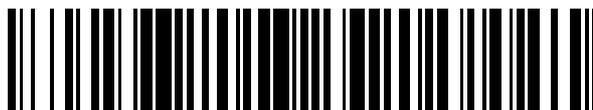


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 302**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2011 E 11724947 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2566963**

54 Título: **Sensores para la detección de metabolitos intracelulares**

30 Prioridad:

03.05.2010 DE 102010019059

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

18.02.2016

73 Titular/es:

**FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
Leo-Brandt-Strasse
52428 Jülich, DE**

72 Inventor/es:

**EGGELING, LOTHAR;
BOTT, MICHAEL;
BINDER, STEPHAN;
FRUNZKE, JULIA y
MUSTAFI, NURIJE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 560 302 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

Sensores para la detección de metabolitos intracelulares

5 La presente invención se refiere a una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje, a