu	Lys	Lys	Gly	Tyr	
	145					150					155					160	
30	gcc	aag	caa	tac	agc	atg	cca	ggt	ggt	tcc	ttt	gcc	ctt	gaa	ttg	gct	528
	Ala	Lys	Gln	Tyr	Ser	Met	Pro	Gly	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	
				165					170						175		
35	caa	ggc	tgg	att	cca	tgt	atg	ttg	cca	ttc	ggg	ttt	ttg	gac	act	ttc	576
	Gln	Gly	Trp	Ile	Pro	Cys	Met	Leu	Pro	Phe	Gly	Phe	Leu	Asp	Thr	Phe	
			180						185					190			
40	tcc	agt	act	ctt	gat	tta	tac	act	cta	tat	aga	act	gtc	tac	ctg	act	624
	Ser	Ser	Thr	Leu	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Arg	Thr	Val	Tyr	Leu	Thr	
			195					200					205				
45	gcc	agg	gac	atg	ggt	aag	aac	ttg	ttg	caa	aac	aaa	aag	ttc	taa		669
	Ala	Arg	Asp	Met	Gly	Lys	Asn	Leu	Leu	Gln	Asn	Lys	Lys	Phe			
		210					215					220					
50	<210>	6															
	<211>	222															
	<212>	PRT															
	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
55	<400>	6															
	Met	Lys	Phe	Phe	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Gly	Tyr	Ile	
	1				5					10					15		
60	Met	Asn	Val	Leu	Phe	Thr	Thr	Trp	Leu	Pro	Thr	Asn	Tyr	Met	Phe	Asp	
			20						25					30			
65	Pro	Lys	Thr	Leu	Asn	Glu	Ile	Cys	Asn	Ser	Val	Ile	Ser	Lys	His	Asn	
			35					40					45				
70	Ala	Ala	Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	Arg	Asp	
		50					55					60					

ES 2 396 057 T3

	Ala	Leu	Ala	Ser	His	Tyr	Gly	Asp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Arg	Tyr	Val	Lys	
	65					70					75					80	
5	Glu	Glu	Trp	Val	Phe	Asn	Asn	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Gly	Gln	Met	Ile	
					85					90					95		
	Ile	Leu	His	Ala	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Leu	Ile	Leu	Phe	Gly	Thr	Ala	
				100					105					110			
10	Val	Gly	Thr	Glu	Gly	His	Thr	Gly	Val	His	Phe	Ala	Asp	Asp	Tyr	Phe	
			115					120					125				
	Thr	Ile	Leu	His	Gly	Thr	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Pro	Tyr	Ala	Thr	Glu	
		130					135					140					
15	Ala	Glu	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Met	Thr	His	His	Leu	Lys	Lys	Gly	Tyr	
	145					150					155					160	
	Ala	Lys	Gln	Tyr	Ser	Met	Pro	Gly	Gly	Ser	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Ala	
20					165					170						175	
	Gln	Gly	Trp	Ile	Pro	Cys	Met	Leu	Pro	Phe	Gly	Phe	Leu	Asp	Thr	Phe	
				180					185					190			
25	Ser	Ser	Thr	Leu	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Arg	Thr	Val	Tyr	Leu	Thr	
			195					200					205				
	Ala	Arg	Asp	Met	Gly	Lys	Asn	Leu	Leu	Gln	Asn	Lys	Lys	Phe			
	210						215					220					
30																	
	<210>	7															
	<211>	900															
	<212>	ADN															
35	<213>	Mus musculus															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(900)															
40																	
	<400>	7															
	atg	gac	ctg	gtt	ctc	agt	gcc	gcc	gat	tac	tac	ttc	ttc	act	ccg	tat	48
	Met	Asp	Leu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Thr	Pro	Tyr	
	1				5					10					15		
45																	
	gta	tat	cca	gcc	acg	tgg	ccc	gag	gac	aac	atc	atc	cga	caa	act	att	96
	Val	Tyr	Pro	Ala	Thr	Trp	Pro	Glu	Asp	Asn	Ile	Ile	Arg	Gln	Thr	Ile	
				20					25					30			
50																	
	agc	ctc	ctg	att	gtc	aca	aac	ctg	ggt	gct	tac	att	ctc	tac	ttc	ttc	144
	Ser	Leu	Leu	Ile	Val	Thr	Asn	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Phe	Phe	
				35				40					45				
55																	
	tgt	gca	acc	ctc	agc	tat	tat	ttt	gtc	tat	gat	cat	tcc	tta	atg	aaa	192
	Cys	Ala	Thr	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Val	Tyr	Asp	His	Ser	Leu	Met	Lys	
		50					55					60					
	cac	cca	cag	ttt	tta	aag	aac	caa	gtc	tcg	cgt	gag	atc	gtg	ttc	act	240

ES 2 396 057 T3

	His	Pro	Gln	Phe	Leu	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	
	65					70					75					80	
5	gtc	aag	tct	ttg	cct	tgg	atc	agc	atc	ccc	acc	gtc	tca	cta	ttc	ctg	288
	Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Trp	Ile	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Ser	Leu	Phe	Leu	
					85					90					95		
10	ctg	gag	ctg	agg	ggc	tac	agc	aaa	ctc	tac	gat	gac	atc	gga	gac	ttt	336
	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ser	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Ile	Gly	Asp	Phe	
				100					105					110			
15	cca	aat	ggc	tgg	att	cat	ctc	atg	gtt	agc	gtc	gta	tcc	ttc	ctc	ttt	384
	Pro	Asn	Gly	Trp	Ile	His	Leu	Met	Val	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Leu	Phe	
			115					120					125				
	ttc	aca	gac	atg	ttg	atc	tac	agg	att	cat	agg	ggc	ctg	cac	cac	aga	432
	Phe	Thr	Asp	Met	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ile	His	Arg	Gly	Leu	His	His	Arg	
		130					135					140					
20	ctg	gtc	tac	aag	cgc	ata	cat	aaa	cca	cat	cat	att	tgg	aag	atc	ccc	480
	Leu	Val	Tyr	Lys	Arg	Ile	His	Lys	Pro	His	His	Ile	Trp	Lys	Ile	Pro	
	145					150					155					160	
25	acg	ccg	ttt	gca	agt	cat	gct	ttt	cac	cct	gtg	gac	ggc	ttc	ctt	cag	528
	Thr	Pro	Phe	Ala	Ser	His	Ala	Phe	His	Pro	Val	Asp	Gly	Phe	Leu	Gln	
				165						170					175		
30	agt	ctg	cct	tac	cat	ata	tac	ccc	ttt	gtc	ttt	cca	ctg	cac	aag	gtg	576
	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ile	Tyr	Pro	Phe	Val	Phe	Pro	Leu	His	Lys	Val	
			180						185					190			
35	gtc	tac	tta	ggc	tta	tat	gtc	ttg	gtt	aat	gtc	tgg	aca	att	tct	att	624
	Val	Tyr	Leu	Gly	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Asn	Val	Trp	Thr	Ile	Ser	Ile	
			195					200					205				
	cat	gat	ggc	gat	ttt	cgg	gtt	ccc	cag	atc	tta	agg	cca	ttt	att	aac	672
	His	Asp	Gly	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Arg	Pro	Phe	Ile	Asn	
		210					215					220					
40	ggg	tca	gct	cac	cac	aca	gac	cac	cac	atg	ttc	ttt	gac	tat	aac	tat	720
	Gly	Ser	Ala	His	His	Thr	Asp	His	His	Met	Phe	Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	
	225					230				235						240	
45	gga	cag	tat	ttc	aca	ttg	tgg	gat	aga	att	gga	ggc	tct	ttt	aaa	cat	768
	Gly	Gln	Tyr	Phe	Thr	Leu	Trp	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Lys	His	
				245						250					255		
50	cct	tcc	tct	ttt	gaa	ggg	aaa	gga	cca	cat	agt	tac	gtg	aag	aac	atg	816
	Pro	Ser	Ser	Phe	Glu	Gly	Lys	Gly	Pro	His	Ser	Tyr	Val	Lys	Asn	Met	
				260					265					270			
55	aca	gaa	aaa	gaa	tct	aac	agc	ttt	gca	gaa	aac	ggc	tgt	aaa	ggc	aaa	864
	Thr	Glu	Lys	Glu	Ser	Asn	Ser	Phe	Ala	Glu	Asn	Gly	Cys	Lys	Gly	Lys	
			275					280					285				
	aaa	gta	agc	aat	gga	gag	ttt	aca	aag	aat	aag	tag					900
	Lys	Val	Ser	Asn	Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Asn	Lys						
		290					295					300					

ES 2 396 057 T3

<210> 8
 <211> 299
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 8
 Met Asp Leu Val Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
 10 1 5 10 15
 Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asn Ile Ile Arg Gln Thr Ile
 20 25 30
 15 Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Leu Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe
 35 40 45
 Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Tyr Asp His Ser Leu Met Lys
 50 55 60
 20 His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Ser Arg Glu Ile Val Phe Thr
 65 70 75 80
 Val Lys Ser Leu Pro Trp Ile Ser Ile Pro Thr Val Ser Leu Phe Leu
 25 85 90 95
 Leu Glu Leu Arg Gly Tyr Ser Lys Leu Tyr Asp Asp Ile Gly Asp Phe
 100 105 110
 30 Pro Asn Gly Trp Ile His Leu Met Val Ser Val Val Ser Phe Leu Phe
 115 120 125
 Phe Thr Asp Met Leu Ile Tyr Arg Ile His Arg Gly Leu His His Arg
 130 135 140
 35 Leu Val Tyr Lys Arg Ile His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro
 145 150 155 160
 Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln
 40 165 170 175
 Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Val Phe Pro Leu His Lys Val
 180 185 190
 45 Val Tyr Leu Gly Leu Tyr Val Leu Val Asn Val Trp Thr Ile Ser Ile
 195 200 205
 His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Arg Pro Phe Ile Asn
 210 215 220
 50 Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr
 225 230 235 240
 Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys His
 245 250 255
 55 Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro His Ser Tyr Val Lys Asn Met
 260 265 270

ES 2 396 057 T3

```

    Thr Glu Lys Glu Ser Asn Ser Phe Ala Glu Asn Gly Cys Lys Gly Lys
      275                                280                                285

5   Lys Val Ser Asn Gly Glu Phe Thr Lys Asn Lys
    290                                295

<210> 9
10  <211> 900
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

<220>
15  <221> CDS
    <222> (1) .. (900)

<400> 9
20  atg gat ctt gta ctc cgt gtt gca gat tac tat ttt ttt aca cca tac 48
    Met Asp Leu Val Leu Arg Val Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
      1                                5                                10                                15

    gtg tat cca gcc aca tgg cca gaa gat gac atc ttc cga caa gct att 96
    Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile
      20                                25                                30

    agt ctt ctg att gta aca aat gtt ggt gct tac atc ctt tat ttc ttc 144
    Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Val Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe
      35                                40                                45

30  tgt gca aca ctg agc tat tat ttt gtc ttc gat cat gca tta atg aaa 192
    Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Phe Asp His Ala Leu Met Lys
      50                                55                                60

35  cat cca caa ttt tta aag aat caa gtc cgt cga gag att aag ttt act 240
    His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Arg Arg Glu Ile Lys Phe Thr
      65                                70                                75                                80

    gtc cag gca ttg cca tgg ata agt att ctt act gtt gca ctg ttc ttg 288
    Val Gln Ala Leu Pro Trp Ile Ser Ile Leu Thr Val Ala Leu Phe Leu
      85                                90                                95

    ctg gag ata aga ggt tac agc aaa tta cat gat gac cta gga gag ttt 336
    Leu Glu Ile Arg Gly Tyr Ser Lys Leu His Asp Asp Leu Gly Glu Phe
      100                                105                                110

45  cca tat gga ttg ttt gaa ctt gtc gtt agt ata ata tct ttc ctc ttt 384
    Pro Tyr Gly Leu Phe Glu Leu Val Val Ser Ile Ile Ser Phe Leu Phe
      115                                120                                125

50  ttc act gac atg ttc atc tac tgg att cac aga ggc ctt cat cat aga 432
    Phe Thr Asp Met Phe Ile Tyr Trp Ile His Arg Gly Leu His His Arg
      130                                135                                140

55  ctg gta tat aag cgc cta cat aaa cct cac cat att tgg aag att cct 480
    Leu Val Tyr Lys Arg Leu His Lys Pro His His Ile Trp Lys Ile Pro
      145                                150                                155                                160

```

ES 2 396 057 T3

```

act cca ttt gca agt cat gct ttt cac cct att gat ggc ttt ctt cag 528
Thr Pro Phe Ala Ser His Ala Phe His Pro Ile Asp Gly Phe Leu Gln
165 170 175

5 agt cta cct tac cat ata tac cct ttt atc ttt cca tta cac aag gtg 576
Ser Leu Pro Tyr His Ile Tyr Pro Phe Ile Phe Pro Leu His Lys Val
180 185 190

10 gtt tat tta agt ctg tac atc ttg gtt aat atc tgg aca att tcc att 624
Val Tyr Leu Ser Leu Tyr Ile Leu Val Asn Ile Trp Thr Ile Ser Ile
195 200 205

15 cat gac ggt gat ttt cgt gtc ccc caa atc tta cag cca ttt att aat 672
His Asp Gly Asp Phe Arg Val Pro Gln Ile Leu Gln Pro Phe Ile Asn
210 215 220

20 ggc tca gct cat cat aca gac cac cat atg ttc ttt gac tat aat tat 720
Gly Ser Ala His His Thr Asp His His Met Phe Phe Asp Tyr Asn Tyr
225 230 235

gga caa tat ttc act ttg tgg gat agg att ggc ggc tca ttc aaa aat 768
Gly Gln Tyr Phe Thr Leu Trp Asp Arg Ile Gly Gly Ser Phe Lys Asn
245 250 255

25 cct tca tcc ttt gag ggg aag gga ccg ctc agt tat gtg aag gag atg 816
Pro Ser Ser Phe Glu Gly Lys Gly Pro Leu Ser Tyr Val Lys Glu Met
260 265 270

30 aca gag gga aag cgc agc agc cct tca gga aat ggc tgt aag aat gaa 864
Thr Glu Gly Lys Arg Ser Ser Pro Ser Gly Asn Gly Cys Lys Asn Glu
275 280 285

aaa tta ttc aat gga gag ttt aca aag act gaa tag 900
Lys Leu Phe Asn Gly Glu Phe Thr Lys Thr Glu
290 295 300

40 <210> 10
<211> 299
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 10
Met Asp Leu Val Leu Arg Val Ala Asp Tyr Tyr Phe Phe Thr Pro Tyr
1 5 10 15

Val Tyr Pro Ala Thr Trp Pro Glu Asp Asp Ile Phe Arg Gln Ala Ile
20 25 30

50 Ser Leu Leu Ile Val Thr Asn Val Gly Ala Tyr Ile Leu Tyr Phe Phe
35 40 45

Cys Ala Thr Leu Ser Tyr Tyr Phe Val Phe Asp His Ala Leu Met Lys
50 55 60

55 His Pro Gln Phe Leu Lys Asn Gln Val Arg Arg Glu Ile Lys Phe Thr
65 70 75 80

```

ES 2 396 057 T3

	Val	Gln	Ala	Leu	Pro	Trp	Ile	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Phe	Leu	
					85					90					95		
5	Leu	Glu	Ile	Arg	Gly	Tyr	Ser	Lys	Leu	His	Asp	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	
				100					105					110			
	Pro	Tyr	Gly	Leu	Phe	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Phe	
			115					120					125				
10	Phe	Thr	Asp	Met	Phe	Ile	Tyr	Trp	Ile	His	Arg	Gly	Leu	His	His	Arg	
		130					135					140					
	Leu	Val	Tyr	Lys	Arg	Leu	His	Lys	Pro	His	His	Ile	Trp	Lys	Ile	Pro	
	145					150				155						160	
15	Thr	Pro	Phe	Ala	Ser	His	Ala	Phe	His	Pro	Ile	Asp	Gly	Phe	Leu	Gln	
				165					170						175		
	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ile	Tyr	Pro	Phe	Ile	Phe	Pro	Leu	His	Lys	Val	
20				180					185					190			
	Val	Tyr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ile	Leu	Val	Asn	Ile	Trp	Thr	Ile	Ser	Ile	
			195					200					205				
25	His	Asp	Gly	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Gln	Pro	Phe	Ile	Asn	
		210					215					220					
	Gly	Ser	Ala	His	His	Thr	Asp	His	His	Met	Phe	Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	
	225					230				235						240	
30	Gly	Gln	Tyr	Phe	Thr	Leu	Trp	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Lys	Asn	
					245				250						255		
	Pro	Ser	Ser	Phe	Glu	Gly	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val	Lys	Glu	Met	
35				260				265						270			
	Thr	Glu	Gly	Lys	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Gly	Asn	Gly	Cys	Lys	Asn	Glu	
			275					280					285				
40	Lys	Leu	Phe	Asn	Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Thr	Glu						
		290					295										
45	<210>	11															
	<211>	1098															
	<212>	ADN															
	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
50	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1) .. (1098)															
	<400>	11															
55	atg	gat	ttg	gtc	tta	gaa	gtc	gct	gac	cat	tat	gtc	tta	gac	gac	ttg	48
	Met	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Ala	Asp	His	Tyr	Val	Leu	Asp	Asp	Leu	
	1				5				10					15			
	tac	gct	aaa	gtt	ctg	ccc	gct	tcg	ttg	gca	gct	aat	att	cct	gtc	aag	96

ES 2 396 057 T3

	Tyr	Ala	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Lys	
				20					25					30			
5	tgg	cag	aaa	ttg	cta	ggg	ttg	aac	agt	ggg	ttc	agc	aat	tct	acg	att	144
	Trp	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Asn	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile	
			35					40					45				
10	ttg	cag	gag	act	ttg	aac	tcc	aag	aat	gcc	gtc	aaa	gaa	tgt	aga	agg	192
	Leu	Gln	Glu	Thr	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Ala	Val	Lys	Glu	Cys	Arg	Arg	
			50				55					60					
15	ttc	tac	ggg	cag	gtg	cca	ttc	ctg	ttt	gat	atg	tcg	acg	acg	tct	ttt	240
	Phe	Tyr	Gly	Gln	Val	Pro	Phe	Leu	Phe	Asp	Met	Ser	Thr	Thr	Ser	Phe	
	65					70				75						80	
20	gca	tcg	cta	ttg	cct	cgt	tcc	agc	atc	ttg	aga	gaa	ttc	ctc	tca	cta	288
	Ala	Ser	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Ser	Leu	
					85					90					95		
25	tgg	gtt	att	gtt	acg	atc	ttt	ggg	tta	cta	ctt	tac	tta	ttc	acg	gct	336
	Trp	Val	Ile	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Leu	Phe	Thr	Ala	
				100				105						110			
30	agt	ctc	agc	tac	gtg	ttt	gtg	ttt	gac	aag	tcg	att	ttc	aac	cat	cct	384
	Ser	Leu	Ser	Tyr	Val	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ser	Ile	Phe	Asn	His	Pro	
			115				120						125				
35	cgt	tac	ttg	aaa	aac	caa	atg	gca	atg	gaa	atc	aag	ttg	gca	gtc	agt	432
	Arg	Tyr	Leu	Lys	Asn	Gln	Met	Ala	Met	Glu	Ile	Lys	Leu	Ala	Val	Ser	
		130				135						140					
40	gct	atc	cca	tgg	atg	tcg	atg	ttg	acc	ggt	cca	tgg	ttt	ggt	atg	gaa	480
	Ala	Ile	Pro	Trp	Met	Ser	Met	Leu	Thr	Val	Pro	Trp	Phe	Val	Met	Glu	
	145					150					155					160	
45	ttg	aac	ggc	cat	tct	aaa	cta	tac	atg	aag	att	gat	tat	gaa	aac	cac	528
	Leu	Asn	Gly	His	Ser	Lys	Leu	Tyr	Met	Lys	Ile	Asp	Tyr	Glu	Asn	His	
				165						170					175		
50	ggt	gta	agg	aag	ctc	att	atc	gag	tac	ttc	act	ttc	atc	ttt	ttc	act	576
	Gly	Val	Arg	Lys	Leu	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ile	Phe	Phe	Thr	
				180				185						190			
55	gat	tgc	ggg	gtg	tat	tta	gcg	cac	aga	tgg	ttg	cat	tgg	cca	agg	gtc	624
	Asp	Cys	Gly	Val	Tyr	Leu	Ala	His	Arg	Trp	Leu	His	Trp	Pro	Arg	Val	
			195				200						205				
60	tac	cgt	gct	ctg	cac	aag	cct	cat	cac	aag	tgg	ctg	gtc	tgc	aca	cct	672
	Tyr	Arg	Ala	Leu	His	Lys	Pro	His	His	Lys	Trp	Leu	Val	Cys	Thr	Pro	
		210					215					220					
65	ttc	gca	tct	cat	tct	ttc	cat	cct	gta	gac	ggg	ttt	ttg	caa	tcc	atc	720
	Phe	Ala	Ser	His	Ser	Phe	His	Pro	Val	Asp	Gly	Phe	Leu	Gln	Ser	Ile	
	225					230					235					240	
70	tcg	tac	cac	atc	tac	cca	ttg	att	ctg	cca	tta	cac	aag	ggt	tct	tat	768
	Ser	Tyr	His	Ile	Tyr	Pro	Leu	Ile	Leu	Pro	Leu	His	Lys	Val	Ser	Tyr	
				245						250					255		

ES 2 396 057 T3

	ttg	att	ctg	ttc	act	ttt	gtt	aac	ttt	tgg	act	gtt	atg	att	cat	gac	816
	Leu	Ile	Leu	Phe	Thr	Phe	Val	Asn	Phe	Trp	Thr	Val	Met	Ile	His	Asp	
				260					265					270			
5	ggt	caa	tac	cta	tca	aac	aat	cct	gcc	gtc	aac	ggt	act	gcc	tgc	cac	864
	Gly	Gln	Tyr	Leu	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ala	Cys	His	
			275					280					285				
10	acg	gtt	cac	cat	cta	tat	ttc	aac	tac	aac	tac	ggt	caa	ttc	acc	act	912
	Thr	Val	His	His	Leu	Tyr	Phe	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Gln	Phe	Thr	Thr	
		290					295					300					
	ctg	tgg	gac	aga	cta	ggg	ggt	tct	tac	cgt	aga	cca	gat	gac	tca	ttg	960
15	Leu	Trp	Asp	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Tyr	Arg	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Leu	
	305					310				315						320	
	ttt	gat	cct	aag	tta	aga	gat	gct	aag	gag	acc	tgg	gac	gct	caa	gtt	1008
20	Phe	Asp	Pro	Lys	Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Glu	Thr	Trp	Asp	Ala	Gln	Val	
				325						330					335		
	aag	gaa	gtt	gaa	cat	ttc	atc	aag	gag	gtc	gaa	ggt	gat	gat	aat	gat	1056
25	Lys	Glu	Val	Glu	His	Phe	Ile	Lys	Glu	Val	Glu	Gly	Asp	Asp	Asn	Asp	
				340					345					350			
	aga	atc	tat	gaa	aac	gac	cca	aat	acc	aag	aag	aac	aac	tga			1098
	Arg	Ile	Tyr	Glu	Asn	Asp	Pro	Asn	Thr	Lys	Lys	Asn	Asn				
			355					360					365				
30	<210> 12																
	<211> 365																
	<212> PRT																
	<213> Saccharomyces cerevisiae																
35	<400> 12																
	Met	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Ala	Asp	His	Tyr	Val	Leu	Asp	Asp	Leu	
	1				5					10					15		
40	Tyr	Ala	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Lys	
				20					25					30			
	Trp	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Asn	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile	
45			35					40					45				
	Leu	Gln	Glu	Thr	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Ala	Val	Lys	Glu	Cys	Arg	Arg	
	50					55						60					
50	Phe	Tyr	Gly	Gln	Val	Pro	Phe	Leu	Phe	Asp	Met	Ser	Thr	Thr	Ser	Phe	
	65				70					75						80	
	Ala	Ser	Leu														

ES 2 396 057 T3

	115	120	125
	Arg Tyr Leu Lys Asn Gln Met Ala Met Glu Ile Lys Leu Ala Val Ser		
	130	135	140
5	Ala Ile Pro Trp Met Ser Met Leu Thr Val Pro Trp Phe Val Met Glu		
	145	150	155
	Leu Asn Gly His Ser Lys Leu Tyr Met Lys Ile Asp Tyr Glu Asn His		
10		165	170
	Gly Val Arg Lys Leu Ile Ile Glu Tyr Phe Thr Phe Ile Phe Phe Thr		
	180	185	190
15	Asp Cys Gly Val Tyr Leu Ala His Arg Trp Leu His Trp Pro Arg Val		
	195	200	205
	Tyr Arg Ala Leu His Lys Pro His His Lys Trp Leu Val Cys Thr Pro		
20	210	215	220
	Phe Ala Ser His Ser Phe His Pro Val Asp Gly Phe Leu Gln Ser Ile		
	225	230	235
	Ser Tyr His Ile Tyr Pro Leu Ile Leu Pro Leu His Lys Val Ser Tyr		
25		245	250
	Leu Ile Leu Phe Thr Phe Val Asn Phe Trp Thr Val Met Ile His Asp		
	260	265	270
30	Gly Gln Tyr Leu Ser Asn Asn Pro Ala Val Asn Gly Thr Ala Cys His		
	275	280	285
	Thr Val His His Leu Tyr Phe Asn Tyr Asn Tyr Gly Gln Phe Thr Thr		
	290	295	300
35	Leu Trp Asp Arg Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Arg Pro Asp Asp Ser Leu		
	305	310	315
	Phe Asp Pro Lys Leu Arg Asp Ala Lys Glu Thr Trp Asp Ala Gln Val		
40		325	330
	Lys Glu Val Glu His Phe Ile Lys Glu Val Glu Gly Asp Asp Asn Asp		
	340	345	350
45	Arg Ile Tyr Glu Asn Asp Pro Asn Thr Lys Lys Asn Asn		
	355	360	365
50	<210> 13		
	<211> 1557		
	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
55	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (1)..(1557)		
	<400> 13		

ES 2 396 057 T3

	atg	gag	ccc	gcc	gtg	tcg	ctg	gcc	gtg	tgc	gcg	ctg	ctc	ttt	ctg	ctc	48
	Met	Glu	Pro	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	
	1				5					10					15		
5	tgg	gtg	cga	gtg	aag	ggg	ttg	gag	ttc	ggt	ctc	atc	cac	cag	cgc	tgg	96
	Trp	Val	Arg	Val	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val	Leu	Ile	His	Gln	Arg	Trp	
				20					25					30			
10	gtg	ttc	gtg	tgc	ctc	ttc	ttg	ctg	ccg	ctc	tcg	ctc	atc	ttc	gat	atc	144
	Val	Phe	Val	Cys	Leu	Phe	Leu	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Asp	Ile	
			35					40					45				
15	tac	tac	tac	gtg	cgc	gcc	tgg	gtg	gtg	ttc	aag	ctg	agc	agt	gcg	ccg	192
	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Arg	Ala	Trp	Val	Val	Phe	Lys	Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	
		50					55					60					
20	cgc	ctg	cac	gag	cag	cgc	gtg	cgg	gac	atc	cag	aaa	cag	gtc	cgg	gaa	240
	Arg	Leu	His	Glu	Gln	Arg	Val	Arg	Asp	Ile	Gln	Lys	Gln	Val	Arg	Glu	
	65				70					75						80	
	tgg	aag	gaa	cag	ggc	agt	aag	acc	ttc	atg	tgc	acg	ggg	cgc	cca	ggc	288
	Trp	Lys	Glu	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr	Phe	Met	Cys	Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	
					85					90					95		
25	tgg	ctc	act	gtc	tcg	ctg	cga	gtc	gga	aag	tac	aag	aag	acc	cat	aag	336
	Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Arg	Val	Gly	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	His	Lys	
				100					105					110			
30	aac	atc	atg	atc	aac	ctg	atg	gac	atc	ctg	gag	gtg	gac	acc	aag	aaa	384
	Asn	Ile	Met	Ile	Asn	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	
			115					120					125				
35	cag	att	ggt	cga	gtg	gag	ccc	ttg	gtg	tct	atg	ggt	cag	gtg	aca	gct	432
	Gln	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Ser	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Ala	
		130					135					140					
40	ttg	ctg	aac	tcc	att	ggc	tgg	acc	ctg	cct	gtg	ttg	cct	gag	ctt	gat	480
	Leu	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Trp	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	
	145					150				155						160	
	gac	ctc	aca	gtg	ggg	ggc	ctg	atc	atg	ggc	aca	ggc	atc	gag	tca	tcg	528
	Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	
					165					170					175		
45	tcc	cac	aag	tat	ggc	ctg	ttc	caa	cac	att	tgc	act	gcc	tac	gag	ctg	576
	Ser	His	Lys	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	His	Ile	Cys	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	
				180					185					190			
50	atc	ctg	gca	gac	ggc	agc	ttt	gtg	cgc	tgc	aca	ccg	tct	gaa	aac	tca	624
	Ile	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
			195					200					205				
55	gac	ctg	ttc	tat	ggc	gtg	ccc	tgg	tcc	tgt	ggg	acc	ctg	ggc	ttc	ctg	672
	Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
		210					215					220					
	gtg	gct	gcc	gag	atc	cgg	atc	atc	ccg	gcc	aag	aag	tat	gtc	aag	ctg	720
	Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	

ES 2 396 057 T3

	225						230						235						240	
5	cgg	ttt	gag	cct	gtt	cgg	ggc	ctg	gag	gcc	atc	tgt	gaa	aaa	ttc	acc	768			
	Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Glu	Lys	Phe	Thr				
					245					250					255					
10	cgc	gag	tcc	cag	cgg	ctg	gag	aac	cac	ttc	gtg	gaa	ggg	ttg	ctg	tac	816			
	Arg	Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr				
				260					265					270						
15	tcc	ctg	gat	gag	gct	gtg	gct	gtc	atc	atg	aca	ggg	gtc	atg	acg	gac	864			
	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp				
			275					280					285							
20	gac	gta	gag	tcc	agc	aag	ctg	aat	agc	att	ggc	agt	tac	tac	aag	ccc	912			
	Asp	Val	Glu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Pro				
		290					295				300									
25	tgg	ttc	ttc	aag	cat	gtg	gag	aac	tac	ctg	aag	aca	aac	cgg	gag	ggc	960			
	Trp	Phe	Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly				
	305					310				315					320					
30	ctc	gaa	tac	att	ccc	ctg	aga	cac	tac	tac	cac	cga	cac	acg	cgc	agc	1008			
	Leu	Glu	Tyr	Ile	Pro	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Thr	Arg	Ser				
					325					330					335					
35	atc	ttc	tgg	gag	ctc	cag	gac	atc	atc	cct	ttc	ggc	aac	aac	ccc	atc	1056			
	Ile	Phe	Trp	Glu	Leu	Gln	Asp	Ile	Ile	Pro	Phe	Gly	Asn	Asn	Pro	Ile				
				340					345					350						
40	ttc	cgc	tac	ctc	ttc	ggc	tgg	atg	gtg	cct	ccc	aag	atc	tcc	ctc	ctg	1104			
	Phe	Arg	Tyr	Leu	Phe	Gly	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu				
			355				360					365								
45	aag	ctg	acc	cag	ggc	gag	acg	cta	cgc	aag	ctg	tac	gag	cag	cac	cac	1152			
	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gln	His	His				
		370					375				380									
50	gtg	gtg	cag	gac	atg	ctg	gtg	ccc	atg	aag	tgc	atg	tca	cag	gcc	ctg	1200			
	Val	Val	Gln	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Met	Lys	Cys	Met	Ser	Gln	Ala	Leu				
	385					390				395					400					
55	cat	acc	ttc	caa	aat	gac	atc	cac	gtc	tac	ccc	atc	tgg	ctg	tgc	cca	1248			
	His	Thr	Phe	Gln	Asn	Asp	Ile	His	Val	Tyr	Pro	Ile	Trp	Leu	Cys	Pro				
					405				410						415					
60	ttc	atc	ctg	ccc	agc	cag	cca	gga	cta	gtg	cat	ccc	aag	gga	gat	gaa	1296			
	Phe	Ile	Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Val	His	Pro	Lys	Gly	Asp	Glu				
				420					425					430						
65	gca	gag	ctc	tac	gtg	gac	atc	ggg	gca	tac	ggg	gag	cca	cgt	gtg	aag	1344			
	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp	Ile	Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Pro	Arg	Val	Lys				
			435					440					445							
70	cac	ttc	gag	gcc	agg	tcc	tgc	atg	agg	cag	ctg	gag	aag	ttt	gtg	cgg	1392			
	His	Phe	Glu	Ala	Arg	Ser	Cys	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Lys	Phe	Val	Arg				
		450					455					460								

ES 2 396 057 T3

```

    agt gtg cac ggg ttc caa atg tta tac gcc gat tgc tat atg aac cgc 1440
    Ser Val His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg
    465                               470                               475                               480

5   gag gaa ttc tgg gag atg ttc gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cgc 1488
    Glu Glu Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg
                                485                               490                               495

    aag cag ctg ggc tgc cag gac gcc ttc cct gag gtg tac gac aag atc 1536
10  Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile
                                500                               505                               510

    tgc aag gcg gca agg cac tga
15  Cys Lys Ala Ala Arg His
                                515                               1557

<210> 14
<211> 518
20  <212> PRT
    <213> Mus musculus

<400> 14
25  Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
    1                               5                               10                               15

    Trp Val Arg Val Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
                                20                               25                               30

30  Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
    35                               40                               45

    Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
    50                               55                               60

35  Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
    65                               70                               75                               80

    Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
40  85                               90                               95

    Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
    100                              105                              110

45  Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys
    115                              120                              125

    Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Ser Met Gly Gln Val Thr Ala
    130                              135                              140

50  Leu Leu Asn Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp
    145                              150                              155                              160

    Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Ile Met Gly Thr Gly Ile Glu Ser Ser
55  165                              170                              175

    Ser His Lys Tyr Gly Leu Phe Gln His Ile Cys Thr Ala Tyr Glu Leu
    180                              185                              190

```

ES 2 396 057 T3

	Ile	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
			195					200					205				
5	Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
		210					215					220					
	Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	
	225					230					235					240	
10	Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Glu	Lys	Phe	Thr	
					245					250					255		
	Arg	Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	
15				260					265					270			
	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp	
			275					280					285				
20	Asp	Val	Glu	Ser	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Pro	
		290					295					300					
	Trp	Phe	Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly	
	305					310					315					320	
25	Leu	Glu	Tyr	Ile	Pro	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Thr	Arg	Ser	
					325					330					335		
	Ile	Phe	Trp	Glu	Leu	Gln	Asp	Ile	Ile	Pro	Phe	Gly	Asn	Asn	Pro	Ile	
30				340					345					350			
	Phe	Arg	Tyr	Leu	Phe	Gly	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu	
			355					360					365				
35	Lys	Leu	Thr	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gln	His	His	
		370					375					380					
	Val	Val	Gln	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Met	Lys	Cys	Met	Ser	Gln	Ala	Leu	
	385					390					395					400	
40	His	Thr	Phe	Gln	Asn	Asp	Ile	His	Val	Tyr	Pro	Ile	Trp	Leu	Cys	Pro	
					405					410					415		
	Phe	Ile	Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Val	His	Pro	Lys	Gly	Asp	Glu	
45				420					425					430			
	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Asp	Ile	Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Pro	Arg	Val	Lys	
			435					440					445				
50	His	Phe	Glu	Ala	Arg	Ser	Cys	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Lys	Phe	Val	Arg	
		450					455					460					
	Ser	Val	His	Gly	Phe	Gln	Met	Leu	Tyr	Ala	Asp	Cys	Tyr	Met	Asn	Arg	
	465					470					475					480	
55	Glu	Glu	Phe	Trp	Glu	Met	Phe	Asp	Gly	Ser	Leu	Tyr	His	Lys	Leu	Arg	
					485					490					495		

ES 2 396 057 T3

Lys Gln Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile
500 505 510

Cys Lys Ala Ala Arg His
5 515

<210> 15
<211> 1551
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
15 <222> (1)..(1551)

<400> 15
atg gag ccc gcc gtg tcg ctg gcc gtg tgc gcg ctg ctc ttc ctg ctg 48
Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
20 1 5 10 15

tgg gtg cgc ctg aag ggg ctg gag ttc gtg ctc atc cac cag cgc tgg 96
Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
25 20 25 30

gtg ttc gtg tgc ctc ttc ctc ctg ccg ctc tcg ctt atc ttc gat atc 144
Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
35 40 45

tac tac tac gtg cgc gcc tgg gtg gtg ttc aag ctc agc agc gct ccg 192
Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
30 50 55 60

cgc ctg cac gag cag cgc gtg cgg gac atc cag aag cag gtg cgg gaa 240
Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
35 65 70 75 80

tgg aag gag cag ggt agc aag acc ttc atg tgc acg ggg cgc cct ggc 288
Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
40 85 90 95

tgg ctc act gtc tca cta cgt gtc ggg aag tac aag aag aca cac aaa 336
Trp Leu Thr Val Ser Leu Arg Val Gly Lys Tyr Lys Lys Thr His Lys
45 100 105 110

aac atc atg atc aac ctg atg gac att ctg gaa gtg gac acc aag aaa 384
Asn Ile Met Ile Asn Leu Met Asp Ile Leu Glu Val Asp Thr Lys Lys
115 120 125

cag att gtc cgt gtg gag ccc ttg gtg acc atg ggc cag gtg act gcc 432
Gln Ile Val Arg Val Glu Pro Leu Val Thr Met Gly Gln Val Thr Ala
50 130 135 140

ctg ctg acc tcc att ggc tgg act ctc ccc gtg ttg cct gag ctt gat 480
Leu Leu Thr Ser Ile Gly Trp Thr Leu Pro Val Leu Pro Glu Leu Asp
55 145 150 155 160

gac ctc aca gtg ggg ggc ttg atc atg ggc aca ggc atc gag tca tca 528

ES 2 396 057 T3

	Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	
					165					170					175		
5	tcc	cac	aag	tac	ggc	ctg	ttc	caa	cac	atc	tgc	act	gct	tac	gag	ctg	576
	Ser	His	Lys	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	His	Ile	Cys	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	
				180				185					190				
10	gtc	ctg	gct	gat	ggc	agc	ttt	gtg	cga	tgc	act	ccg	tcc	gaa	aac	tca	624
	Val	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
			195					200					205				
15	gac	ctg	ttc	tat	gcc	gta	ccc	tgg	tcc	tgt	ggg	acg	ctg	ggt	ttc	ctg	672
	Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
		210					215					220					
	gtg	gcc	gct	gag	atc	cgc	atc	atc	cct	gcc	aag	aag	tac	gtc	aag	ctg	720
	Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	
	225					230					235					240	
20	cgt	ttc	gag	cca	gtg	cgg	ggc	ctg	gag	gct	atc	tgt	gcc	aag	ttc	acc	768
	Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Ala	Lys	Phe	Thr	
					245					250					255		
25	cac	gag	tcc	cag	cgg	cag	gag	aac	cac	ttc	gtg	gaa	ggg	ctg	ctc	tac	816
	His	Glu	Ser	Gln	Arg	Gln	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	
				260				265						270			
30	tcc	ctg	gat	gag	gct	gtc	att	atg	aca	ggg	gtc	atg	aca	gat	gag	gca	864
	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	
			275					280					285				
35	gag	ccc	agc	aag	ctg	aat	agc	att	ggc	aat	tac	tac	aag	ccg	tgg	ttc	912
	Glu	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Pro	Trp	Phe	
		290					295					300					
	ttt	aag	cat	gtg	gag	aac	tat	ctg	aag	aca	aac	cga	gag	ggc	ctg	gag	960
	Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Glu	
	305					310					315				320		
40	tac	att	ccc	ttg	aga	cac	tac	tac	cac	cgc	cac	acg	cgc	agc	atc	ttc	1008
	Tyr	Ile	Pro	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Thr	Arg	Ser	Ile	Phe	
					325					330					335		
45	tgg	gag	ctc	cag	gac	atc	atc	ccc	ttt	ggc	aac	aac	ccc	atc	ttc	cgc	1056
	Trp	Glu	Leu	Gln	Asp	Ile	Ile	Pro	Phe	Gly	Asn	Asn	Pro	Ile	Phe	Arg	
				340				345					350				
50	tac	ctc	ttt	ggc	tgg	atg	gtg	cct	ccc	aag	atc	tcc	ctc	ctg	aag	ctg	1104
	Tyr	Leu	Phe	Gly	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	
			355					360					365				
55	acc	cag	ggt	gag	acc	ctg	cgc	aag	ctg	tac	gag	cag	cac	cac	gtg	gtg	1152
	Thr	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gln	His	His	Val	Val	
		370					375					380					
	cag	gac	atg	ctg	gtg	ccc	atg	aag	tgc	ctg	cag	cag	gcc	ctg	cac	acc	1200
	Gln	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Met	Lys	Cys	Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	His	Thr	
	385					390					395					400	

ES 2 396 057 T3

ttc caa aac gac atc cac gtc tac ccc atc tgg ctg tgt ccg ttc atc 1248
 Phe Gln Asn Asp Ile His Val Tyr Pro Ile Trp Leu Cys Pro Phe Ile
 405 410 415
 5
 ctg ccc agc cag cca ggc cta gtg cac ccc aaa gga aat gag gca gag 1296
 Leu Pro Ser Gln Pro Gly Leu Val His Pro Lys Gly Asn Glu Ala Glu
 420 425 430
 10
 ctc tac atc gac att gga gca tat ggg gag ccg cgt gtg aaa cac ttt 1344
 Leu Tyr Ile Asp Ile Gly Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Val Lys His Phe
 435 440 445
 15
 gaa gcc agg tcc tgc atg agg cag ctg gag aag ttt gtc cgc agc gtg 1392
 Glu Ala Arg Ser Cys Met Arg Gln Leu Glu Lys Phe Val Arg Ser Val
 450 455 460
 20
 cat ggc ttc cag atg ctg tat gcc gac tgc tac atg aac cgg gag gag 1440
 His Gly Phe Gln Met Leu Tyr Ala Asp Cys Tyr Met Asn Arg Glu Glu
 465 470 475 480
 25
 ttc tgg gag atg ttt gat ggc tcc ttg tac cac aag ctg cga gag aag 1488
 Phe Trp Glu Met Phe Asp Gly Ser Leu Tyr His Lys Leu Arg Glu Lys
 485 490 495
 30
 ctg ggt tgc cag gac gcc ttc ccc gag gtg tac gac aag atc tgc aag 1536
 Leu Gly Cys Gln Asp Ala Phe Pro Glu Val Tyr Asp Lys Ile Cys Lys
 500 505 510
 35
 gcc gcc agg cac tga 1551
 Ala Ala Arg His
 515
 40
 <210> 16
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 16
 Met Glu Pro Ala Val Ser Leu Ala Val Cys Ala Leu Leu Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 45
 Trp Val Arg Leu Lys Gly Leu Glu Phe Val Leu Ile His Gln Arg Trp
 20 25 30
 Val Phe Val Cys Leu Phe Leu Leu Pro Leu Ser Leu Ile Phe Asp Ile
 35 40 45
 50
 Tyr Tyr Tyr Val Arg Ala Trp Val Val Phe Lys Leu Ser Ser Ala Pro
 50 55 60
 55
 Arg Leu His Glu Gln Arg Val Arg Asp Ile Gln Lys Gln Val Arg Glu
 65 70 75 80
 55
 Trp Lys Glu Gln Gly Ser Lys Thr Phe Met Cys Thr Gly Arg Pro Gly
 85 90 95

ES 2 396 057 T3

	Trp	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Arg	Val	Gly	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	His	Lys	
				100					105					110			
5	Asn	Ile	Met	Ile	Asn	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Glu	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	
			115					120					125				
	Gln	Ile	Val	Arg	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Ala	
			130				135					140					
10	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Gly	Trp	Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	Asp	
	145					150					155					160	
	Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Met	Gly	Thr	Gly	Ile	Glu	Ser	Ser	
					165					170					175		
15	Ser	His	Lys	Tyr	Gly	Leu	Phe	Gln	His	Ile	Cys	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	
				180					185					190			
	Val	Leu	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Val	Arg	Cys	Thr	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	
20			195					200					205				
	Asp	Leu	Phe	Tyr	Ala	Val	Pro	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Leu	Gly	Phe	Leu	
			210				215					220					
25	Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Leu	
	225					230					235					240	
	Arg	Phe	Glu	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Cys	Ala	Lys	Phe	Thr	
					245					250					255		
30	His	Glu	Ser	Gln	Arg	Gln	Glu	Asn	His	Phe	Val	Glu	Gly	Leu	Leu	Tyr	
				260					265					270			
	Ser	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Ile	Met	Thr	Gly	Val	Met	Thr	Asp	Glu	Ala	
35			275					280					285				
	Glu	Pro	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Pro	Trp	Phe	
		290					295					300					
40	Phe	Lys	His	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Arg	Glu	Gly	Leu	Glu	
	305					310					315					320	
	Tyr	Ile	Pro	Leu	Arg	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Thr	Arg	Ser	Ile	Phe	
					325					330					335		
45	Trp	Glu	Leu	Gln	Asp	Ile	Ile	Pro	Phe	Gly	Asn	Asn	Pro	Ile	Phe	Arg	
				340					345					350			
	Tyr	Leu	Phe	Gly	Trp	Met	Val	Pro	Pro	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	
50			355					360					365				
	Thr	Gln	Gly	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Glu	Gln	His	His	Val	Val	
			370				375					380					
55	Gln	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Met	Lys	Cys	Leu	Gln	Gln	Ala	Leu	His	Thr	
	385					390					395					400	
	Phe	Gln	Asn	Asp	Ile	His	Val	Tyr	Pro	Ile	Trp	Leu	Cys	Pro	Phe	Ile	

ES 2 396 057 T3

		405		410		415											
	Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	Gly	Leu	Val	His	Pro	Lys	Gly	Asn	Glu	Ala	Glu	
				420					425					430			
5	Leu	Tyr	Ile	Asp	Ile	Gly	Ala	Tyr	Gly	Glu	Pro	Arg	Val	Lys	His	Phe	
			435					440					445				
	Glu	Ala	Arg	Ser	Cys	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Lys	Phe	Val	Arg	Ser	Val	
10		450					455					460					
	His	Gly	Phe	Gln	Met	Leu	Tyr	Ala	Asp	Cys	Tyr	Met	Asn	Arg	Glu	Glu	
	465					470				475					480		
15	Phe	Trp	Glu	Met	Phe	Asp	Gly	Ser	Leu	Tyr	His	Lys	Leu	Arg	Glu	Lys	
					485					490					495		
	Leu	Gly	Cys	Gln	Asp	Ala	Phe	Pro	Glu	Val	Tyr	Asp	Lys	Ile	Cys	Lys	
			500						505					510			
20	Ala	Ala	Arg	His													
			515														
25	<210>	17															
	<211>	1422															
	<212>	ADN															
	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
30	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1) .. (1422)															
	<400>	17															
35	atg	gca	aag	gat	aat	agt	gag	aag	ctg	cag	gtg	cag	gga	gag	gag	aaa	48
	Met	Ala	Lys	Asp	Asn	Ser	Glu	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Glu	Lys	
	1				5					10				15			
	aag	tcc	aag	caa	ccg	gtt	aat	ttc	ctg	cct	cag	ggt	aaa	tgg	ctg	aag	96
40	Lys	Ser	Lys	Gln	Pro	Val	Asn	Phe	Leu	Pro	Gln	Gly	Lys	Trp	Leu	Lys	
			20						25				30				
	cca	aat	gaa	atc	gaa	tat	gag	ttt	ggt	ggg	act	act	ggt	gtt	att	ggt	144
45	Pro	Asn	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Phe	Gly	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Gly	
		35					40						45				
	atg	ctg	atc	ggg	ttt	cca	ctg	cta	atg	tac	tat	atg	tgg	att	tgt	gcg	192
	Met	Leu	Ile	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Met	Tyr	Tyr	Met	Trp	Ile	Cys	Ala	
		50					55					60					
50	gaa	ttt	tat	cac	ggt	aag	gtt	gcc	cta	ccc	aag	gct	ggt	gaa	tcg	tgg	240
	Glu	Phe	Tyr	His	Gly	Lys	Val	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Gly	Glu	Ser	Trp	
	65					70				75				80			
	atg	cac	ttt	atc	aag	cac	cta	tac	cag	tta	gtc	ttg	gag	aac	ggt	atc	288
55	Met	His	Phe	Ile	Lys	His	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	
					85					90				95			

ES 2 396 057 T3

	cca	gaa	aag	tat	gac	tgg	act	att	ttc	tta	aca	ttt	tgg	gtg	ttt	cag	336
	Pro	Glu	Lys	Tyr	Asp	Trp	Thr	Ile	Phe	Leu	Thr	Phe	Trp	Val	Phe	Gln	
			100						105					110			
5	atc	att	ttc	tac	tat	acg	ttg	ccc	ggg	att	tgg	aca	aaa	ggt	caa	cca	384
	Ile	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Pro	Gly	Ile	Trp	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	
			115					120					125				
10	ttg	tct	cat	ttg	aag	gga	aaa	caa	ttg	cct	tac	ttt	tgt	aat	gcc	atg	432
	Leu	Ser	His	Leu	Lys	Gly	Lys	Gln	Leu	Pro	Tyr	Phe	Cys	Asn	Ala	Met	
			130				135					140					
15	tgg	acc	ttg	tat	gta	act	acc	act	ttg	gtc	ttg	ggt	ttg	cac	ttt	acc	480
	Trp	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Leu	His	Phe	Thr		
	145					150				155					160		
20	aat	ctt	ttt	aga	ttg	tat	gtc	att	att	gac	cgt	ttt	ggg	agg	atc	atg	528
	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Tyr	Val	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	Met	
				165						170					175		
	aca	tgt	gcc	att	att	tca	ggg	ttt	gcc	ttc	tcc	atc	ata	ttg	tac	tta	576
	Thr	Cys	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ile	Ile	Leu	Tyr	Leu	
				180				185						190			
25	tgg	act	tta	ttt	atc	tca	cat	gac	tat	cat	aga	atg	aca	gga	aac	cat	624
	Trp	Thr	Leu	Phe	Ile	Ser	His	Asp	Tyr	His	Arg	Met	Thr	Gly	Asn	His	
			195					200				205					
30	cta	tat	gat	ttc	ttc	atg	gga	gct	cca	cta	aac	cct	agg	tgg	ggg	att	672
	Leu	Tyr	Asp	Phe	Phe	Met	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Arg	Trp	Gly	Ile	
		210					215					220					
35	ttg	gac	ttg	aag	atg	ttt	ttc	gag	ggt	aga	tta	cct	tgg	ttc	acc	ctt	720
	Leu	Asp	Leu	Lys	Met	Phe	Phe	Glu	Val	Arg	Leu	Pro	Trp	Phe	Thr	Leu	
	225				230					235					240		
40	tac	ttt	atc	act	ttg	ggt	gcc	tgt	ttg	aag	cag	tgg	gag	act	tac	ggc	768
	Tyr	Phe	Ile	Thr	Leu	Gly	Ala	Cys	Leu	Lys	Gln	Trp	Glu	Thr	Tyr	Gly	
				245				250						255			
	tat	gtg	aca	cca	caa	ttg	ggg	ggt	gtc	atg	tta	gct	cat	tgg	ttg	tac	816
	Tyr	Val	Thr	Pro	Gln	Leu	Gly	Val	Val	Met	Leu	Ala	His	Trp	Leu	Tyr	
				260				265					270				
45	gcg	aac	gca	tgt	gct	aaa	ggt	gaa	gaa	ttg	att	ggt	cca	acc	tgg	gac	864
	Ala	Asn	Ala	Cys	Ala	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Ile	Val	Pro	Thr	Trp	Asp	
			275					280					285				
50	atg	gct	tac	gaa	aag	ttt	gga	ttt	atg	ctg	atc	ttc	tgg	aat	att	gcc	912
	Met	Ala	Tyr	Glu	Lys	Phe	Gly	Phe	Met	Leu	Ile	Phe	Trp	Asn	Ile	Ala	
		290					295					300					
55	ggt	gtc	cca	tac	act	tac	tgt	cat	tgt	acg	ttg	tat	ttg	tac	tac	cat	960
	Gly	Val	Pro	Tyr	Thr	Tyr	Cys	His	Cys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	His	
	305				310					315					320		
	gac	cca	tct	gaa	tat	cac	tgg	tct	aca	ctg	tac	aat	ggt	tcg	ctg	tac	1008
	Asp	Pro	Ser	Glu	Tyr	His	Trp	Ser	Thr	Leu	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu	Tyr	

ES 2 396 057 T3

				325					330				335				
	gtt	gtt	cta	tta	tgc	gcc	tac	tac	ttc	ttt	gac	acg	gca	aat	gct	cag	1056
	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Ala	Gln	
5				340					345				350				
	aaa	aat	gcc	ttc	aga	aag	caa	atg	tct	ggg	gac	aag	aca	ggg	agg	aag	1104
	Lys	Asn	Ala	Phe	Arg	Lys	Gln	Met	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr	Gly	Arg	Lys	
			355				360						365				
10																	
	act	ttc	cca	ttt	ttg	cca	tac	caa	att	ttg	aag	aat	cca	aag	tat	atg	1152
	Thr	Phe	Pro	Phe	Leu	Pro	Tyr	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn	Pro	Lys	Tyr	Met	
		370					375					380					
15																	
	gtt	acc	tcc	aat	gga	tcg	tac	cta	ttg	att	gat	ggg	tgg	tac	act	ttg	1200
	Val	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Thr	Leu	
	385					390					395					400	
20																	
	gct	aga	aaa	att	cac	tac	act	gcc	gat	tgg	act	caa	tct	ctc	gtt	tgg	1248
	Ala	Arg	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ala	Asp	Trp	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Trp	
					405					410					415		
25																	
	gcc	ttg	tct	tgc	ggg	ttc	aac	tcg	gtg	ttc	cca	tgg	ttt	ttc	cca	gta	1296
	Ala	Leu	Ser	Cys	Gly	Phe	Asn	Ser	Val	Phe	Pro	Trp	Phe	Phe	Pro	Val	
				420					425					430			
30																	
	ttc	ttc	ctt	ggt	gtc	ctg	att	cac	aga	gcc	ttc	aga	gac	caa	gca	aaa	1344
	Phe	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Ile	His	Arg	Ala	Phe	Arg	Asp	Gln	Ala	Lys	
			435					440					445				
35																	
	tgt	aag	aga	aag	tac	gga	aaa	gat	tgg	gat	gag	tat	tgt	aaa	cat	tgc	1392
	Cys	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Lys	Asp	Trp	Asp	Glu	Tyr	Cys	Lys	His	Cys	
		450					455				460						
40																	
	cct	tac	gtc	ttt	att	cct	tat	ggt	ttc	tag							1422
	Pro	Tyr	Val	Phe	Ile	Pro	Tyr	Val	Phe								
	465					470											
45																	
	<210>	18															
	<211>	473															
	<212>	PRT															
	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
50																	
	Met	Ala	Lys	Asp	Asn	Ser	Glu	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Glu	Lys	
	1				5				10					15			
	Lys	Ser	Lys	Gln	Pro	Val	Asn	Phe	Leu	Pro	Gln	Gly	Lys	Trp	Leu	Lys	
				20					25					30			
	Pro	Asn	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Phe	Gly	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Gly	
			35					40					45				
55																	
	Met	Leu	Ile	Gly	Phe	Pro	Leu	Leu	Met	Tyr	Tyr	Met	Trp	Ile	Cys	Ala	
		50					55					60					
	Glu	Phe	Tyr	His	Gly	Lys	Val	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Gly	Glu	Ser	Trp	

ES 2 396 057 T3

	65					70						75				80
	Met	His	Phe	Ile	Lys	His	Leu	Tyr	Gln	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile
					85					90					95	
5	Pro	Glu	Lys	Tyr	Asp	Trp	Thr	Ile	Phe	Leu	Thr	Phe	Trp	Val	Phe	Gln
				100					105					110		
	Ile	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Pro	Gly	Ile	Trp	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro
10			115					120					125			
	Leu	Ser	His	Leu	Lys	Gly	Lys	Gln	Leu	Pro	Tyr	Phe	Cys	Asn	Ala	Met
		130					135					140				
15	Trp	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Thr	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Leu	His	Phe	Thr
	145					150					155					160
	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Tyr	Val	Ile	Ile	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile	Met
					165					170					175	
20	Thr	Cys	Ala	Ile	Ile	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ile	Ile	Leu	Tyr	Leu
				180					185					190		
	Trp	Thr	Leu	Phe	Ile	Ser	His	Asp	Tyr	His	Arg	Met	Thr	Gly	Asn	His
25			195					200					205			
	Leu	Tyr	Asp	Phe	Phe	Met	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Arg	Trp	Gly	Ile
		210					215					220				
30	Leu	Asp	Leu	Lys	Met	Phe	Phe	Glu	Val	Arg	Leu	Pro	Trp	Phe	Thr	Leu
	225					230					235					240
	Tyr	Phe	Ile	Thr	Leu	Gly	Ala	Cys	Leu	Lys	Gln	Trp	Glu	Thr	Tyr	Gly
					245					250					255	
35	Tyr	Val	Thr	Pro	Gln	Leu	Gly	Val	Val	Met	Leu	Ala	His	Trp	Leu	Tyr
				260					265					270		
	Ala	Asn	Ala	Cys	Ala	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Ile	Val	Pro	Thr	Trp	Asp
40			275					280					285			
	Met	Ala	Tyr	Glu	Lys	Phe	Gly	Phe	Met	Leu	Ile	Phe	Trp	Asn	Ile	Ala
		290					295					300				
45	Gly	Val	Pro	Tyr	Thr	Tyr	Cys	His	Cys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	His
	305					310					315					320
	Asp	Pro	Ser	Glu	Tyr	His	Trp	Ser	Thr	Leu	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu	Tyr
					325					330					335	
50	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Ala	Gln
				340					345					350		
	Lys	Asn	Ala	Phe	Arg	Lys	Gln	Met	Ser	Gly	Asp	Lys	Thr	Gly	Arg	Lys
55			355					360					365			
	Thr	Phe	Pro	Phe	Leu	Pro	Tyr	Gln	Ile	Leu	Lys	Asn	Pro	Lys	Tyr	Met
							375					380				

ES 2 396 057 T3

	Val Thr Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Leu Ile Asp Gly Trp Tyr Thr Leu	
	385 390 395 400	
5	Ala Arg Lys Ile His Tyr Thr Ala Asp Trp Thr Gln Ser Leu Val Trp	
	405 410 415	
	Ala Leu Ser Cys Gly Phe Asn Ser Val Phe Pro Trp Phe Phe Pro Val	
	420 425 430	
10	Phe Phe Leu Val Val Leu Ile His Arg Ala Phe Arg Asp Gln Ala Lys	
	435 440 445	
15	Cys Lys Arg Lys Tyr Gly Lys Asp Trp Asp Glu Tyr Cys Lys His Cys	
	450 455 460	
	Pro Tyr Val Phe Ile Pro Tyr Val Phe	
	465 470	
20	<210> 19	
	<211> 1152	
	<212> ADN	
	<213> Saccharomyces cerevisiae	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1152)	
30	<400> 19	
	atg agt gaa aca gaa ttg aga aaa aga cag gcc caa ttc act agg gag 48	
	Met Ser Glu Thr Glu Leu Arg Lys Arg Gln Ala Gln Phe Thr Arg Glu	
	1 5 10 15	
35	tta cat ggt gat gat att ggt aaa aag aca ggt ttg agt gca ttg atg 96	
	Leu His Gly Asp Asp Ile Gly Lys Lys Thr Gly Leu Ser Ala Leu Met	
	20 25 30	
	tcg aag aac aac tct gcc caa aag gaa gcc gtt cag aag tac ttg aga 144	
40	Ser Lys Asn Asn Ser Ala Gln Lys Glu Ala Val Gln Lys Tyr Leu Arg	
	35 40 45	
	aat tgg gat ggt aga acc gat aaa gat gcc gaa gaa cgt cgt ctt gag 192	
45	Asn Trp Asp Gly Arg Thr Asp Lys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Glu	
	50 55 60	
	gat tat aat gaa gcc aca cat tcc tac tat aac gtc gtt aca gat ttc 240	
	Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe	
	65 70 75 80	
50	tat gaa tat ggt tgg ggt tcc tct ttc cat ttc agc aga ttt tat aaa 288	
	Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys	
	85 90 95	
55	ggt gag agt ttc gct gcc tcg ata gca aga cat gaa cat tat tta gct 336	
	Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala	
	100 105 110	

ES 2 396 057 T3

	tac	aag	gct	ggt	att	caa	aga	ggc	gat	tta	gtt	ctc	gac	ggt	ggt	tgt	384
	Tyr	Lys	Ala	Gly	Ile	Gln	Arg	Gly	Asp	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Gly	Cys	
			115					120					125				
5	ggt	ggt	ggg	ggc	cca	gca	aga	gag	att	gca	aga	ttt	acc	ggt	tgt	aac	432
	Gly	Val	Gly	Gly	Pro	Ala	Arg	Glu	Ile	Ala	Arg	Phe	Thr	Gly	Cys	Asn	
		130					135					140					
10	gtc	atc	ggt	cta	aac	aat	aac	gat	tac	caa	att	gcc	aag	gca	aaa	tat	480
	Val	Ile	Gly	Leu	Asn	Asn	Asn	Asp	Tyr	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Lys	Tyr	
	145				150					155						160	
15	tac	gct	aaa	aaa	tac	aat	ttg	agt	gac	caa	atg	gac	ttt	gta	aag	ggt	528
	Tyr	Ala	Lys	Lys	Tyr	Asn	Leu	Ser	Asp	Gln	Met	Asp	Phe	Val	Lys	Gly	
					165					170					175		
20	gat	ttc	atg	aaa	atg	gat	ttc	gaa	gaa	aac	act	ttc	gac	aaa	ggt	tat	576
	Asp	Phe	Met	Lys	Met	Asp	Phe	Glu	Glu	Asn	Thr	Phe	Asp	Lys	Val	Tyr	
			180					185						190			
25	gca	att	gag	gcc	aca	tgt	cac	gct	cca	aaa	tta	gaa	ggt	gta	tac	agc	624
	Ala	Ile	Glu	Ala	Thr	Cys	His	Ala	Pro	Lys	Leu	Glu	Gly	Val	Tyr	Ser	
			195					200					205				
30	gaa	atc	tac	aag	ggt	ttg	aaa	ccg	ggt	ggt	acc	ttt	gct	ggt	tac	gaa	672
	Glu	Ile	Tyr	Lys	Val	Leu	Lys	Pro	Gly	Gly	Thr	Phe	Ala	Val	Tyr	Glu	
		210					215					220					
35	tgg	gta	atg	act	gat	aaa	tat	gac	gaa	aac	aat	cct	gaa	cat	aga	aag	720
	Trp	Val	Met	Thr	Asp	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Pro	Glu	His	Arg	Lys	
	225					230					235					240	
40	atc	gct	tat	gaa	att	gaa	cta	ggt	gat	ggt	atc	cca	aag	atg	ttc	cat	768
	Ile	Ala	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Ile	Pro	Lys	Met	Phe	His	
				245						250					255		
45	gtc	gac	gtg	gct	agg	aaa	gca	ttg	aag	aac	tgt	ggt	ttc	gaa	gtc	ctc	816
	Val	Asp	Val	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Asn	Cys	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	
			260					265					270				
50	ggt	agc	gaa	gac	ctg	gcg	gac	aat	gat	gat	gaa	atc	cct	tgg	tat	tac	864
	Val	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Asn	Asp	Asp	Glu	Ile	Pro	Trp	Tyr	Tyr	
		275						280					285				
55	cca	tta	act	ggt	gag	tgg	aag	tac	ggt	caa	aac	tta	gct	aat	ttg	gcc	912
	Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Trp	Lys	Tyr	Val	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Ala	
		290					295					300					
60	aca	ttt	ttc	aga	act	tct	tac	ttg	ggt	aga	caa	ttt	act	aca	gca	atg	960
	Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Phe	Thr	Thr	Ala	Met	
	305					310					315					320	
65	ggt	act	gta	atg	gaa	aaa	tta	ggt	cta	gcc	cca	gaa	ggt	tcc	aag	gaa	1008
	Val	Thr	Val	Met	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Lys	Glu	
					325					330					335		
70	ggt	act	gct	gct	cta	gaa	aat	gct	gcg	ggt	ggt	tta	ggt	gcc	ggt	ggt	1056
	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	

ES 2 396 057 T3

	340	345	350	
	aag tcc aag tta ttc act cca atg atg ctt ttc gtc gct agg aag cca	1104		
5	Lys Ser Lys Leu Phe Thr Pro Met Met Leu Phe Val Ala Arg Lys Pro	355 360 365		
	gaa aac gcc gaa acc ccc tcc caa act tcc caa gaa gca act caa taa	1152		
10	Glu Asn Ala Glu Thr Pro Ser Gln Thr Ser Gln Glu Ala Thr Gln	370 375 380		
	<210> 20			
	<211> 383			
	<212> PRT			
15	<213> Saccharomyces cerevisiae			
	<400> 20			
	Met Ser Glu Thr Glu Leu Arg Lys Arg Gln Ala Gln Phe Thr Arg Glu	1 5 10 15		
20	Leu His Gly Asp Asp Ile Gly Lys Lys Thr Gly Leu Ser Ala Leu Met	20 25 30		
	Ser Lys Asn Asn Ser Ala Gln Lys Glu Ala Val Gln Lys Tyr Leu Arg	35 40 45		
25	Asn Trp Asp Gly Arg Thr Asp Lys Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Glu	50 55 60		
30	Asp Tyr Asn Glu Ala Thr His Ser Tyr Tyr Asn Val Val Thr Asp Phe	65 70 75 80		
	Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Ser Ser Phe His Phe Ser Arg Phe Tyr Lys	85 90 95		
35	Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ser Ile Ala Arg His Glu His Tyr Leu Ala	100 105 110		
	Tyr Lys Ala Gly Ile Gln Arg Gly Asp Leu Val Leu Asp Val Gly Cys	115 120 125		
40	Gly Val Gly Gly Pro Ala Arg Glu Ile Ala Arg Phe Thr Gly Cys Asn	130 135 140		
45	Val Ile Gly Leu Asn Asn Asn Asp Tyr Gln Ile Ala Lys Ala Lys Tyr	145 150 155 160		
	Tyr Ala Lys Lys Tyr Asn Leu Ser Asp Gln Met Asp Phe Val Lys Gly	165 170 175		
50	Asp Phe Met Lys Met Asp Phe Glu Glu Asn Thr Phe Asp Lys Val Tyr	180 185 190		
	Ala Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu Gly Val Tyr Ser	195 200 205		
55	Glu Ile Tyr Lys Val Leu Lys Pro Gly Gly Thr Phe Ala Val Tyr Glu	210 215 220		

ES 2 396 057 T3

	Trp	Val	Met	Thr	Asp	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Pro	Glu	His	Arg	Lys	
	225					230					235					240	
5	Ile	Ala	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Asp	Gly	Ile	Pro	Lys	Met	Phe	His	
					245					250					255		
	Val	Asp	Val	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Asn	Cys	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	
10				260					265					270			
	Val	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Asn	Asp	Asp	Glu	Ile	Pro	Trp	Tyr	Tyr	
			275					280					285				
15	Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Trp	Lys	Tyr	Val	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Ala	
		290					295					300					
	Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Ser	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Phe	Thr	Thr	Ala	Met	
	305					310					315					320	
20	Val	Thr	Val	Met	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Lys	Glu	
					325					330					335		
	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	
25				340					345					350			
	Lys	Ser	Lys	Leu	Phe	Thr	Pro	Met	Met	Leu	Phe	Val	Ala	Arg	Lys	Pro	
			355					360					365				
30	Glu	Asn	Ala	Glu	Thr	Pro	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Glu	Ala	Thr	Gln		
		370					375					380					
35	<210> 21																
	<211> 1617																
	<212> ADN																
	<213> Saccharomyces cerevisiae																
40	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1)..(1617)																
	<400> 21																
45	atg	agt	tct	gtc	gca	gaa	aat	ata	ata	caa	cat	gcc	act	cat	aat	tct	48
	Met	Ser	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Ile	Ile	Gln	His	Ala	Thr	His	Asn	Ser	
	1				5					10					15		
	acg	cta	cac	caa	ttg	gct	aaa	gac	cag	ccc	tct	gta	ggc	gtc	act	act	96
	Thr	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Gln	Pro	Ser	Val	Gly	Val	Thr	Thr	
50				20					25					30			
	gcc	ttc	agt	atc	ctg	gat	aca	ctt	aag	tct	atg	tca	tat	ttg	aaa	ata	144
	Ala	Phe	Ser	Ile	Leu	Asp	Thr	Leu	Lys	Ser	Met	Ser	Tyr	Leu	Lys	Ile	
			35					40					45				
55	ttt	gct	act	tta	atc	tgt	att	ctt	ttg	gtt	tgg	gac	caa	gtt	gca	tat	192
	Phe	Ala	Thr	Leu	Ile	Cys	Ile	Leu	Leu	Val	Trp	Asp	Gln	Val	Ala	Tyr	
		50					55					60					

ES 2 396 057 T3

	caa atc aag aaa ggt tcc atc gca ggt cca aag ttt aag ttc tgg ccc	240
	Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro	
	65 70 75 80	
5	atc atc ggt cca ttt ttg gaa tcc tta gat cca aag ttt gaa gaa tat	288
	Ile Ile Gly Pro Phe Leu Glu Ser Leu Asp Pro Lys Phe Glu Glu Tyr	
	85 90 95	
10	aag gct aag tgg gca tcc ggt cca ctt tca tgt gtt tct att ttc cat	336
	Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His	
	100 105 110	
15	aaa ttt gtt gtt atc gca tct act aga gac ttg gca aga aag atc ttg	384
	Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu	
	115 120 125	
20	caa tct tcc aaa ttc gtc aaa cct tgc gtt gtc gat gtt gct gtg aag	432
	Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys	
	130 135 140	
25	atc tta aga cct tgc aat tgg gtt ttt ttg gac ggt aaa gct cat act	480
	Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr	
	145 150 155 160	
30	gat tac aga aaa tca tta aac ggt ctt ttc act aaa caa gct ttg gct	528
	Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala	
	165 170 175	
35	caa tac tta cct tca ttg gaa caa atc atg gat aag tac atg gat aag	576
	Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys	
	180 185 190	
40	ttt gtt cgt tta tct aag gag aat aac tac gag ccc cag gtc ttt ttc	624
	Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe	
	195 200 205	
45	cat gaa atg aga gaa att ctt tgc gcc tta tca ttg aac tct ttc tgt	672
	His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys	
	210 215 220	
50	ggt aac tat att acc gaa gat caa gtc aga aag att gct gat gat tac	720
	Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr	
	225 230 235 240	
55	tat ttg gtt aca gca gca ttg gaa tta gtc aac ttc cca att att atc	768
	Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile	
	245 250 255	
60	cct tac act aaa aca tgg tat ggt aag aaa act gca gac atg gcc atg	816
	Pro Tyr Thr Lys Thr Trp Tyr Gly Lys Lys Thr Ala Asp Met Ala Met	
	260 265 270	
65	aag att ttc gaa aac tgt gct caa atg gct aag gat cat att gct gca	864
	Lys Ile Phe Glu Asn Cys Ala Gln Met Ala Lys Asp His Ile Ala Ala	
	275 280 285	
70	ggt ggt aag cca gtt tgt gtt atg gat gct tgg tgt aag ttg atg cac	912
	Gly Gly Lys Pro Val Cys Val Met Asp Ala Trp Cys Lys Leu Met His	

ES 2 396 057 T3

		290					295					300						
5		gat	gca	aag	aat	agt	aac	gat	gat	gat	tct	aga	atc	tac	cac	aga	gag	960
	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Ile	Tyr	His	Arg	Arg	Glu	320
	305					310					315							
10		ttt	act	aac	aag	gaa	atc	tcc	gaa	gct	gtt	ttc	act	ttc	tta	ttt	gct	1008
	Phe	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Phe	Ala		335
					325					330								
15		tct	caa	gat	gcc	tct	tct	tct	tta	gct	tgt	tgg	ttg	ttc	caa	att	gtt	1056
	Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Cys	Trp	Leu	Phe	Gln	Ile	Val		345
					340					345					350			
20		gct	gac	cgt	cca	gat	gtc	tta	gct	aag	atc	aga	gaa	gaa	caa	ttg	gct	1104
	Ala	Asp	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala		360
					355										365			
25		ggt	cgt	aac	aat	gac	atg	tct	acc	gaa	ttg	aac	ttg	gat	ttg	att	gag	1152
	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Met	Ser	Thr	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu		370
																		380
30		aaa	atg	aag	tac	acc	aat	atg	gtc	ata	aaa	gaa	act	ttg	cgt	tac	aga	1200
	Lys	Met	Lys	Tyr	Thr	Asn	Met	Val	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Arg		385
																		390
35		cct	cct	gtc	ttg	atg	ggt	cca	tat	ggt	ggt	aag	aag	aat	ttc	cca	ggt	1248
	Pro	Pro	Val	Leu	Met	Val	Pro	Tyr	Val	Val	Lys	Lys	Asn	Phe	Pro	Val		405
																		410
40		tcc	cct	aac	tat	acc	gca	cca	aag	ggc	gct	atg	tta	att	cca	acc	tta	1296
	Ser	Pro	Asn	Tyr	Thr	Ala	Pro	Lys	Gly	Ala	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Leu		420
																		425
45		tac	cca	gct	tta	cat	gat	cct	gaa	ggt	tac	gaa	aat	cct	gat	gag	ttc	1344
	Tyr	Pro	Ala	Leu	His	Asp	Pro	Glu	Val	Tyr	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu	Phe		435
																		440
50		atc	cct	gaa	aga	tggt	gta	gaa	ggc	tct	aag	gct	agt	gaa	gca	aag	aag	1392
	Ile	Pro	Glu	Arg	Trp	Val	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys		445
																		450
55		aat	tggt	ttg	ggt	ttt	gggt	tgt	gggt	cca	cac	ggt	tgc	tta	gggt	caa	aca	1440
	Asn	Trp	Leu	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Pro	His	Val	Cys	Leu	Gly	Gln	Thr		465
																		470
60		tat	gtc	atg	att	acc	ttc	gcc	gct	ttg	ttg	gggt	aaa	ttt	gca	cta	tat	1488
	Tyr	Val	Met	Ile	Thr	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Lys	Phe	Ala	Leu	Tyr		485
																		490
65		act	gat	ttc	cat	cat												

ES 2 396 057 T3

aga gac cca att act gga gaa gtc ttc gaa taa 1617
 Arg Asp Pro Ile Thr Gly Glu Val Phe Glu
 530 535

5

<210> 22
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

10

<400> 22
 Met Ser Ser Val Ala Glu Asn Ile Ile Gln His Ala Thr His Asn Ser
 1 5 10 15

15

Thr Leu His Gln Leu Ala Lys Asp Gln Pro Ser Val Gly Val Thr Thr
 20 25 30

Ala Phe Ser Ile Leu Asp Thr Leu Lys Ser Met Ser Tyr Leu Lys Ile
 35 40 45

20

Phe Ala Thr Leu Ile Cys Ile Leu Leu Val Trp Asp Gln Val Ala Tyr
 50 55 60

25

Gln Ile Lys Lys Gly Ser Ile Ala Gly Pro Lys Phe Lys Phe Trp Pro
 65 70 75 80

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

30

Lys Ala Lys Trp Ala Ser Gly Pro Leu Ser Cys Val Ser Ile Phe His
 100 105 110

Lys Phe Val Val Ile Ala Ser Thr Arg Asp Leu Ala Arg Lys Ile Leu
 115 120 125

35

Gln Ser Ser Lys Phe Val Lys Pro Cys Val Val Asp Val Ala Val Lys
 130 135 140

40

Ile Leu Arg Pro Cys Asn Trp Val Phe Leu Asp Gly Lys Ala His Thr
 145 150 155 160

Asp Tyr Arg Lys Ser Leu Asn Gly Leu Phe Thr Lys Gln Ala Leu Ala
 165 170 175

45

Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Glu Gln Ile Met Asp Lys Tyr Met Asp Lys
 180 185 190

Phe Val Arg Leu Ser Lys Glu Asn Asn Tyr Glu Pro Gln Val Phe Phe
 195 200 205

50

His Glu Met Arg Glu Ile Leu Cys Ala Leu Ser Leu Asn Ser Phe Cys
 210 215 220

55

Gly Asn Tyr Ile Thr Glu Asp Gln Val Arg Lys Ile Ala Asp Asp Tyr
 225 230 235 240

Tyr Leu Val Thr Ala Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Pro Ile Ile Ile
 245 250 255

ES 2 396 057 T3

	Pro	Tyr	Thr	Lys	Thr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Lys	Thr	Ala	Asp	Met	Ala	Met	
				260					265					270			
5	Lys	Ile	Phe	Glu	Asn	Cys	Ala	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	His	Ile	Ala	Ala	
			275					280					285				
	Gly	Gly	Lys	Pro	Val	Cys	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Cys	Lys	Leu	Met	His	
		290					295					300					
10	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Ile	Tyr	His	Arg	Glu	
	305					310					315					320	
	Phe	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Thr	Phe	Leu	Phe	Ala	
15					325					330					335		
	Ser	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Ala	Cys	Trp	Leu	Phe	Gln	Ile	Val	
				340					345					350			
20	Ala	Asp	Arg	Pro	Asp	Val	Leu	Ala	Lys	Ile	Arg	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala	
			355					360					365				
	Val	Arg	Asn	Asn	Asp	Met	Ser	Thr	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu	
		370					375					380					
25	Lys	Met	Lys	Tyr	Thr	Asn	Met	Val	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Arg	
	385					390					395					400	
	Pro	Pro	Val	Leu	Met	Val	Pro	Tyr	Val	Val	Lys	Lys	Asn	Phe	Pro	Val	
30					405					410					415		
	Ser	Pro	Asn	Tyr	Thr	Ala	Pro	Lys	Gly	Ala	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Leu	
				420					425					430			
35	Tyr	Pro	Ala	Leu	His	Asp	Pro	Glu	Val	Tyr	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu	Phe	
			435					440					445				
	Ile	Pro	Glu	Arg	Trp	Val	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Ser	Glu	Ala	Lys	Lys	
		450					455					460					
40	Asn	Trp	Leu	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Pro	His	Val	Cys	Leu	Gly	Gln	Thr	
	465					470					475					480	
	Tyr	Val	Met	Ile	Thr	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Lys	Phe	Ala	Leu	Tyr	
45					485					490					495		
	Thr	Asp	Phe	His	His	Thr	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Glu	Lys	Ile	Lys	Val	
				500					505					510			
50	Phe	Ala	Thr	Ile	Phe	Pro	Lys	Asp	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Phe	Lys	Lys	
			515					520					525				
	Arg	Asp	Pro	Ile	Thr	Gly	Glu	Val	Phe	Glu							
		530					535										
55																	
	<210>	23															
	<211>	1578															

ES 2 396 057 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> La descripción de la secuencia artificial: HMG
truncado

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1578)

<400> 23

	atg gac caa ttg gtg aaa act gaa gtc acc aag aag tct ttt act gct	48
	Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala	
15	1 5 10 15	
	cct gta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc att	96
	Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile	
	20 25 30	
20	tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca tca	144
	Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser	
	35 40 45	
25	gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa agc	192
	Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser	
	50 55 60	
30	ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa tta gaa gca tta tta agt	240
	Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser	
	65 70 75 80	
35	agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg gtt	288
	Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val	
	85 90 95	
40	att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt gat	336
	Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp	
	100 105 110	
	act acg aga gcg gtt gcg gta cgt agg aag gct ctt tca att ttg gca	384
	Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala	
	115 120 125	
45	gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat gac	432
	Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Asp	
	130 135 140	
50	tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac atg	480
	Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met	
	145 150 155 160	
55	cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca tct	528
	Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr Ser	
	165 170 175	
	tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct gcc	576
	Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Ala	

ES 2 396 057 T3

	180							185							190							
5	atg	cgt	ggc	tgt	aag	gca	atc	aat	gct	ggc	ggg	ggg	gca	aca	act	gtt	624					
	Met	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr	Val						
	195						200						205									
10	tta	act	aag	gat	ggg	atg	aca	aga	ggc	cca	gta	gtc	cgt	ttc	cca	act	672					
	Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Gly	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Pro	Thr						
	210						215						220									
15	ttg	aaa	aga	tct	ggg	gcc	tgt	aag	ata	tgg	tta	gac	tca	gaa	gag	gga	720					
	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Ile	Trp	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu	Gly						
	225						230						235			240						
20	caa	aac	gca	att	aaa	aaa	gct	ttt	aac	tct	aca	tca	aga	ttt	gca	cgt	768					
	Gln	Asn	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Asn	Ser	Thr	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg						
				245						250						255						
25	ctg	caa	cat	att	caa	act	tgt	cta	gca	gga	gat	tta	ctc	ttc	atg	aga	816					
	Leu	Gln	His	Ile	Gln	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Arg						
				260						265						270						
30	ttt	aga	aca	act	act	ggg	gac	gca	atg	ggg	atg	aac	atg	att	tct	aaa	864					
	Phe	Arg	Thr	Thr	Thr	Gly	Asp	Ala	Met	Gly	Met	Asn	Met	Ile	Ser	Lys						
				275						280						285						
35	ggg	gtc	gaa	tac	tca	tta	aag	caa	atg	gta	gaa	gag	tat	ggc	tgg	gaa	912					
	Gly	Val	Glu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Gln	Met	Val	Glu	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu						
	290						295						300									
40	gat	atg	gag	gtt	gtc	tcc	gtt	tct	ggg	aac	tac	tgt	acc	gac	aaa	aaa	960					
	Asp	Met	Glu	Val	Val	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Tyr	Cys	Thr	Asp	Lys	Lys						
	305						310						315			320						
45	cca	gct	gcc	atc	aac	tgg	atc	gaa	ggg	cgt	ggg	aag	agt	gtc	gtc	gca	1008					
	Pro	Ala	Ala	Ile	Asn	Trp	Ile	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Ser	Val	Val	Ala						
				325						330						335						
50	gaa	gct	act	att	cct	ggg	gat	gtt	gtc	aga	aaa	gtg	tta	aaa	agt	gat	1056					
	Glu	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	Asp	Val	Val	Arg	Lys	Val	Leu	Lys	Ser	Asp						
				340						345						350						
55	gtt	tcc	gca	ttg	gtt	gag	ttg	aac	att	gct	aag	aac	ttg	gtt	gga	tct	1104					
	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Lys	Asn	Leu	Val	Gly	Ser						
				355						360						365						
60	gca	atg	gct	ggg	tct	gtt	ggg	gga	ttt	aac	gca	cat	gca	gct	aac	tta	1152					
	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Phe	Asn	Ala	His	Ala	Ala	Asn	Leu						
	370						375						380									
65	gtg	aca	gct	gtt	ttc	ttg	gca	tta	gga	caa	gat	cct	gca	caa	aac	gtt	1200					
	Val	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Val						
	385						390						395			400						
70	gaa	agt	tcc	aac	tgt	ata	aca	ttg	atg	aaa	gaa	gtg	gac	ggg	gat	ttg	1248					
	Glu	Ser	Ser	Asn	Cys	Ile	Thr	Leu	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Asp	Leu						
				405						410						415						

ES 2 396 057 T3

```

aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt ggt 1296
Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly
      420              425              430

5  ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt gta 1344
   Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val
      435              440              445

10 aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta gca 1392
    Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala
      450              455              460

15 aga ata gtt gcc tgt gcc gtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt gct 1440
    Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala
      465              470              475              480

20 gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac agg 1488
    Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg
      485              490              495

25 aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat ata 1536
    Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile
      500              505              510

30 aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa          1578
    Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
      515              520              525

30 <210> 24
    <211> 525
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

35 <400> 24
    Met Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr Ala
      1              5              10              15

40 Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val Ile
      20              25              30

   Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser Ser
      35              40              45

45 Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu Ser
      50              55              60

   Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser
      65              70              75              80

50 Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Val
      85              90              95

   Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly Asp
      100             105             110

55 Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Ala
      115             120             125

```

ES 2 396 057 T3

	Glu	Ala	Pro	Val	Leu	Ala	Ser	Asp	Arg	Leu	Pro	Tyr	Lys	Asn	Tyr	Asp
	130						135					140				
5	Tyr	Asp	Arg	Val	Phe	Gly	Ala	Cys	Cys	Glu	Asn	Val	Ile	Gly	Tyr	Met
	145					150					155					160
	Pro	Leu	Pro	Val	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Gly	Thr	Ser
10					165					170					175	
	Tyr	His	Ile	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Ser	Ala
				180					185					190		
15	Met	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr	Val
			195					200					205			
	Leu	Thr	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Gly	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Pro	Thr
	210						215					220				
20	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Ala	Cys	Lys	Ile	Trp	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu	Gly
	225					230					235					240
	Gln	Asn	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Phe	Asn	Ser	Thr	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg
25					245					250					255	
	Leu	Gln	His	Ile	Gln	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Arg
				260					265					270		
30	Phe	Arg	Thr	Thr	Thr	Gly	Asp	Ala	Met	Gly	Met	Asn	Met	Ile	Ser	Lys
			275					280					285			
	Gly	Val	Glu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Gln	Met	Val	Glu	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu
	290						295					300				
35	Asp	Met	Glu	Val	Val	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Tyr	Cys	Thr	Asp	Lys	Lys
	305					310					315					320
	Pro	Ala	Ala	Ile	Asn	Trp	Ile	Glu	Gly	Arg	Gly	Lys	Ser	Val	Val	Ala
40					325					330					335	
	Glu	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	Asp	Val	Val	Arg	Lys	Val	Leu	Lys	Ser	Asp
				340					345					350		
45	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Lys	Asn	Leu	Val	Gly	Ser
			355					360					365			
	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Val	Gly	Gly	Phe	Asn	Ala	His	Ala	Ala	Asn	Leu
	370						375					380				
50	Val	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Val
	385					390					395					400
	Glu	Ser	Ser	Asn	Cys	Ile	Thr	Leu	Met	Lys	Glu	Val	Asp	Gly	Asp	Leu
55				405						410					415	
	Arg	Ile	Ser	Val	Ser	Met	Pro	Ser	Ile	Glu	Val	Gly	Thr	Ile	Gly	Gly
				420					425					430		

ES 2 396 057 T3

	Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly Val	
	435 440 445	
5	Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu Ala	
	450 455 460	
	Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys Ala	
	465 470 475 480	
10	Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg	
	485 490 495	
	Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp Ile	
	500 505 510	
15	Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser	
	515 520 525	
20	<210> 25	
	<211> 1593	
	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1593)	
	<400> 25	
30	atg tct gct acc aag tca atc gtt gga gag gca ttg gaa tac gta aac 48	
	Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn	
	1 5 10 15	
	att ggt tta agt cat ttc ttg gct tta cca ttg gcc caa aga atc tct 96	
35	Ile Gly Leu Ser His Phe Leu Ala Leu Pro Leu Ala Gln Arg Ile Ser	
	20 25 30	
	ttg atc ata ata att cct ttc att tac aat att gta tgg caa tta cta 144	
40	Leu Ile Ile Ile Ile Pro Phe Ile Tyr Asn Ile Val Trp Gln Leu Leu	
	35 40 45	
	tat tct ttg aga aag gac cgt cca cct cta gtg ttt tac tgg att cca 192	
	Tyr Ser Leu Arg Lys Asp Arg Pro Pro Leu Val Phe Tyr Trp Ile Pro	
	50 55 60	
45	tgg gtc ggt agt gct gtt gtg tac ggt atg aag cca tac gag ttt ttc 240	
	Trp Val Gly Ser Ala Val Val Tyr Gly Met Lys Pro Tyr Glu Phe Phe	
	65 70 75 80	
50	gaa gaa tgt caa aag aaa tac ggt gat att ttt tca ttc gtt ttg tta 288	
	Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Gly Asp Ile Phe Ser Phe Val Leu Leu	
	85 90 95	
	gga aga gtc atg act gtg tat tta gga cca aag ggt cac gaa ttt gtc 336	
55	Gly Arg Val Met Thr Val Tyr Leu Gly Pro Lys Gly His Glu Phe Val	
	100 105 110	
	ttc aac gct aag ttg gca gat gtt tca gca gaa gct gct tac gct cat 384	

ES 2 396 057 T3

	Phe	Asn	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	
			115					120					125				
5	ttg	act	act	cca	gtt	ttc	ggg	aaa	ggg	gtt	att	tac	gat	tgt	cca	aat	432
	Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	Ile	Tyr	Asp	Cys	Pro	Asn	
			130				135					140					
10	tct	aga	ttg	atg	gag	caa	aag	aag	ttt	gtt	aag	ggg	gct	cta	acc	aaa	480
	Ser	Arg	Leu	Met	Glu	Gln	Lys	Lys	Phe	Val	Lys	Gly	Ala	Leu	Thr	Lys	
						150					155					160	
15	gaa	gcc	ttc	aag	agc	tac	gtt	cca	ttg	att	gct	gaa	gaa	gtg	tac	aag	528
	Glu	Ala	Phe	Lys	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	Glu	Val	Tyr	Lys	
					165					170					175		
	tac	ttc	aga	gac	tcc	aaa	aac	ttc	cgt	ttg	aat	gaa	aga	act	act	ggg	576
	Tyr	Phe	Arg	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Arg	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Thr	Gly	
				180					185					190			
20	act	att	gac	gtg	atg	gtt	act	caa	cct	gaa	atg	act	att	ttc	acc	gct	624
	Thr	Ile	Asp	Val	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Glu	Met	Thr	Ile	Phe	Thr	Ala	
			195					200					205				
25	tca	aga	tca	tta	ttg	ggg	aag	gaa	atg	aga	gca	aaa	ttg	gat	acc	gat	672
	Ser	Arg	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Met	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Thr	Asp	
			210				215					220					
30	ttt	gct	tac	ttg	tac	agt	gat	ttg	gat	aag	ggg	ttc	act	cca	atc	aac	720
	Phe	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asp	Lys	Gly	Phe	Thr	Pro	Ile	Asn	
			225			230				235					240		
35	ttc	gtc	ttc	cct	aac	tta	cca	ttg	gaa	cac	tat	aga	aag	aga	gat	cac	768
	Phe	Val	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Leu	Glu	His	Tyr	Arg	Lys	Arg	Asp	His	
				245					250						255		
	gct	caa	aag	gct	atc	tcc	ggg	act	tac	atg	tct	ttg	att	aag	gaa	aga	816
	Ala	Gln	Lys	Ala	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Met	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Arg	
				260				265						270			
40	aga	aag	aac	aac	gac	att	caa	gac	aga	gat	ttg	atc	gat	tcc	ttg	atg	864
	Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Met	
			275				280						285				
45	aag	aac	tct	acc	tac	aag	gat	ggg	gtg	aag	atg	act	gat	caa	gaa	atc	912
	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Met	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	
			290				295					300					
50	gct	aac	ttg	tta	att	ggg	gtc	tta	atg	ggg	ggg	caa	cat	act	tct	gct	960
	Ala	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Met	Gly	Gly	Gln	His	Thr	Ser	Ala	
			305			310				315						320	
55	gcc	act	tct	gct	tgg	att	ttg	ttg	cac	ttg	gct	gaa	aga	cca	gat	gtc	1008
	Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Ile	Leu	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Arg	Pro	Asp	Val	
					325				330						335		
	caa	caa	gaa	ttg	tac	gaa	gaa	caa	atg	cgt	gtt	ttg	gat	ggg	ggg	aag	1056
	Gln	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Met	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Gly	Lys	
				340				345						350			

ES 2 396 057 T3

```

aag gaa ttg acc tac gat tta tta caa gaa atg cca ttg ttg aac caa 1104
Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln
355 360 365

5
act att aag gaa act cta aga atg cac cat cca ttg cac tct ttg ttc 1152
Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe
370 375 380

10
cgt aag gtt atg aaa gat atg cac gtt cca aac act tct tat gtc atc 1200
Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile
385 390 395 400

15
cca gca ggt tat cac gtt ttg gtt tct cca ggt tac act cat tta aga 1248
Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg
405 410 415

20
gac gaa tac ttc cct aat gct cac caa ttc aac att cac cgt tgg aac 1296
Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn
420 425 430

25
aaa gat tct gcc tcc tct tat tcc gtc ggt gaa gaa gtc gat tac ggt 1344
Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly
435 440 445

30
ttc ggt gcc att tct aag ggt gtc agc tct cca tac tta cct ttc ggt 1392
Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly
450 455 460

35
ggt ggt aga cac aga tgt atc ggt gaa cac ttt gct tac tgt cag cta 1440
Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu
465 470 475 480

40
ggt gtt cta atg tcc att ttt atc aga aca tta aaa tgg cat tac cca 1488
Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro
485 490 495

45
gag ggt aag acc gtt cca cct cct gac ttt aca tct atg gtt act ctt 1536
Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu
500 505 510

50
cca acc ggt cca gcc aag atc atc tgg gaa aag aga aat cca gaa caa 1584
Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln
515 520 525

55
aag atc taa 1593
Lys Ile
530

<210> 26
<211> 530
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 26
Met Ser Ala Thr Lys Ser Ile Val Gly Glu Ala Leu Glu Tyr Val Asn
1 5 10 15

```

ES 2 396 057 T3

	Ile	Gly	Leu	Ser	His	Phe	Leu	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Ser	
				20					25					30			
5	Leu	Ile	Ile	Ile	Ile	Pro	Phe	Ile	Tyr	Asn	Ile	Val	Trp	Gln	Leu	Leu	
			35					40					45				
	Tyr	Ser	Leu	Arg	Lys	Asp	Arg	Pro	Pro	Leu	Val	Phe	Tyr	Trp	Ile	Pro	
		50					55					60					
10	Trp	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Gly	Met	Lys	Pro	Tyr	Glu	Phe	Phe	
	65					70				75						80	
	Glu	Glu	Cys	Gln	Lys	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ile	Phe	Ser	Phe	Val	Leu	Leu	
15					85					90					95		
	Gly	Arg	Val	Met	Thr	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Lys	Gly	His	Glu	Phe	Val	
				100					105					110			
20	Phe	Asn	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	
			115					120					125				
	Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Phe	Gly	Lys	Gly	Val	Ile	Tyr	Asp	Cys	Pro	Asn	
		130					135					140					
25	Ser	Arg	Leu	Met	Glu	Gln	Lys	Lys	Phe	Val	Lys	Gly	Ala	Leu	Thr	Lys	
	145					150					155					160	
	Glu	Ala	Phe	Lys	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	Glu	Val	Tyr	Lys	
30					165					170					175		
	Tyr	Phe	Arg	Asp	Ser	Lys	Asn	Phe	Arg	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Thr	Gly	
				180					185					190			
35	Thr	Ile	Asp	Val	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Glu	Met	Thr	Ile	Phe	Thr	Ala	
			195					200					205				
	Ser	Arg	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Met	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Thr	Asp	
		210					215					220					
40	Phe	Ala	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Asp	Lys	Gly	Phe	Thr	Pro	Ile	Asn	
	225					230					235					240	
	Phe	Val	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Leu	Glu	His	Tyr	Arg	Lys	Arg	Asp	His	
45					245					250					255		
	Ala	Gln	Lys	Ala	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Met	Ser	Leu	Ile	Lys	Glu	Arg	
				260					265					270			
50	Arg	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	Met	
			275					280					285				
	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Val	Lys	Met	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	
		290					295					300					
55	Ala	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Met	Gly	Gly	Gln	His	Thr	Ser	Ala	
	305					310					315					320	

ES 2 396 057 T3

	Ala Thr Ser Ala Trp Ile Leu Leu His Leu Ala Glu Arg Pro Asp Val	
	325 330 335	
5	Gln Gln Glu Leu Tyr Glu Glu Gln Met Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys	
	340 345 350	
	Lys Glu Leu Thr Tyr Asp Leu Leu Gln Glu Met Pro Leu Leu Asn Gln	
	355 360 365	
10	Thr Ile Lys Glu Thr Leu Arg Met His His Pro Leu His Ser Leu Phe	
	370 375 380	
	Arg Lys Val Met Lys Asp Met His Val Pro Asn Thr Ser Tyr Val Ile	
	385 390 395 400	
15	Pro Ala Gly Tyr His Val Leu Val Ser Pro Gly Tyr Thr His Leu Arg	
	405 410 415	
20	Asp Glu Tyr Phe Pro Asn Ala His Gln Phe Asn Ile His Arg Trp Asn	
	420 425 430	
	Lys Asp Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Val Gly Glu Glu Val Asp Tyr Gly	
	435 440 445	
25	Phe Gly Ala Ile Ser Lys Gly Val Ser Ser Pro Tyr Leu Pro Phe Gly	
	450 455 460	
	Gly Gly Arg His Arg Cys Ile Gly Glu His Phe Ala Tyr Cys Gln Leu	
	465 470 475 480	
30	Gly Val Leu Met Ser Ile Phe Ile Arg Thr Leu Lys Trp His Tyr Pro	
	485 490 495	
	Glu Gly Lys Thr Val Pro Pro Pro Asp Phe Thr Ser Met Val Thr Leu	
	500 505 510	
35	Pro Thr Gly Pro Ala Lys Ile Ile Trp Glu Lys Arg Asn Pro Glu Gln	
	515 520 525	
40	Lys Ile	
	530	
45	<210> 27	
	<211> 1491	
	<212> ADN	
	<213> Saccharomyces cerevisiae	
	<220>	
50	<221> CDS	
	<222> (1) .. (1491)	
	<400> 27	
55	atg tct gct gtt aac gtt gca cct gaa ttg att aat gcc gac aac aca	48
	Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr	
	1 5 10 15	
	att acc tac gat gcg att gtc atc ggt gct ggt gtt atc ggt cca tgt	96

ES 2 396 057 T3

	Ile	Thr	Tyr	Asp	Ala	Ile	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Cys	
				20					25					30			
5	gtt	gct	act	ggc	cta	gca	aga	aag	ggc	aag	aaa	gtt	ctt	atc	gta	gaa	144
	Val	Ala	Thr	Gly	Leu	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Ile	Val	Glu	
			35					40					45				
10	cgt	gac	tgg	gct	atg	cct	gat	aga	att	gtt	ggc	gaa	ttg	atg	caa	cca	192
	Arg	Asp	Trp	Ala	Met	Pro	Asp	Arg	Ile	Val	Gly	Glu	Leu	Met	Gln	Pro	
			50				55					60					
15	ggc	ggc	gtt	aga	gca	ttg	aga	agt	ctg	ggc	atg	att	caa	tct	atc	aac	240
	Gly	Gly	Val	Arg	Ala	Leu	Arg	Ser	Leu	Gly	Met	Ile	Gln	Ser	Ile	Asn	
	65					70				75						80	
	aac	atc	gaa	gca	tat	cct	gtt	acc	ggc	tat	acc	gtc	ttt	ttc	aac	ggc	288
	Asn	Ile	Glu	Ala	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Tyr	Thr	Val	Phe	Phe	Asn	Gly	
					85				90						95		
20	gaa	caa	gtt	gat	att	cca	tac	cct	tac	aag	gcc	gat	atc	cct	aaa	gtt	336
	Glu	Gln	Val	Asp	Ile	Pro	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Asp	Ile	Pro	Lys	Val	
				100					105					110			
25	gaa	aaa	ttg	aag	gac	ttg	gtc	aaa	gat	ggc	aat	gac	aag	gtc	ttg	gaa	384
	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Gly	Asn	Asp	Lys	Val	Leu	Glu	
			115					120					125				
30	gac	agc	act	att	cac	atc	aag	gat	tac	gaa	gat	gat	gaa	aga	gaa	agg	432
	Asp	Ser	Thr	Ile	His	Ile	Lys	Asp	Tyr	Glu	Asp	Asp	Glu	Arg	Glu	Arg	
			130				135					140					
35	ggc	gtt	gct	ttt	gtt	cat	ggc	aga	ttc	ttg	aac	aac	ttg	aga	aac	att	480
	Gly	Val	Ala	Phe	Val	His	Gly	Arg	Phe	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Asn	Ile	
	145					150					155					160	
	act	gct	caa	gag	cca	aat	gtt	act	aga	gtg	caa	ggc	aac	tgt	att	gag	528
	Thr	Ala	Gln	Glu	Pro	Asn	Val	Thr	Arg	Val	Gln	Gly	Asn	Cys	Ile	Glu	
					165					170					175		
40	ata	ttg	aag	gat	gaa	aag	aat	gag	gtt	gtt	ggc	gcc	aag	gtt	gac	att	576
	Ile	Leu	Lys	Asp	Glu	Lys	Asn	Glu	Val	Val	Gly	Ala	Lys	Val	Asp	Ile	
				180					185					190			
45	gat	ggc	cgt	ggc	aag	gtg	gaa	ttc	aaa	gcc	cac	ttg	aca	ttt	atc	tgt	624
	Asp	Gly	Arg	Gly	Lys	Val	Glu	Phe	Lys	Ala	His	Leu	Thr	Phe	Ile	Cys	
			195					200					205				
50	gac	ggc	atc	ttt	tca	cgt	ttc	aga	aag	gaa	ttg	cac	cca	gac	cat	gtt	672
	Asp	Gly	Ile	Phe	Ser	Arg	Phe	Arg	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Asp	His	Val	
			210				215					220					
55	cca	act	gtc	ggc	tct	tcg	ttt	gtc	ggc	atg	tct	ttg	ttc	aat	gct	aag	720
	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Phe	Val	Gly	Met	Ser	Leu	Phe	Asn	Ala	Lys	
	225					230					235					240	
	aat	cct	gct	cct	atg	cac	ggc	cac	gtt	att	ctt	ggc	agt	gat	cat	atg	768
	Asn	Pro	Ala	Pro	Met	His	Gly	His	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	His	Met	
					245					250					255		

ES 2 396 057 T3

	cca	atc	ttg	gtt	tac	caa	atc	agt	cca	gaa	gaa	aca	aga	atc	ctt	tgt	816
	Pro	Ile	Leu	Val	Tyr	Gln	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Thr	Arg	Ile	Leu	Cys	
			260						265					270			
5																	
	gct	tac	aac	tct	cca	aag	gtc	cca	gct	gat	atc	aag	agt	tgg	atg	att	864
	Ala	Tyr	Asn	Ser	Pro	Lys	Val	Pro	Ala	Asp	Ile	Lys	Ser	Trp	Met	Ile	
			275					280					285				
10																	
	aag	gat	gtc	caa	cct	ttc	att	cca	aag	agt	cta	cgt	cct	tca	ttt	gat	912
	Lys	Asp	Val	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Lys	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Asp	
		290					295					300					
15																	
	gaa	gcc	gtc	agc	caa	ggg	aaa	ttt	aga	gct	atg	cca	aac	tcc	tac	ttg	960
	Glu	Ala	Val	Ser	Gln	Gly	Lys	Phe	Arg	Ala	Met	Pro	Asn	Ser	Tyr	Leu	
	305					310					315					320	
20																	
	cca	gct	aga	caa	aac	gac	gtc	act	ggg	atg	tgt	gtt	atc	ggg	gac	gct	1008
	Pro	Ala	Arg	Gln	Asn	Asp	Val	Thr	Gly	Met	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Ala	
					325					330					335		
25																	
	cta	aat	atg	aga	cat	cca	ttg	act	ggg	ggg	ggg	atg	act	gtc	ggg	ttg	1056
	Leu	Asn	Met	Arg	His	Pro	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Met	Thr	Val	Gly	Leu	
				340					345					350			
30																	
	cat	gat	gtt	gtc	ttg	ttg	att	aag	aaa	ata	ggg	gac	cta	gac	ttc	agc	1104
	His	Asp	Val	Val	Leu	Leu	Ile	Lys	Lys	Ile	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ser	
			355					360					365				
35																	
	gac	cgt	gaa	aag	gtt	ttg	gat	gaa	tta	cta	gac	tac	cat	ttc	gaa	aga	1152
	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Tyr	His	Phe	Glu	Arg	
		370					375					380					
40																	
	aag	agt	tac	gat	tcc	gtt	att	aac	gtt	ttg	tca	gtg	gct	ttg	tat	tct	1200
	Lys	Ser	Tyr	Asp	Ser	Val	Ile	Asn	Val	Leu	Ser	Val	Ala	Leu	Tyr	Ser	
	385					390					395					400	
45																	
	ttg	ttc	gct	gct	gac	agc	gat	aac	ttg	aag	gca	tta	caa	aaa	ggg	tgt	1248
	Leu	Phe	Ala	Ala	Asp	Ser	Asp	Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Cys	
					405					410					415		
50																	
	ttc	aaa	tat	ttc	caa	aga	ggg	ggc	gat	tgt	gtc	aac	aaa	ccc	gtt	gaa	1296
	Phe	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Gly	Gly	Asp	Cys	Val	Asn	Lys	Pro	Val	Glu	
				420					425					430			
55																	
	ttt	ctg	tct	ggg	gtc	ttg	cca	aag	cct	ttg	caa	ttg	acc	agg	gtt	ttc	1344
	Phe	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	Thr	Arg	Val	Phe	
			435					440					445				
60																	
	ttc	gct	gtc	gct	ttt	tac	acc	att	tac	ttg	aac	atg	gaa	gaa	cgt	ggg	1392
	Phe	Ala	Val	Ala	Phe	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Met	Glu	Glu	Arg	Gly	
		450					455					460					
65																	
	ttc	ttg	gga	tta	cca	atg	gct	tta	ttg	gaa	ggg	att	atg	att	ttg	atc	1440
	Phe	Leu	Gly	Leu	Pro	Met	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Met	Ile	Leu	Ile	
	465					470					475					480	
70																	
	aca	gct	att	aga	gta	ttc	acc	cca	ttt	ttg	ttt	ggg	gag	ttg	att	ggg	1488

ES 2 396 057 T3

Thr Ala Ile Arg Val Phe Thr Pro Phe Leu Phe Gly Glu Leu Ile Gly
 485 490 495
 taa 1491
 5
 <210> 28
 <211> 496
 10 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 28
 15 Met Ser Ala Val Asn Val Ala Pro Glu Leu Ile Asn Ala Asp Asn Thr
 1 5 10 15
 Ile Thr Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ala Gly Val Ile Gly Pro Cys
 20 20 25 30
 Val Ala Thr Gly Leu Ala Arg Lys Gly Lys Lys Val Leu Ile Val Glu
 35 40 45
 Arg Asp Trp Ala Met Pro Asp Arg Ile Val Gly Glu Leu Met Gln Pro
 50 55 60
 25 Gly Gly Val Arg Ala Leu Arg Ser Leu Gly Met Ile Gln Ser Ile Asn
 65 70 75 80
 Asn Ile Glu Ala Tyr Pro Val Thr Gly Tyr Thr Val Phe Phe Asn Gly
 85 90 95
 30 Glu Gln Val Asp Ile Pro Tyr Pro Tyr Lys Ala Asp Ile Pro Lys Val
 100 105 110
 35 Glu Lys Leu Lys Asp Leu Val Lys Asp Gly Asn Asp Lys Val Leu Glu
 115 120 125
 Asp Ser Thr Ile His Ile Lys Asp Tyr Glu Asp Asp Glu Arg Glu Arg
 130 135 140
 40 Gly Val Ala Phe Val His Gly Arg Phe Leu Asn Asn Leu Arg Asn Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Gln Glu Pro Asn Val Thr Arg Val Gln Gly Asn Cys Ile Glu
 165 170 175
 45 Ile Leu Lys Asp Glu Lys Asn Glu Val Val Gly Ala Lys Val Asp Ile
 180 185 190
 50 Asp Gly Arg Gly Lys Val Glu Phe Lys Ala His Leu Thr Phe Ile Cys
 195 200 205
 Asp Gly Ile Phe Ser Arg Phe Arg Lys Glu Leu His Pro Asp His Val
 210 215 220
 55 Pro Thr Val Gly Ser Ser Phe Val Gly Met Ser Leu Phe Asn Ala Lys
 225 230 235 240

ES 2 396 057 T3

	Asn	Pro	Ala	Pro	Met	His	Gly	His	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	His	Met	
					245					250					255		
5	Pro	Ile	Leu	Val	Tyr	Gln	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Thr	Arg	Ile	Leu	Cys	
				260					265					270			
	Ala	Tyr	Asn	Ser	Pro	Lys	Val	Pro	Ala	Asp	Ile	Lys	Ser	Trp	Met	Ile	
			275					280					285				
10	Lys	Asp	Val	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Lys	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Asp	
		290					295					300					
	Glu	Ala	Val	Ser	Gln	Gly	Lys	Phe	Arg	Ala	Met	Pro	Asn	Ser	Tyr	Leu	
15		305				310					315					320	
	Pro	Ala	Arg	Gln	Asn	Asp	Val	Thr	Gly	Met	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Ala	
					325					330					335		
20	Leu	Asn	Met	Arg	His	Pro	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Met	Thr	Val	Gly	Leu	
				340					345					350			
	His	Asp	Val	Val	Leu	Leu	Ile	Lys	Lys	Ile	Gly	Asp	Leu	Asp	Phe	Ser	
			355					360					365				
25	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Tyr	His	Phe	Glu	Arg	
		370					375					380					
	Lys	Ser	Tyr	Asp	Ser	Val	Ile	Asn	Val	Leu	Ser	Val	Ala	Leu	Tyr	Ser	
30		385				390					395					400	
	Leu	Phe	Ala	Ala	Asp	Ser	Asp	Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Lys	Gly	Cys	
					405					410					415		
35	Phe	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Gly	Gly	Asp	Cys	Val	Asn	Lys	Pro	Val	Glu	
				420					425					430			
	Phe	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	Thr	Arg	Val	Phe	
			435					440					445				
40	Phe	Ala	Val	Ala	Phe	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Met	Glu	Glu	Arg	Gly	
		450					455					460					
	Phe	Leu	Gly	Leu	Pro	Met	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Ile	Met	Ile	Leu	Ile	
45		465				470				475						480	
	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Thr	Pro	Phe	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	
					485					490					495		
50	<210> 29																
	<211> 1335																
	<212> ADN																
	<213> Saccharomyces cerevisiae																
55	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1) .. (1335)																

ES 2 396 057 T3

<400> 29																					
	atg	gga	aag	cta	tta	caa	ttg	gca	ttg	cat	ccg	gtc	gag	atg	aag	gca					48
	Met	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Leu	Ala	Leu	His	Pro	Val	Glu	Met	Lys	Ala					
	1				5					10					15						
5																					
	gct	ttg	aag	ctg	aag	ttt	tgc	aga	aca	ccg	cta	ttc	tcc	atc	tat	gat					96
	Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	Cys	Arg	Thr	Pro	Leu	Phe	Ser	Ile	Tyr	Asp					
				20					25					30							
10																					
	cag	tcc	acg	tct	cca	tat	ctc	ttg	cac	tgt	ttc	gaa	ctg	ttg	aac	ttg					144
	Gln	Ser	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Leu	His	Cys	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu					
				35				40					45								
15																					
	acc	tcc	aga	tcg	ttt	gct	gct	gtg	atc	aga	gag	ctg	cat	cca	gaa	ttg					192
	Thr	Ser	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Val	Ile	Arg	Glu	Leu	His	Pro	Glu	Leu					
		50					55					60									
20																					
	aga	aac	tgt	gtt	act	ctc	ttt	tat	ttg	att	tta	agg	gct	ttg	gat	acc					240
	Arg	Asn	Cys	Val	Thr	Leu	Phe	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Ala	Leu	Asp	Thr					
	65					70					75					80					
25																					
	atc	gaa	gac	gat	atg	tcc	atc	gaa	cac	gat	ttg	aaa	att	gac	ttg	ttg					288
	Ile	Glu	Asp	Asp	Met	Ser	Ile	Glu	His	Asp	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Leu					
					85					90					95						
30																					
	cgt	cac	ttc	cac	gag	aaa	ttg	ttg	tta	act	aaa	tgg	agt	ttc	gac	gga					336
	Arg	His	Phe	His	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Thr	Lys	Trp	Ser	Phe	Asp	Gly					
				100				105						110							
35																					
	aat	gcc	ccc	gat	gtg	aag	gac	aga	gcc	gtt	ttg	aca	gat	ttc	gaa	tcg					384
	Asn	Ala	Pro	Asp	Val	Lys	Asp	Arg	Ala	Val	Leu	Thr	Asp	Phe	Glu	Ser					
				115				120					125								
40																					
	att	ctt	att	gaa	ttc	cac	aaa	ttg	aaa	cca	gaa	tat	caa	gaa	gtc	atc					432
	Ile	Leu	Ile	Glu	Phe	His	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile					
		130					135					140									
45																					
	aag	gag	atc	acc	gag	aaa	atg	ggg	aat	ggg	atg	gcc	gac	tac	atc	tta					480
	Lys	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys	Met	Gly	Asn	Gly	Met	Ala	Asp	Tyr	Ile	Leu					
	145					150				155						160					
50																					
	gat	gaa	aat	tac	aac	ttg	aat	ggg	ttg	caa	acc	gtc	cac	gac	tac	gac					528
	Asp	Glu	Asn	Tyr	Asn	Leu	Asn	Gly	Leu	Gln	Thr	Val	His	Asp	Tyr	Asp					
					165				170						175						
55																					
	gtg	tac	tgt	cac	tac	gta	gct	ggg	ttg	gtc	ggg	gat	ggg	ttg	acc	cgt					576
	Val	Tyr	Cys	His	Tyr	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	Gly	Leu	Thr	Arg					
				180				185					190								
60																					
	ttg	att	gtc	att	gcc	aag	ttt	gcc	aac	gaa	tct	ttg	tat	tct	aat	gag					624
	Leu	Ile	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Ala	Asn	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ser	Asn	Glu					
				195				200					205								
65																					
	caa	ttg	tat	gaa	agc	atg	ggg	ctt	ttc	cta	caa	aaa	acc	aac	atc	atc					672
	Gln	Leu	Tyr	Glu	Ser	Met	Gly	Leu	Phe	Leu	Gln	Lys	Thr	Asn	Ile	Ile					
		210					215					220									
70																					
	aga	gat	tac	aat	gaa	gat	ttg	gtc	gat	ggg	aga	tcc	ttc	tgg	ccc	aag					720

ES 2 396 057 T3

	Arg	Asp	Tyr	Asn	Glu	Asp	Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	Phe	Trp	Pro	Lys	
	225					230					235					240	
5	gaa	atc	tgg	tca	caa	tac	gct	cct	cag	ttg	aag	gac	ttc	atg	aaa	cct	768
	Glu	Ile	Trp	Ser	Gln	Tyr	Ala	Pro	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Met	Lys	Pro	
					245					250					255		
10	gaa	aac	gaa	caa	ctg	ggg	ttg	gac	tgt	ata	aac	cac	ctc	gtc	tta	aac	816
	Glu	Asn	Glu	Gln	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	Ile	Asn	His	Leu	Val	Leu	Asn	
				260					265					270			
15	gca	ttg	agt	cat	gtt	atc	gat	gtg	ttg	act	tat	ttg	gcc	ggt	atc	cac	864
	Ala	Leu	Ser	His	Val	Ile	Asp	Val	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ile	His	
			275					280					285				
20	gag	caa	tcc	act	ttc	caa	ttt	tgt	gcc	att	ccc	caa	gtt	atg	gcc	att	912
	Glu	Gln	Ser	Thr	Phe	Gln	Phe	Cys	Ala	Ile	Pro	Gln	Val	Met	Ala	Ile	
		290					295				300						
25	gca	acc	ttg	gct	ttg	gta	ttc	aac	aac	cgt	gaa	gtg	cta	cat	ggc	aat	960
	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Asn	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	His	Gly	Asn	
	305					310				315						320	
30	gta	aag	att	cgt	aag	ggt	act	acc	tgc	tat	tta	att	ttg	aaa	tca	agg	1008
	Val	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Thr	Cys	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Arg	
				325					330						335		
35	act	ttg	cgt	ggc	tgt	gtc	gag	att	ttt	gac	tat	tac	tta	cgt	gat	atc	1056
	Thr	Leu	Arg	Gly	Cys	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Asp	Ile	
				340					345					350			
40	aaa	tct	aaa	ttg	gct	gtg	caa	gat	cca	aat	ttc	tta	aaa	ttg	aac	att	1104
	Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Pro	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ile	
			355					360					365				
45	caa	atc	tcc	aag	atc	gaa	cag	ttt	atg	gaa	gaa	atg	tac	cag	gat	aaa	1152
	Gln	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Gln	Phe	Met	Glu	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	
		370					375					380					
50	tta	cct	cct	aac	gtg	aag	cca	aat	gaa	act	cca	att	ttc	ttg	aaa	gtt	1200
	Leu	Pro	Pro	Asn	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	
	385					390				395						400	
55	aaa	gaa	aga	tcc	aga	tac	gat	gat	gaa	ttg	ggt	cca	acc	caa	caa	gaa	1248
	Lys	Glu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Gln	Glu	
					405					410					415		
60	gaa	gag	tac	aag	ttc	aat	atg	ggt	tta	tct	atc	atc	ttg	tcc	gtt	ctt	1296
	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asn	Met	Val	Leu	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	
				420					425					430			
65	ctt	ggg	ttt	tat	tat	ata	tac	act	tta	cac	aga	gcg	tga				1335
	Leu	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Leu	His	Arg	Ala					
			435					440					445				
70	<210>	30															
	<211>	444															

ES 2 396 057 T3

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 30

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

ES 2 396 057 T3

	Glu	Gln	Ser	Thr	Phe	Gln	Phe	Cys	Ala	Ile	Pro	Gln	Val	Met	Ala	Ile	
	290						295					300					
5	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Phe	Asn	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	His	Gly	Asn	
	305					310					315					320	
	Val	Lys	Ile	Arg	Lys	Gly	Thr	Thr	Cys	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Arg	
					325					330					335		
10	Thr	Leu	Arg	Gly	Cys	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Asp	Ile	
				340					345						350		
	Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	Val	Gln	Asp	Pro	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ile	
			355					360					365				
15	Gln	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Gln	Phe	Met	Glu	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	
	370					375						380					
20	Leu	Pro	Pro	Asn	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Phe	Leu	Lys	Val	
	385					390					395					400	
	Lys	Glu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Gln	Glu	
					405					410					415		
25	Glu	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asn	Met	Val	Leu	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	
				420					425					430			
	Leu	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Leu	His	Arg	Ala					
		435					440										
30																	
	<210>	31															
	<211>	1929															
	<212>	ADN															
35	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(1929)															
40	<400>	31															
	atg	gac	aag	aag	aag	gat	cta	ctg	gag	aac	gaa	caa	ttt	ctc	cgc	atc	48
	Met	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Glu	Gln	Phe	Leu	Arg	Ile	
	1				5				10					15			
45	caa	aag	ctc	aac	gct	gcc	gat	gcg	ggc	aaa	aga	caa	tct	ata	aca	gtg	96
	Gln	Lys	Leu	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Gly	Lys	Arg	Gln	Ser	Ile	Thr	Val	
				20				25					30				
50	gac	gac	gag	ggc	gaa	cta	tat	ggg	tta	gac	acc	tcc	ggc	aac	tca	cca	144
	Asp	Asp	Glu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Gly	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Pro	
			35				40				45						
	gcc	aat	gaa	cac	aca	gct	acc	aca	att	aca	cag	aat	cac	agc	gtg	gtg	192
55	Ala	Asn	Glu	His	Thr	Ala	Thr	Thr	Ile	Thr	Gln	Asn	His	Ser	Val	Val	
		50				55					60						
	gcc	tca	aac	gga	gac	gtc	gca	ttc	atc	cca	gga	act	gct	acc	gaa	ggc	240

ES 2 396 057 T3

	Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Ile	Pro	Gly	Thr	Ala	Thr	Glu	Gly	
	65					70					75					80	
5	aat	aca	gag	att	gta	act	gaa	gaa	gtg	att	gag	acc	gat	gat	aac	atg	288
	Asn	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Glu	Glu	Val	Ile	Glu	Thr	Asp	Asp	Asn	Met	
					85					90					95		
10	ttc	aag	acc	cat	gtg	aag	act	tta	agc	tcc	aaa	gag	aag	gca	cgg	tat	336
	Phe	Lys	Thr	His	Val	Lys	Thr	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Lys	Ala	Arg	Tyr	
				100					105					110			
15	agg	caa	ggg	tcc	tct	aac	ttt	ata	tcg	tat	ttc	gat	gat	atg	tca	ttt	384
	Arg	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Phe	Ile	Ser	Tyr	Phe	Asp	Asp	Met	Ser	Phe	
			115					120					125				
20	gaa	cac	agg	ccc	agt	ata	tta	gat	ggg	tca	gtt	aac	gag	ccc	ttc	aag	432
	Glu	His	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Asn	Glu	Pro	Phe	Lys	
		130					135					140					
25	acc	aaa	ttc	gtg	gga	cct	act	tta	gaa	aag	gag	atc	aga	aga	agg	gag	480
	Thr	Lys	Phe	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Arg	Arg	Arg	Glu	
	145					150					155					160	
30	aaa	gag	cta	atg	gcc	atg	cgc	aaa	aat	tta	cac	cac	cgc	aag	tcc	tcc	528
	Lys	Glu	Leu	Met	Ala	Met	Arg	Lys	Asn	Leu	His	His	Arg	Lys	Ser	Ser	
					165					170					175		
35	cca	gat	gct	gtc	gac	tca	gta	ggg	aaa	aat	gat	ggc	gcc	gcc	cca	act	576
	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Val	Gly	Lys	Asn	Asp	Gly	Ala	Ala	Pro	Thr	
				180					185					190			
40	act	gtt	cca	act	gcc	gcc	acc	tca	gaa	acg	gtg	gtc	acc	gtt	gaa	acc	624
	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Val	Thr	Val	Glu	Thr	
			195					200					205				
45	acc	ata	att	tca	tcc	aat	ttc	tcc	ggg	ttg	tac	gtg	gcg	ttt	tgg	atg	672
	Thr	Ile	Ile	Ser	Ser	Asn	Phe	Ser	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala	Phe	Trp	Met	
		210					215					220					
50	gct	att	gca	ttt	ggt	gct	gtc	aag	gct	tta	ata	gac	tat	tat	tac	cag	720
	Ala	Ile	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	
	225					230					235					240	
55	cat	aat	ggt	agc	ttc	aag	gat	tcg	gag	atc	ttg	aaa	ttt	atg	act	acg	768
	His	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Asp	Ser	Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Met	Thr	Thr	
					245					250					255		
60	aat	ttg	ttc	act	gtg	gca	tcc	gta	gat	ctt	ttg	atg	tat	ttg	agc	act	816
	Asn	Leu	Phe	Thr	Val	Ala	Ser	Val	Asp	Leu	Leu	Met	Tyr	Leu	Ser	Thr	
				260					265					270			
65	tat	ttt	gtc	gtt	gga	ata	caa	tac	tta	tgc	aag	tgg	ggg	gtc	ttg	aaa	864
	Tyr	Phe	Val	Val	Gly	Ile	Gln	Tyr	Leu	Cys	Lys	Trp	Gly	Val	Leu	Lys	
			275					280					285				
70	tgg	ggc	act	acc	ggc	tgg	atc	ttc	acc	tca	att	tac	gag	ttt	ttg	ttt	912
	Trp	Gly	Thr	Thr	Gly	Trp	Ile	Phe	Thr	Ser	Ile	Tyr	Glu	Phe	Leu	Phe	
		290					295					300					

ES 2 396 057 T3

gtt atc ttc tac atg tat tta aca gaa aac atc cta aaa cta cac tgg 960
 Val Ile Phe Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Leu Lys Leu His Trp
 305 310 315 320
 5
 ctg tcc aag atc ttc ctt ttt ttg cat tct tta gtt tta ttg atg aaa 1008
 Leu Ser Lys Ile Phe Leu Phe Leu His Ser Leu Val Leu Leu Met Lys
 325 330 335
 10
 atg cat tct ttc gcc ttc tac aat ggc tat cta tgg ggt ata aag gaa 1056
 Met His Ser Phe Ala Phe Tyr Asn Gly Tyr Leu Trp Gly Ile Lys Glu
 340 345 350
 15
 gaa cta caa ttt tcc aaa agc gct ctt gcc aaa tac aag gat tct ata 1104
 Glu Leu Gln Phe Ser Lys Ser Ala Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Ser Ile
 355 360 365
 20
 aat gat cca aaa gtt att ggt gct ctt gag aaa agc tgt gag ttt tgt 1152
 Asn Asp Pro Lys Val Ile Gly Ala Leu Glu Lys Ser Cys Glu Phe Cys
 370 375 380
 25
 agt ttt gaa ttg agc tct cag tct tta agc gac caa act caa aaa ttc 1200
 Ser Phe Glu Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Asp Gln Thr Gln Lys Phe
 385 390 395 400
 30
 acc cta att tac caa att gaa tat cca aga act aag gaa atc aga tgg 1296
 Thr Leu Ile Tyr Gln Ile Glu Tyr Pro Arg Thr Lys Glu Ile Arg Trp
 420 425 430
 35
 agc tac gta tta gaa aag atc tgc gcc atc ttc ggt acc att ttc tta 1344
 Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu
 435 440 445
 40
 atg atg ata gat gct caa atc ttg atg tat cct gta gca atg aga gca 1392
 Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala
 450 455 460
 45
 ttg gct gtg cgc aat tct gaa tgg act ggt ata ttg gat aga tta ttg 1440
 Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu
 465 470 475 480
 50
 aaa tgg gtt gga ttg ctc gtt gat atc gtc cca ggg ttt atc gtg atg 1488
 Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met
 485 490 495
 55
 tac atc ttg gac ttc tat ttg att tgg gat gcc att ttg aac tgt gtg 1536
 Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val
 500 505 510
 gct gaa ttg aca aga ttt ggc gac aga tat ttc tac ggt gac tgg tgg 1584
 Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp
 515 520 525
 aat tgt gtt agt tgg gca gac ttc agt aga att tgg aac atc cca gtg 1632

ES 2 396 057 T3

	Asn	Cys	Val	Ser	Trp	Ala	Asp	Phe	Ser	Arg	Ile	Trp	Asn	Ile	Pro	Val	
	530						535					540					
5	cat	aag	ttt	ttg	tta	aga	cat	gtt	tac	cat	agt	tca	atg	agt	tca	ttc	1680
	His	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg	His	Val	Tyr	His	Ser	Ser	Met	Ser	Ser	Phe	
	545					550					555					560	
10	aaa	ttg	aac	aag	agt	caa	gca	act	ttg	atg	acc	ttt	ttc	tta	agt	tcc	1728
	Lys	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Ala	Thr	Leu	Met	Thr	Phe	Phe	Leu	Ser	Ser	
				565						570					575		
15	gtc	gtt	cat	gaa	tta	gca	atg	tac	gtt	atc	ttc	aag	aaa	ttg	agg	ttt	1776
	Val	Val	His	Glu	Leu	Ala	Met	Tyr	Val	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Arg	Phe	
				580					585					590			
20	tac	ttg	ttc	ttc	ttc	caa	atg	ctg	caa	atg	cca	tta	gta	gct	tta	aca	1824
	Tyr	Leu	Phe	Phe	Phe	Gln	Met	Leu	Gln	Met	Pro	Leu	Val	Ala	Leu	Thr	
			595					600					605				
25	aat	act	aaa	ttc	atg	agg	aac	aga	acc	ata	atc	gga	aat	gtt	att	ttc	1872
	Asn	Thr	Lys	Phe	Met	Arg	Asn	Arg	Thr	Ile	Ile	Gly	Asn	Val	Ile	Phe	
		610					615					620					
30	tg	ctc	ggt	atc	tgc	atg	gga	cca	agt	gtc	atg	tgt	acg	ttg	tac	ttg	1920
	Trp	Leu	Gly	Ile	Cys	Met	Gly	Pro	Ser	Val	Met	Cys	Thr	Leu	Tyr	Leu	
	625				630						635					640	
35	aca	ttc	taa														1929
	Thr	Phe															
40	<210>	32															
	<211>	642															
	<212>	PRT															
45	<213>	Saccharomyces cerevisiae															
50	<400>	32															
	Met	Asp	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Glu	Gln	Phe	Leu	Arg	Ile	
	1				5					10					15		
55	Gln	Lys	Leu	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Gly	Lys	Arg	Gln	Ser	Ile	Thr	Val	
				20					25					30			
60	Asp	Asp	Glu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Gly	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Pro	
			35					40					45				
65	Ala	Asn	Glu	His	Thr	Ala	Thr	Thr	Ile	Thr	Gln	Asn	His	Ser	Val	Val	
		50					55					60					
70	Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Ile	Pro	Gly	Thr	Ala	Thr	Glu	Gly	
	65					70					75					80	
75	Asn	Thr	Glu	Ile	Val	Thr	Glu	Glu	Val	Ile	Glu	Thr	Asp	Asp	Asn	Met	
				85						90					95		
80	Phe	Lys	Thr	His	Val	Lys	Thr	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Lys	Ala	Arg	Tyr	
				100					105					110			

ES 2 396 057 T3

	Arg	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Phe	Ile	Ser	Tyr	Phe	Asp	Asp	Met	Ser	Phe	
			115					120					125				
5	Glu	His	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Asn	Glu	Pro	Phe	Lys	
		130					135					140					
	Thr	Lys	Phe	Val	Gly	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Arg	Arg	Arg	Glu	
	145					150					155					160	
10	Lys	Glu	Leu	Met	Ala	Met	Arg	Lys	Asn	Leu	His	His	Arg	Lys	Ser	Ser	
					165					170					175		
	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Val	Gly	Lys	Asn	Asp	Gly	Ala	Ala	Pro	Thr	
				180					185					190			
15	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Val	Thr	Val	Glu	Thr	
		195						200					205				
	Thr	Ile	Ile	Ser	Ser	Asn	Phe	Ser	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala	Phe	Trp	Met	
20		210					215					220					
	Ala	Ile	Ala	Phe	Gly	Ala	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	
	225					230					235					240	
25	His	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Asp	Ser	Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Met	Thr	Thr	
					245					250					255		
	Asn	Leu	Phe	Thr	Val	Ala	Ser	Val	Asp	Leu	Leu	Met	Tyr	Leu	Ser	Thr	
				260					265					270			
30	Tyr	Phe	Val	Val	Gly	Ile	Gln	Tyr	Leu	Cys	Lys	Trp	Gly	Val	Leu	Lys	
		275						280					285				
	Trp	Gly	Thr	Thr	Gly	Trp	Ile	Phe	Thr	Ser	Ile	Tyr	Glu	Phe	Leu	Phe	
35		290					295					300					
	Val	Ile	Phe	Tyr	Met	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Leu	Lys	Leu	His	Trp	
	305					310					315					320	
40	Leu	Ser	Lys	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	His	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Met	Lys	
					325					330					335		
	Met	His	Ser	Phe	Ala	Phe	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Leu	Trp	Gly	Ile	Lys	Glu	
				340					345					350			
45	Glu	Leu	Gln	Phe	Ser	Lys	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Tyr	Lys	Asp	Ser	Ile	
			355					360					365				
	Asn	Asp	Pro	Lys	Val	Ile	Gly	Ala	Leu	Glu	Lys	Ser	Cys	Glu	Phe	Cys	
50		370					375					380					
	Ser	Phe	Glu	Leu	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln	Thr	Gln	Lys	Phe	
	385					390					395					400	
55	Pro	Asn	Asn	Ile	Ser	Ala	Lys	Ser	Phe	Phe	Trp	Phe	Thr	Met	Phe	Pro	
					405					410					415		
	Thr	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ile	Glu	Tyr	Pro	Arg	Thr	Lys	Glu	Ile	Arg	Trp	

ES 2 396 057 T3

	420		425		430
	Ser Tyr Val Leu Glu Lys Ile Cys Ala Ile Phe Gly Thr Ile Phe Leu				
	435		440		445
5	Met Met Ile Asp Ala Gln Ile Leu Met Tyr Pro Val Ala Met Arg Ala				
	450		455		460
10	Leu Ala Val Arg Asn Ser Glu Trp Thr Gly Ile Leu Asp Arg Leu Leu				
	465		470		475
	Lys Trp Val Gly Leu Leu Val Asp Ile Val Pro Gly Phe Ile Val Met				
		485		490	495
15	Tyr Ile Leu Asp Phe Tyr Leu Ile Trp Asp Ala Ile Leu Asn Cys Val				
		500		505	510
	Ala Glu Leu Thr Arg Phe Gly Asp Arg Tyr Phe Tyr Gly Asp Trp Trp				
		515		520	525
20	Asn Cys Val Ser Trp Ala Asp Phe Ser Arg Ile Trp Asn Ile Pro Val				
		530		535	540
25	His Lys Phe Leu Leu Arg His Val Tyr His Ser Ser Met Ser Ser Phe				
		545		550	555
	Lys Leu Asn Lys Ser Gln Ala Thr Leu Met Thr Phe Phe Leu Ser Ser				
		565		570	575
30	Val Val His Glu Leu Ala Met Tyr Val Ile Phe Lys Lys Leu Arg Phe				
		580		585	590
	Tyr Leu Phe Phe Phe Gln Met Leu Gln Met Pro Leu Val Ala Leu Thr				
		595		600	605
35	Asn Thr Lys Phe Met Arg Asn Arg Thr Ile Ile Gly Asn Val Ile Phe				
		610		615	620
40	Trp Leu Gly Ile Cys Met Gly Pro Ser Val Met Cys Thr Leu Tyr Leu				
		625		630	635
	Thr Phe				
45	<210> 33				
	<211> 60				
	<212> ADN				
	<213> Secuencia artificial				
50	<220>				
	<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador				
	<220>				
	<221> primer_bind				
55	<222> (1)..(60)				
	<400> 33				
	atgtcgaaag ctacatataa ggaacgtgct gcattctcatc ccagctgaag cttcgctacgc 60				

5 <210> 34
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 10 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(62)

 15 <400> 34
 ttagtttttgc tggccgcatac ttctcaaata tgcttcccag gcataggcca ctagtggatc 60
 tg 62

 20 <210> 35
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

 <220>
 30 <221> primer_bind
 <222> (1)..(60)

 <400> 35
 35 gaatactcag gtatcgtaag atgcaagagt tcgaatctct ccagctgaag cttcgtacgc 60

 <210> 36
 <211> 62
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

 <220>
 45 <221> primer_bind
 <222> (1)..(62)

 <400> 36
 50 tctaccctat gaacatattc cattttgtaa tttcgtgtcg gcataggcca ctagtggatc 60
 tg 62

 55 <210> 37
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 396 057 T3

```

<220>
<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

5  <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(60)

    <400> 37
10  atgacagagc agaaagccct agtaaagcgt attacaaatg ccagctgaag cttcgtacgc 60

    <210> 38
    <211> 62
15  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
20  <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(62)

25  <400> 38
    ctacataaga acacctttgg tggaggggaac atcgttggta gcataggcca ctagtggatc 60
    tg                                                62

30  <210> 39
    <211> 60
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial
35  <220>
    <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

    <220>
40  <221> primer_bind
    <222> (1)..(60)

    <400> 39
45  atgagtgaag cagaattgag aaaaagacag gcccaattca ccagctgaag cttcgtacgc 60

    <210> 40
    <211> 62
    <212> ADN
50  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

55  <220>
    <221> primer_bind
    <222> (1)..(62)

```

ES 2 396 057 T3

```

<400> 40
ttattgagtt gcttcttggg aagtttggga gggggtttcg gcataggcca ctagtggatc 60
tg                                                                                      62
5

<210> 41
<211> 60
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

15 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(60)

<400> 41
20 atgagttctg tcgcagaaaa tataatacaa catgccactc ccagctgaag cttcgtacgc 60

<210> 42
<211> 62
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
30

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(62)

35 <400> 42
ttattcgaag acttctccag taattgggtc tctctttttg gcataggcca ctagtggatc 60
tg                                                                                      62
40

<210> 43
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45

<220>
<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

<220>
50 <221> primer_bind
<222> (1)..(33)

<400> 43
55 ctgcggccgc aacatgacca ccaatacggc ccc                                                                                      33

<210> 44
<211> 27

```


<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(27)
 10 <400> 44
 ttctcgagtc tttagttatg cttgctc 27
 <210> 45
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 <220>
 <221> primer_bind
 25 <222> (1)..(33)
 <400> 45
 ctgcggccgc aagatggacc tggttctcag tgc 33
 <210> 46
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 <220>
 <221> primer_bind
 40 <222> (1)..(29)
 <400> 46
 ttctcgagct acttattctt tgtaaactc 29
 <210> 47
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 55 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(32)

ES 2 396 057 T3

<400> 47
ctgcggccgc aagatggagc ccgccgtgtc gc 32

5 <210> 48
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

<220>
<221> primer_bind
15 <222> (1)..(28)

<400> 48
aactcgagtc agtgccttgc cgccttgc 28

20 <210> 49
<211> 1833
<212> ADN
<213> Saccharomyces cerevisiae

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1833)

30 <400> 49
atg acg gag act aag gat ttg ttg caa gac gaa gag ttt ctt aag atc 48
Met Thr Glu Thr Lys Asp Leu Leu Gln Asp Glu Glu Phe Leu Lys Ile
1 5 10 15

35 cgc aga ctc aat tcc gca gaa gcc aac aaa cgg cat tcg gtc acg tac 96
Arg Arg Leu Asn Ser Ala Glu Ala Asn Lys Arg His Ser Val Thr Tyr
20 25 30

40 gat aac gtg atc ctg cca cag gag tcc atg gag gtt tcg cca cgg tcg 144
Asp Asn Val Ile Leu Pro Gln Glu Ser Met Glu Val Ser Pro Arg Ser
35 40 45

45 tct acc acg tcg ctg gtg gag cca gtg gag tcg act gaa gga gtg gag 192
Ser Thr Thr Ser Leu Val Glu Pro Val Glu Ser Thr Glu Gly Val Glu
50 55 60

50 tcg act gag gcg gaa cgt gtg gca ggg aag cag gag cag gag gag gag 240
Ser Thr Glu Ala Glu Arg Val Ala Gly Lys Gln Glu Gln Glu Glu Glu
65 70 75 80

55 tac cct gtg gac gcc cac atg caa aag tac ctt tca cac ctg aag agc 288
Tyr Pro Val Asp Ala His Met Gln Lys Tyr Leu Ser His Leu Lys Ser
85 90 95

60 aag tct cgg tcg agg ttc cac cga aag gat gct agc aag tat gtg tcg 336
Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser
100 105 110

ES 2 396 057 T3

	ttt	ttt	ggg	gac	gtg	agt	ttt	gat	cct	cgc	ccc	acg	ctc	ctg	gac	agc	384
	Phe	Phe	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asp	Ser	
			115					120					125				
5	gcc	atc	aac	gtg	ccc	ttc	cag	acg	act	ttc	aaa	ggt	ccg	gtg	ctg	gag	432
	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Phe	Gln	Thr	Thr	Phe	Lys	Gly	Pro	Val	Leu	Glu	
		130					135					140					
10	aaa	cag	ctc	aaa	aat	tta	cag	ttg	aca	aag	acc	aag	acc	aag	gcc	acg	480
	Lys	Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln	Leu	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ala	Thr	
	145					150					155					160	
15	gtg	aag	act	acg	gtg	aag	act	acg	gag	aaa	acg	gac	aag	gca	gat	gcc	528
	Val	Lys	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Thr	Glu	Lys	Thr	Asp	Lys	Ala	Asp	Ala	
					165					170					175		
20	ccc	cca	gga	gaa	aaa	ctg	gag	tcg	aac	ttt	tca	ggg	atc	tac	gtg	ttc	576
	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Asn	Phe	Ser	Gly	Ile	Tyr	Val	Phe	
				180					185					190			
25	gca	tgg	atg	ttc	ttg	ggc	tgg	ata	gcc	atc	agg	tgc	tgc	aca	gat	tac	624
	Ala	Trp	Met	Phe	Leu	Gly	Trp	Ile	Ala	Ile	Arg	Cys	Cys	Thr	Asp	Tyr	
		195					200					205					
30	tat	gcg	tcg	tac	ggc	agt	gca	tgg	aat	aag	ctg	gaa	atc	gtg	cag	tac	672
	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Trp	Asn	Lys	Leu	Glu	Ile	Val	Gln	Tyr	
		210					215					220					
35	atg	aca	acg	gac	ttg	ttc	acg	atc	gca	atg	ttg	gac	ttg	gca	atg	ttc	720
	Met	Thr	Thr	Asp	Leu	Phe	Thr	Ile	Ala	Met	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Phe	
	225					230					235					240	
40	ctg	tgc	act	ttc	ttc	gtg	gtt	ttc	gtg	cac	tgg	ctg	gtg	aaa	aag	cgg	768
	Leu	Cys	Thr	Phe	Phe	Val	Val	Phe	Val	His	Trp	Leu	Val	Lys	Lys	Arg	
				245						250					255		
45	atc	atc	aac	tgg	aag	tgg	act	ggg	ttc	gtt	gca	gtg	agc	atc	ttc	gag	816
	Ile	Ile	Asn	Trp	Lys	Trp	Thr	Gly	Phe	Val	Ala	Val	Ser	Ile	Phe	Glu	
			260					265					270				
50	ttg	gct	ttc	atc	ccc	gtg	acg	ttc	ccc	att	tac	gtc	tac	tac	ttt	gat	864
	Leu	Ala	Phe	Ile	Pro	Val	Thr	Phe	Pro	Ile	Tyr	Val	Tyr	Tyr	Phe	Asp	
		275					280					285					
55	ttc	aac	tgg	gtc	acg	aga	atc	ttc	ctg	ttc	ctg	cac	tcc	gtg	gtg	ttt	912
	Phe	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	His	Ser	Val	Val	Phe	
		290					295					300					
60	gtt	atg	aag	agc	cac	tcg	ttt	gcc	ttt	tac	aac	ggg	tat	ctt	tgg	gac	960
	Val	Met	Lys	Ser	His	Ser	Phe	Ala	Phe	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Leu	Trp	Asp	
	305					310					315					320	
65	ata	aag	cag	gaa	ctc	gag	tac	tct	tcc	aaa	cag	ttg	caa	aaa	tac	aag	1008
	Ile	Lys	Gln	Glu	Leu	Glu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Gln	Leu	Gln	Lys	Tyr	Lys	
				325						330					335		
70	gaa	tct	ttg	tcc	cca	gag	acc	cgc	gag	att	ctg	caa	aaa	agt	tgc	gac	1056
	Glu	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ser	Cys	Asp	

ES 2 396 057 T3

				340				345				350						
5	ttt	tgc	ctt	ttc	gaa	ttg	aac	tac	cag	acc	aag	gat	aac	gac	ttc	ccc	1104	
	Phe	Cys	Leu	Phe	Glu	Leu	Asn	Tyr	Gln	Thr	Lys	Asp	Asn	Asp	Phe	Pro		
			355					360					365					
10	aac	aac	atc	agt	tgc	agc	aat	ttc	ttc	atg	ttc	tgt	ttg	ttc	ccc	gtc	1152	
	Asn	Asn	Ile	Ser	Cys	Ser	Asn	Phe	Phe	Met	Phe	Cys	Leu	Phe	Pro	Val		
		370					375					380						
15	ctc	gtg	tac	cag	atc	aac	tac	cca	aga	acg	tcg	cgc	atc	aga	tgg	agg	1200	
	Leu	Val	Tyr	Gln	Ile	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Ser	Arg	Ile	Arg	Trp	Arg		
	385					390					395				400			
20	tat	gtg	ttg	gag	aag	gtg	tgc	gcc	atc	att	ggc	acc	atc	ttc	ctc	atg	1248	
	Tyr	Val	Leu	Glu	Lys	Val	Cys	Ala	Ile	Ile	Gly	Thr	Ile	Phe	Leu	Met		
					405					410					415			
25	atg	gtc	acg	gca	cag	ttc	ttc	atg	cac	ccg	gtg	gcc	atg	cgc	tgt	atc	1296	
	Met	Val	Thr	Ala	Gln	Phe	Phe	Met	His	Pro	Val	Ala	Met	Arg	Cys	Ile		
				420					425					430				
30	cag	ttc	cac	aac	acg	ccc	acc	ttc	ggc	ggc	tgg	atc	ccc	gcc	acg	caa	1344	
	Gln	Phe	His	Asn	Thr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Trp	Ile	Pro	Ala	Thr	Gln		
			435					440					445					
35	gag	tgg	ttc	cac	ctg	ctc	ttc	gac	atg	att	ccg	ggc	ttc	act	gtt	ctg	1392	
	Glu	Trp	Phe	His	Leu	Leu	Phe	Asp	Met	Ile	Pro	Gly	Phe	Thr	Val	Leu		
		450					455					460						
40	tac	atg	ctc	acg	ttt	tac	atg	ata	tgg	gac	gct	tta	ttg	aat	tgc	gtg	1440	
	Tyr	Met	Leu	Thr	Phe	Tyr	Met	Ile	Trp	Asp	Ala	Leu	Leu	Asn	Cys	Val		
	465					470					475					480		
45	gcg	gag	ttg	acc	agg	ttt	gcg	gac	aga	tat	ttc	tac	ggc	gac	tgg	tgg	1488	
	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Phe	Ala	Asp	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Asp	Trp	Trp		
				485						490					495			
50	aat	tgc	gtt	tcg	ttt	gaa	gag	ttt	agc	aga	atc	tgg	aac	gtc	ccc	gtt	1536	
	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Ser	Arg	Ile	Trp	Asn	Val	Pro	Val		
				500					505					510				
55	cac	aaa	ttt	tta	cta	aga	cac	gtg	tac	cac	agc	tcc	atg	ggc	gca	ttg	1584	
	His	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg	His	Val	Tyr	His	Ser	Ser	Met	Gly	Ala	Leu		
			515					520					525					
60	cat	ttg	agc	aag	agc	caa	gct	aca	tta	ttt	act	ttt	ttc	ttg	agt	gcc	1632	
	His	Leu	Ser	Lys	Ser	Gln	Ala	Thr	Leu	Phe	Thr	Phe	Phe	Leu	Ser	Ala		
		530					535					540						
65	gtg	ttc	cac	gaa	atg	gcc	atg	ttc	gcc	att	ttc	aga	agg	gtt	aga	gga	1680	

ES 2 396 057 T3

```

aac acc aag ttt cta cgg gca aga ccg cag ttg tcc aac gtt gtc ttt 1776
Asn Thr Lys Phe Leu Arg Ala Arg Pro Gln Leu Ser Asn Val Val Phe
      580                      585                      590

5   tcg ttt ggt gtc tgt tca ggg ccc agt atc att atg acg ttg tac ctg 1824
    Ser Phe Gly Val Cys Ser Gly Pro Ser Ile Ile Met Thr Leu Tyr Leu
      595                      600                      605

acc tta tga
10  Thr Leu
    610

<210> 50
15  <211> 610
    <212> PRT
    <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 50
20  Met Thr Glu Thr Lys Asp Leu Leu Gln Asp Glu Glu Phe Leu Lys Ile
    1                      5                      10                      15

    Arg Arg Leu Asn Ser Ala Glu Ala Asn Lys Arg His Ser Val Thr Tyr
      20                      25                      30

25  Asp Asn Val Ile Leu Pro Gln Glu Ser Met Glu Val Ser Pro Arg Ser
    35                      40                      45

30  Ser Thr Thr Ser Leu Val Glu Pro Val Glu Ser Thr Glu Gly Val Glu
    50                      55                      60

    Ser Thr Glu Ala Glu Arg Val Ala Gly Lys Gln Glu Gln Glu Glu Glu
    65                      70                      75                      80

35  Tyr Pro Val Asp Ala His Met Gln Lys Tyr Leu Ser His Leu Lys Ser
    85                      90                      95

    Lys Ser Arg Ser Arg Phe His Arg Lys Asp Ala Ser Lys Tyr Val Ser
    100                      105                      110

40  Phe Phe Gly Asp Val Ser Phe Asp Pro Arg Pro Thr Leu Leu Asp Ser
    115                      120                      125

    Ala Ile Asn Val Pro Phe Gln Thr Thr Phe Lys Gly Pro Val Leu Glu
45  130                      135                      140

    Lys Gln Leu Lys Asn Leu Gln Leu Thr Lys Thr Lys Thr Lys Ala Thr
    145                      150                      155                      160

50  Val Lys Thr Thr Val Lys Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Ala Asp Ala
    165                      170                      175

    Pro Pro Gly Glu Lys Leu Glu Ser Asn Phe Ser Gly Ile Tyr Val Phe
    180                      185                      190

55  Ala Trp Met Phe Leu Gly Trp Ile Ala Ile Arg Cys Cys Thr Asp Tyr
    195                      200                      205

```

ES 2 396 057 T3

	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ala	Trp	Asn	Lys	Leu	Glu	Ile	Val	Gln	Tyr	
	210						215					220					
5	Met	Thr	Thr	Asp	Leu	Phe	Thr	Ile	Ala	Met	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Phe	
	225				230						235					240	
	Leu	Cys	Thr	Phe	Phe	Val	Val	Phe	Val	His	Trp	Leu	Val	Lys	Lys	Arg	
					245					250					255		
10	Ile	Ile	Asn	Trp	Lys	Trp	Thr	Gly	Phe	Val	Ala	Val	Ser	Ile	Phe	Glu	
				260					265					270			
	Leu	Ala	Phe	Ile	Pro	Val	Thr	Phe	Pro	Ile	Tyr	Val	Tyr	Tyr	Phe	Asp	
			275					280					285				
15	Phe	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe	Leu	His	Ser	Val	Val	Phe	
	290						295					300					
	Val	Met	Lys	Ser	His	Ser	Phe	Ala	Phe	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Leu	Trp	Asp	
20	305					310					315					320	
	Ile	Lys	Gln	Glu	Leu	Glu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Gln	Leu	Gln	Lys	Tyr	Lys	
					325					330					335		
25	Glu	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ser	Cys	Asp	
				340					345					350			
	Phe	Cys	Leu	Phe	Glu	Leu	Asn	Tyr	Gln	Thr	Lys	Asp	Asn	Asp	Phe	Pro	
			355					360					365				
30	Asn	Asn	Ile	Ser	Cys	Ser	Asn	Phe	Phe	Met	Phe	Cys	Leu	Phe	Pro	Val	
	370						375					380					
	Leu	Val	Tyr	Gln	Ile	Asn	Tyr	Pro	Arg	Thr	Ser	Arg	Ile	Arg	Trp	Arg	
35	385					390					395					400	
	Tyr	Val	Leu	Glu	Lys	Val	Cys	Ala	Ile	Ile	Gly	Thr	Ile	Phe	Leu	Met	
					405					410					415		
40	Met	Val	Thr	Ala	Gln	Phe	Phe	Met	His	Pro	Val	Ala	Met	Arg	Cys	Ile	
				420					425					430			
	Gln	Phe	His	Asn	Thr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Trp	Ile	Pro	Ala	Thr	Gln	
			435					440					445				
45	Glu	Trp	Phe	His	Leu	Leu	Phe	Asp	Met	Ile	Pro	Gly	Phe	Thr	Val	Leu	
	450						455					460					
	Tyr	Met	Leu	Thr	Phe	Tyr	Met	Ile	Trp	Asp	Ala	Leu	Leu	Asn	Cys	Val	
50	465					470					475					480	
	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Phe	Ala	Asp	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Asp	Trp	Trp	
					485					490					495		
55	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Ser	Arg	Ile	Trp	Asn	Val	Pro	Val	
				500					505					510			
	His	Lys	Phe	Leu	Leu	Arg	His	Val	Tyr	His	Ser	Ser	Met	Gly	Ala	Leu	

ES 2 396 057 T3

	515	520	525	
	His Leu Ser Lys Ser Gln Ala Thr Leu Phe Thr Phe Phe Leu Ser Ala			
	530	535	540	
5	Val Phe His Glu Met Ala Met Phe Ala Ile Phe Arg Arg Val Arg Gly			
	545	550	555	560
10	Tyr Leu Phe Met Phe Gln Leu Ser Gln Phe Val Trp Thr Ala Leu Ser			
	565	570	575	
	Asn Thr Lys Phe Leu Arg Ala Arg Pro Gln Leu Ser Asn Val Val Phe			
	580	585	590	
15	Ser Phe Gly Val Cys Ser Gly Pro Ser Ile Ile Met Thr Leu Tyr Leu			
	595	600	605	
20	Thr Leu			
	610			
	<210> 51			
	<211> 33			
	<212> ADN			
25	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador			
30	<220>			
	<221> primer_bind			
	<222> (1)..(33)			
	<400> 51			
35	ctgcggccgc atcatgtctg ctgttaacgt tgc			33
	<210> 52			
	<211> 30			
40	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador			
45	<220>			
	<221> primer_bind			
	<222> (1)..(30)			
	<400> 52			
50	ttctcgagtt aaccaatcaa ctcaccaaac			30
	<210> 53			
55	<211> 35			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			

<220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 <220>
 5 <221> primer_bind
 <222> (1)..(35)
 <400> 53
 ctgcggccgc aggatgtctg ctaccaagtc aatcg 35
 10
 <210> 54
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 20 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(34)
 <400> 54
 25 atctcgagct tagatctttt gttctggatt tctc 34
 <210> 55
 <211> 32
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 35 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(32)
 <400> 55
 40 ctgcggccgc accatgaagt ttttccact cc 32
 <210> 56
 45 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(33)
 55 <400> 56
 ttctcgagtt agaacttttt gttttgcaac aag 33

<210> 57
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(35)
 10
 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

 <400> 57
 15 ctgcggccgc aatatggatt tggctcttaga agtcg 35

 <210> 58
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador
 25
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(31)
 30 <400> 58
 aactcgagtc agttgttctt cttggtatatt g 31

 <210> 59
 35 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(34)
 45
 <400> 59
 ctgcggccgc actatggcaa aggataatag tgag 34

 <210> 60
 50 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> La descripción de la secuencia artificial: iniciador

 <220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(32)

<400> 60

5 ttctcgagct agaaaacata aggaataaag ac

32

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la fabricación de 7-dehidrocolesterol mediante el cultivo de organismos que, frente al tipo silvestre, presentan una actividad aumentada de la $\Delta 24$ -reductasa y de la actividad de la HMG-CoA-reductasa, así como que presentan una actividad aumentada de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa y de la $\Delta 5$ -desaturasa, o una actividad aumentada de la escualeno epoxidasa.
5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorporan en el organismo uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 2 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 2, y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa.
15
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 1.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la $\Delta 5$ -desaturasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 5$ -desaturasa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorporan en el organismo uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 4 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 4, y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 5$ -desaturasa.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 3.
30
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 24$ -reductasa.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorporan en el organismo uno o varios ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa.
35
12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 6 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 6, y que presentan la propiedad enzimática de una $\Delta 24$ -reductasa.
40
13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 5.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque los organismos presentan frente al tipo silvestre también una actividad reducida de al menos una de las actividades seleccionada del grupo de la actividad de la C24-metiltransferasa y la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa.
- 5 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque los organismos presentan respecto al tipo silvestre una actividad reducida de la C24-metiltransferasa y una actividad reducida de la $\Delta 22$ -desaturasa.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 o 15, caracterizado porque, para la reducción de la actividad de la C24-metiltransferasa, se reduce respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una C24-metiltransferasa.
- 10 17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque se utiliza un organismo que no presenta ningún gen funcional de C24-metiltransferasa.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado porque, para la reducción de la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa, se reduce respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una $\Delta 22$ -desaturasa.
- 15 19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque se utiliza un organismo que no presenta ningún gen funcional de $\Delta 22$ -desaturasa.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque los organismos presentan frente al tipo silvestre también una actividad aumentada de al menos una de las actividades seleccionada del grupo de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno sintetasa y la actividad de la esterol-aciltransferasa.
- 20 21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque los organismos presentan también respecto al tipo silvestre una actividad aumentada de la lanosterol-C14-demetilasa.
22. Procedimiento según una de las reivindicaciones 20 o 21, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una lanosterol-C14-demetilasa.
- 25 23. Procedimiento según la reivindicación 22, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorporan en el organismo uno o varios ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa.
24. Procedimiento según la reivindicación 23, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 8 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 8, y que presentan la propiedad enzimática de una lanosterol-C14-demetilasa.
- 30 25. Procedimiento según la reivindicación 24, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 7.
26. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la HMG-CoA-reductasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa.
- 35 27. Procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorpora en el organismo un constructo de ácidos nucleicos que contiene un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa, cuya expresión en el organismo, comparada con el tipo silvestre, está sujeta a una regulación reducida.
- 40 28. Procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque el constructo de ácidos nucleicos contiene un promotor que, en comparación con el promotor del tipo silvestre, está sujeto en el organismo a una regulación reducida.

29. Procedimiento según una de las reivindicaciones 27 o 28, caracterizado porque como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa se utiliza un ácido nucleico cuya expresión en el organismo, comparada con el ácido nucleico ortólogo propio del organismo, está sujeta a una regulación reducida.
- 5 30. Procedimiento según la reivindicación 29, caracterizado porque como ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa se utiliza un ácido nucleico que codifica el área catalítica de la HMG-CoA-reductasa.
- 10 31. Procedimiento según la reivindicación 30, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 10 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 10, y que presentan la propiedad enzimática de una HMG-CoA-reductasa.
32. Procedimiento según la reivindicación 31, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 9.
33. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 32, caracterizado porque se utiliza un organismo que presenta frente al tipo silvestre también una actividad aumentada de la escualeno epoxidasa.
- 15 34. Procedimiento según la reivindicación 33, caracterizado porque, para el aumento de la actividad de la escualeno epoxidasa, se aumenta respecto al tipo silvestre la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una escualeno epoxidasa.
35. Procedimiento según la reivindicación 34, caracterizado porque, para el aumento de la expresión génica, se incorporan en el organismo uno o varios ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa.
- 20 36. Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque se incorporan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. nº 12 o una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de aminoácidos, que presentan una identidad de al menos el 30% en el nivel de aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. nº 12, y que presentan la propiedad enzimática de una escualeno epoxidasa.
- 25 37. Procedimiento según la reivindicación 36, caracterizado porque se incorpora un ácido nucleico que contiene la secuencia SEQ. ID. nº 11.
38. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 38, caracterizado porque como organismo se utiliza levadura.
39. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 38, caracterizado porque después del cultivo se recolecta el organismo y, a continuación, se aísla 7-dehidrocolesterol del organismo.
- 30 40. Constructo de ácidos nucleicos, que contiene a) al menos un ácido nucleico que codifica una $\Delta 24$ -reductasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos, b) al menos un ácido nucleico que codifica una HMG-CoA-reductasa, y bien c1) al menos un ácido nucleico que codifica una $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerasa y un ácido nucleico que codifica una $\Delta 5$ -desaturasa, o c2) un ácido nucleico que codifica una escualeno epoxidasa, en donde los componentes b), así como c1) o c2) están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.
- 35 41. Constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 40, que contiene al menos un ácido nucleico seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.
- 40 42. Combinación de constructos de ácidos nucleicos, en donde la combinación abarca al menos un constructo de ácidos nucleicos seleccionado del grupo A a C

- A constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -isomerasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos,
- 5 B constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos y
- C constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos, y al menos un constructo de ácidos nucleicos, seleccionado del grupo D a H
- 10 D constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos,
- 15 E constructo de ácidos nucleicos, que contiene ácidos nucleicos que contienen una lanosterol-C14-demetilasa, que están vinculadas funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos,
- F constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos,
- 20 G constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos,
- 25 H constructo de ácidos nucleicos que contiene ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa, que están vinculados funcionalmente con una o varias señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en organismos, en donde los grupos C y D, así como A y B por un lado o F por otro lado están incluidos obligatoriamente.
43. Constructos de ácidos nucleicos o combinación de constructos de ácidos nucleicos según una de las reivindicaciones 40 a 42, caracterizados porque las señales de regulación contienen uno o varios promotores y uno o varios terminadores que garantizan la transcripción y la traducción en organismos.
- 30 44. Constructos de ácidos nucleicos o combinación de constructos de ácidos nucleicos según la reivindicación 43, caracterizados porque se utilizan las señales de regulación que garantizan la transcripción y la traducción en levaduras.
- 35 45. Organismo genéticamente modificado, en donde la modificación genética aumenta al menos la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa y la actividad de la HMG-CoA-reductasa frente a un tipo silvestre, en donde el aumento de la actividad de la $\Delta 24$ -reductasa se produce frente al tipo silvestre mediante el aumento de la expresión génica de al menos un ácido nucleico que codifica una $\Delta 24$ -reductasa, en donde la modificación genética aumenta también la actividad de la escualeno epoxidasa o en donde el organismo contiene dos o más ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 8\text{-}\Delta 7$ -isomerasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 5$ -desaturasa.
46. Organismo genéticamente modificado según la reivindicación 45, caracterizado porque el organismo contiene dos o más ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 24$ -reductasa.
- 40 47. Organismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 45 a 46, caracterizado porque la modificación genética reduce también respecto a un tipo silvestre al menos una de las actividades seleccionada del grupo de la actividad de la C24-metiltransferasa y la actividad de la $\Delta 22$ -desaturasa.
48. Organismo genéticamente modificado según la reivindicación 47, caracterizado porque se produce respecto al tipo silvestre la reducción de al menos una de las actividades mediante la reducción de la expresión génica

de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una C24-metiltransferasa y ácidos nucleicos que codifican una $\Delta 22$ -desaturasa.

49. Organismo genéticamente modificado según la reivindicación 48, caracterizado porque el organismo no presenta ningún gen funcional de la C24-metiltransferasa y/o gen de la $\Delta 22$ -desaturasa.
- 5 50. Organismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado porque la modificación genética aumenta también respecto a un tipo silvestre al menos una de las actividades seleccionada del grupo de la actividad de la lanosterol-C14-demetilasa, la actividad de la escualeno sintetasa y la actividad de la esterol-aciltransferasa.
- 10 51. Organismo genéticamente modificado según la reivindicación 50, caracterizado porque se produce respecto al tipo silvestre el aumento de al menos una de las actividades mediante el aumento de la expresión génica de al menos un ácido nucleico, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa, ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.
- 15 52. Organismo genéticamente modificado según la reivindicación 51, caracterizado porque el organismo contiene dos o más ácidos nucleicos que codifican una HMG-CoA-reductasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una lanosterol-C14-demetilasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una escualeno epoxidasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una escualeno sintetasa y/o dos o más ácidos nucleicos que codifican una esterol-aciltransferasa.
- 20 53. Organismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 45 a 52, caracterizado porque el organismo genéticamente modificado presenta frente al tipo silvestre un contenido aumentado de 7-dehidrocolesterol.
54. Organismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 45 a 53, caracterizado porque como organismo se utiliza levadura.
- 25 55. Utilización de un organismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 45 a 54 para la fabricación de 7-dehidrocolesterol.

Figura 1

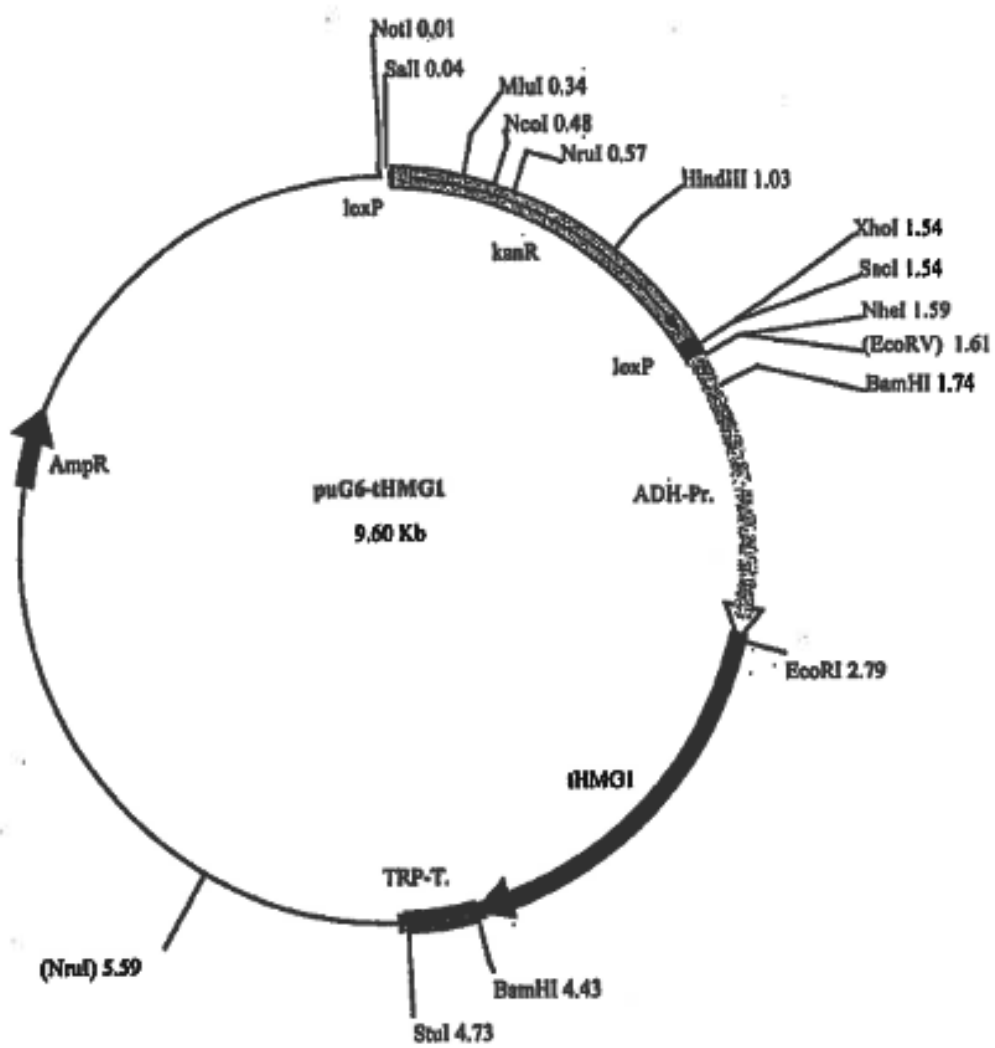


Figura 2

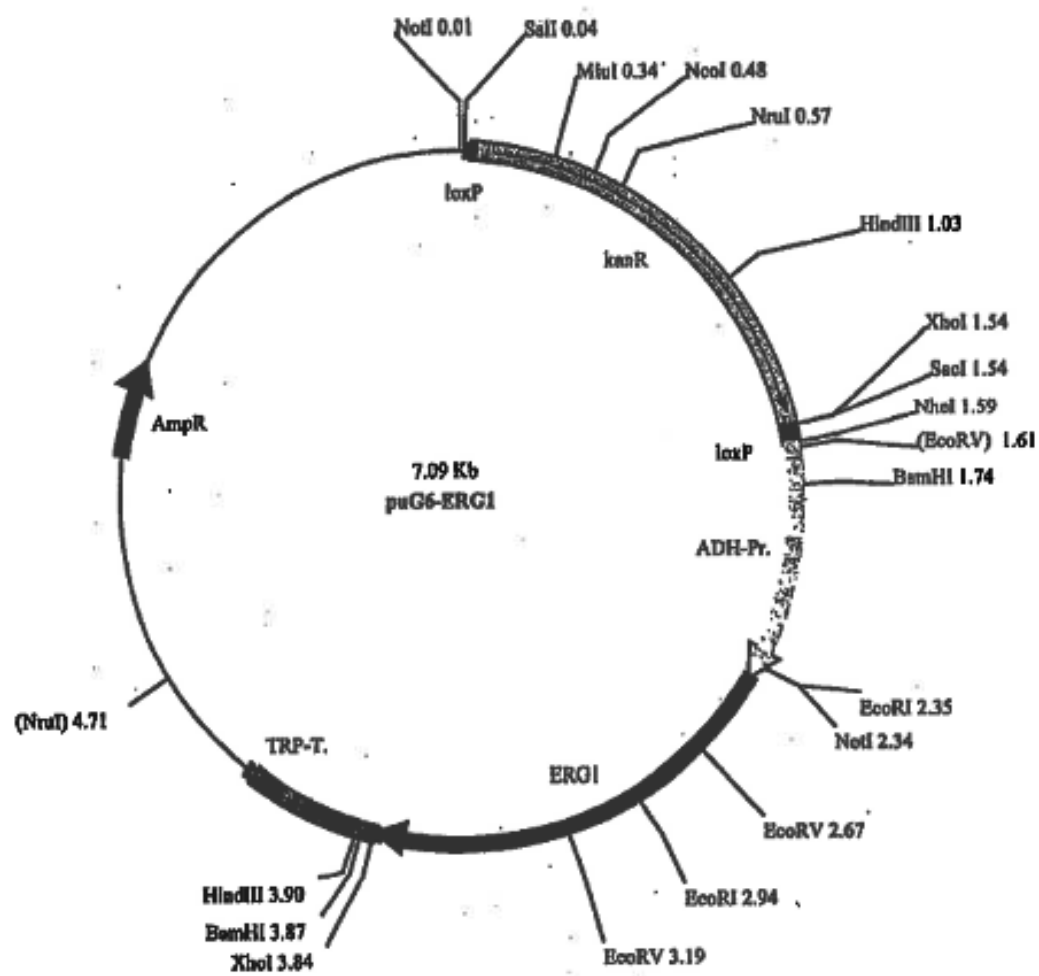


Figura 3

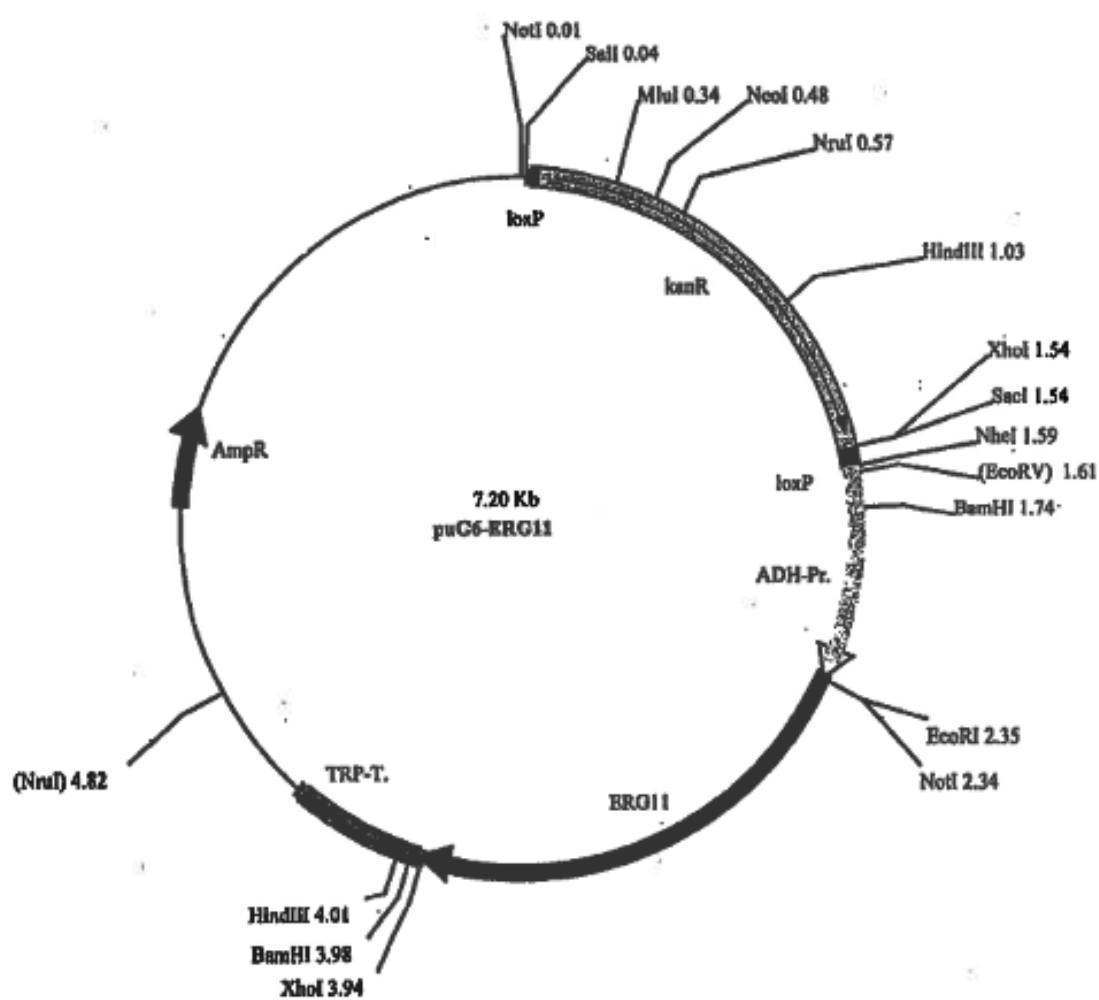


Figura 4

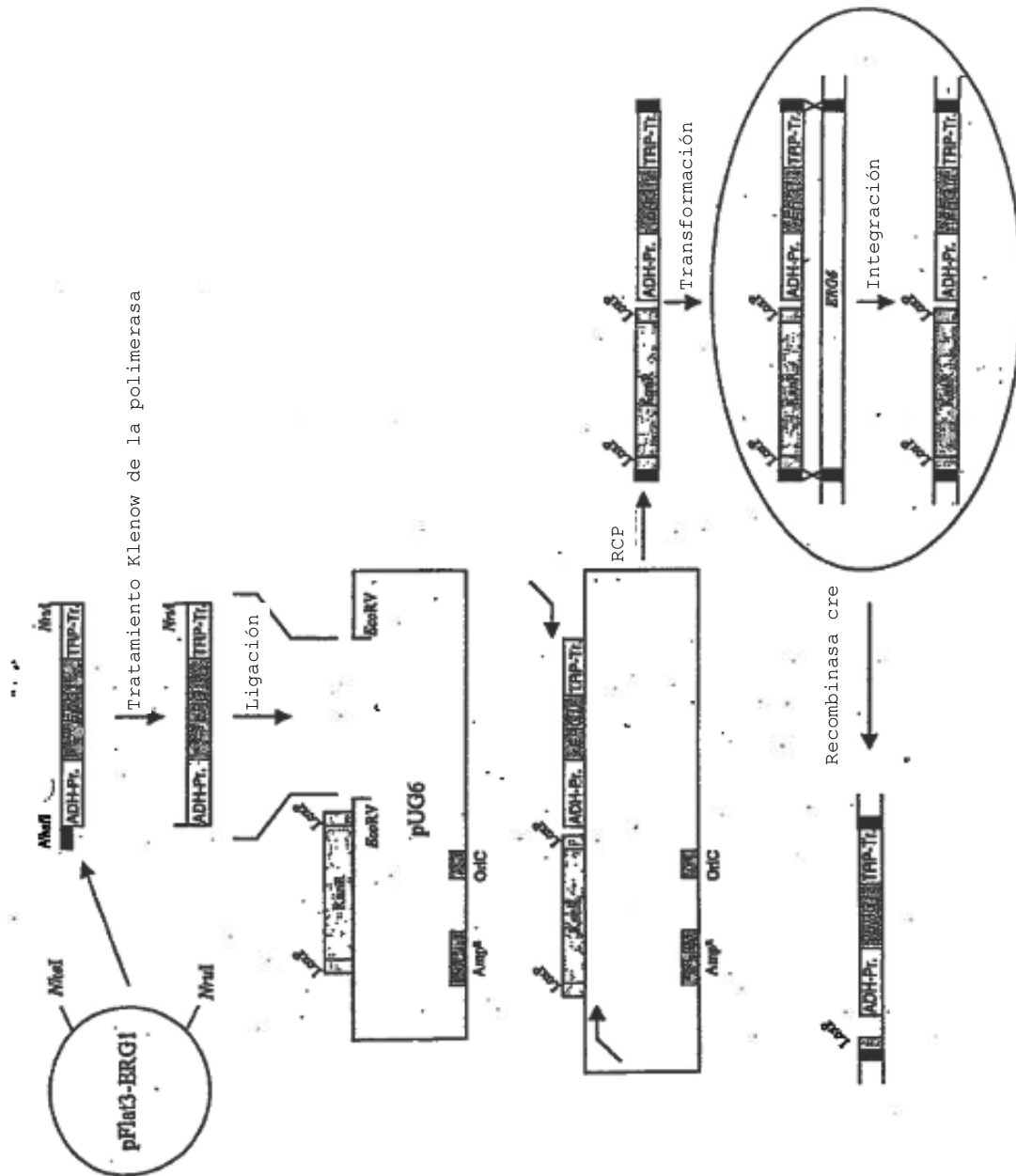


Figura 5a

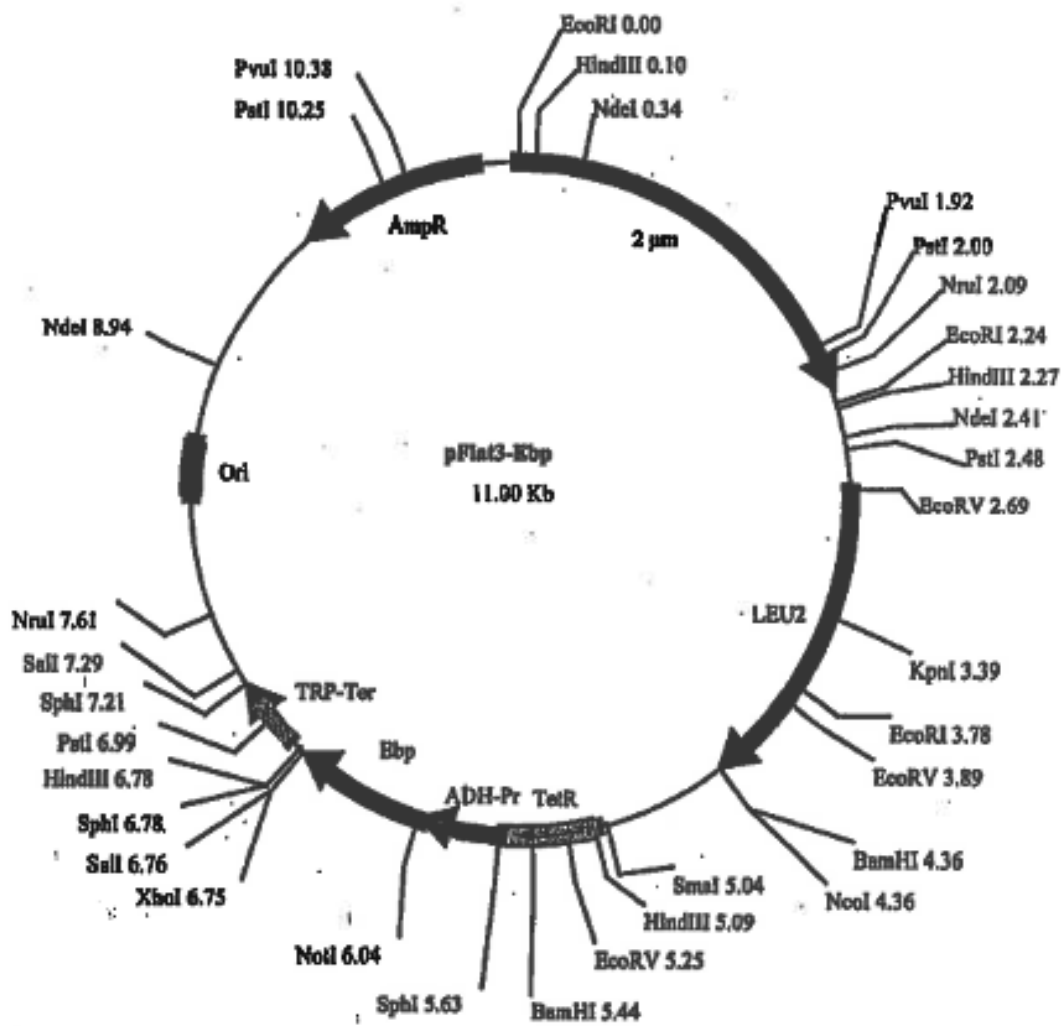


Figura 5b

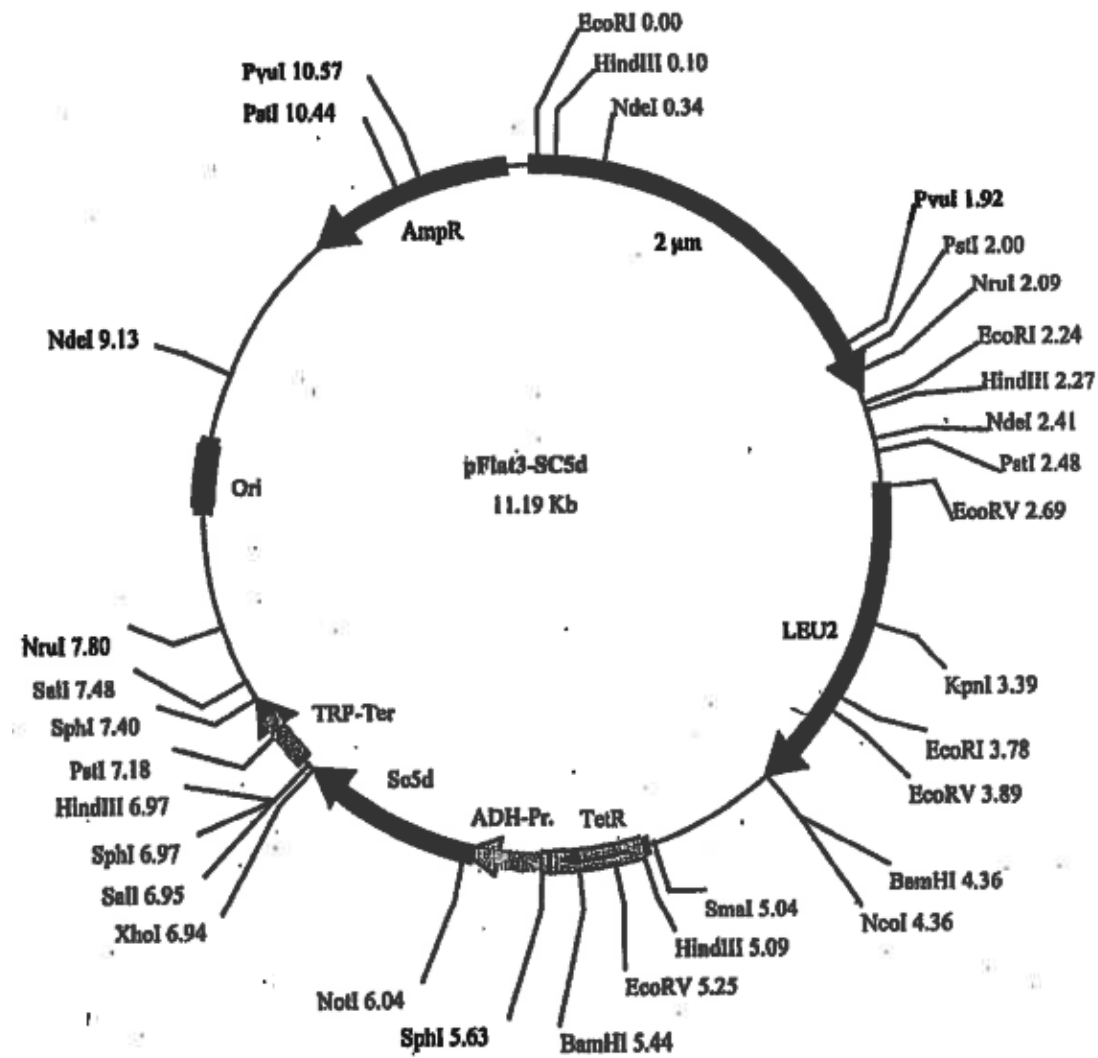


Figura 5c

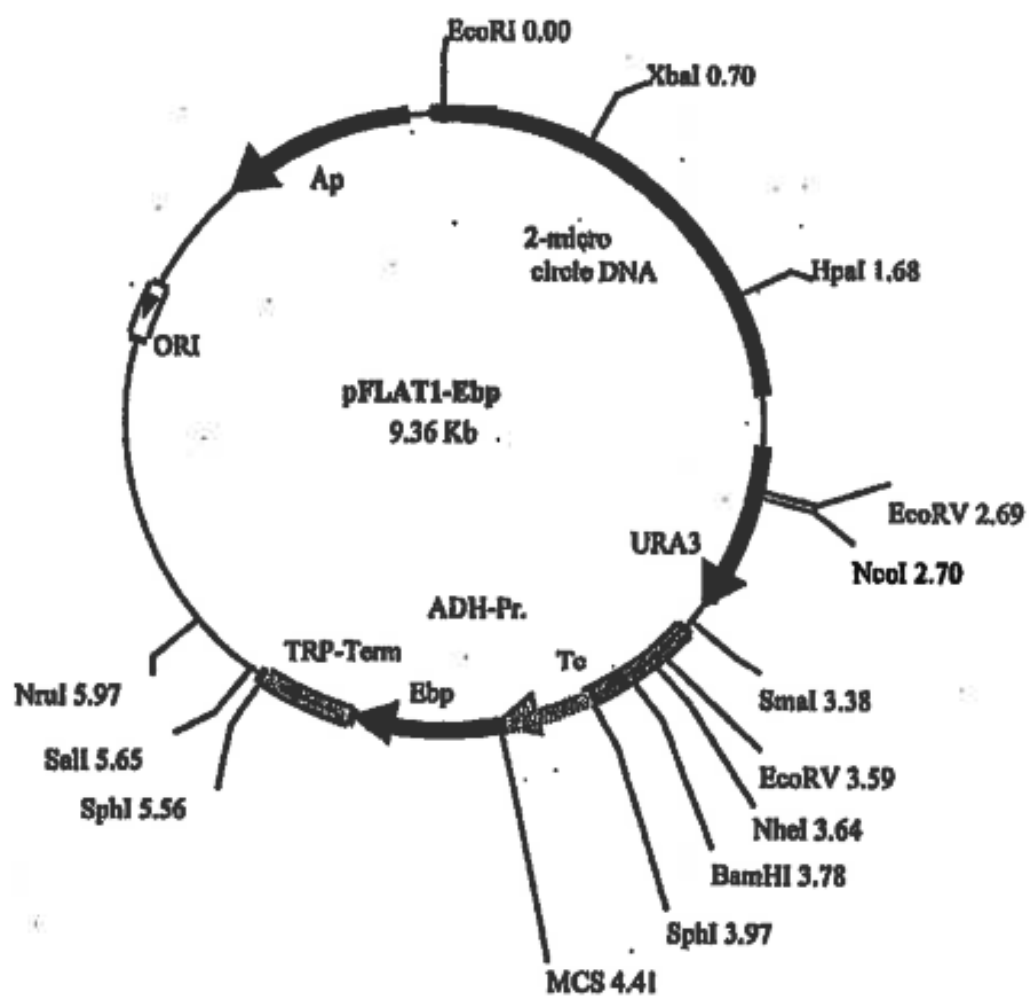


Figura 5d

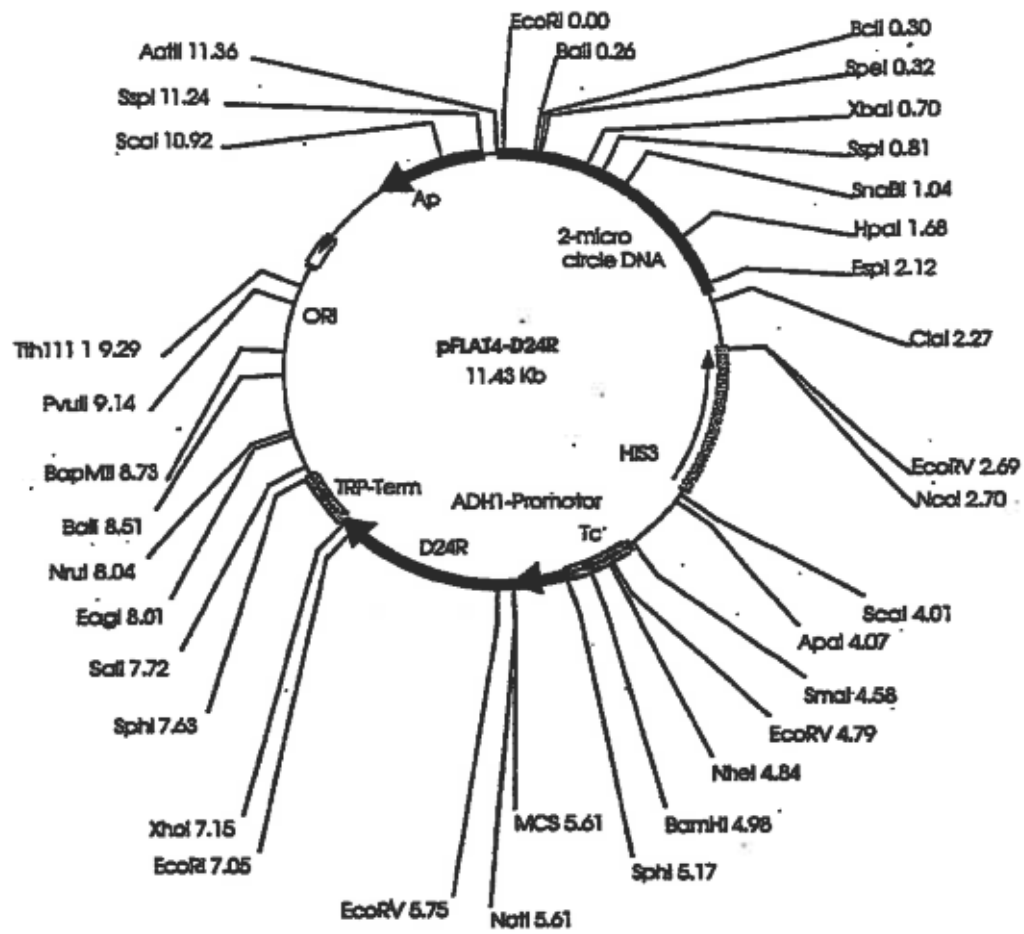


Figura 6

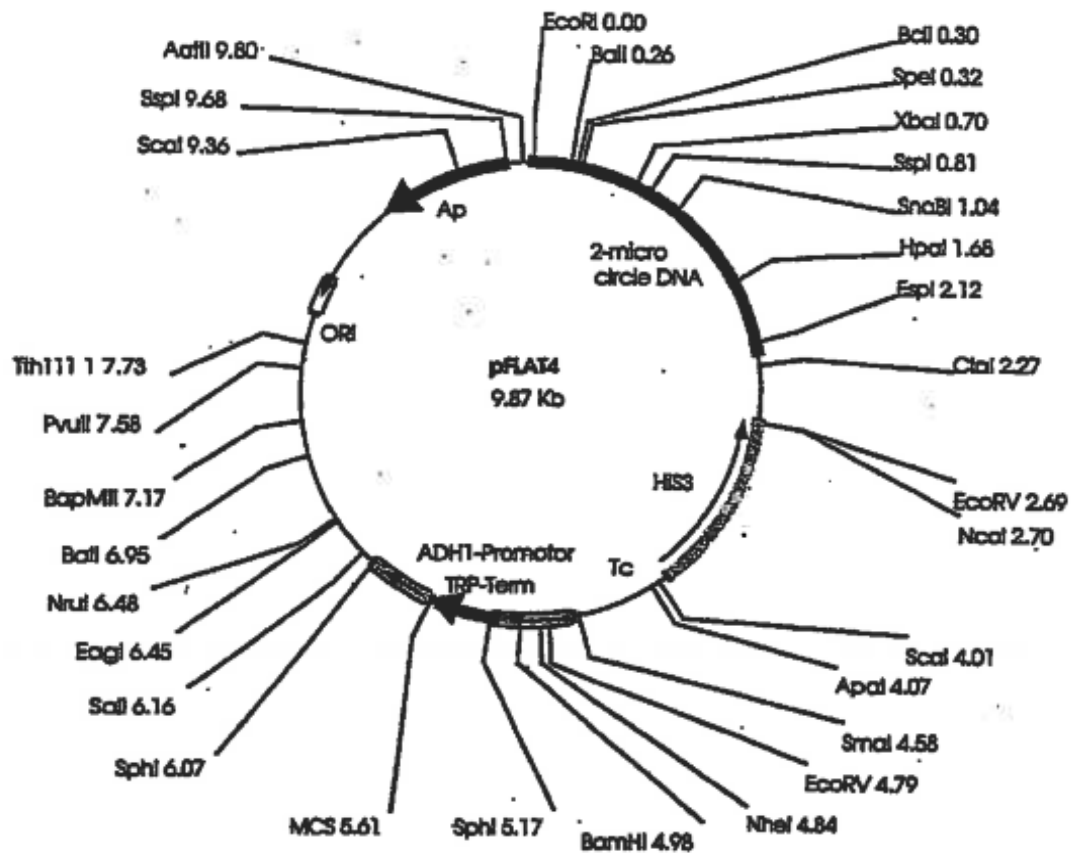


Figura 7

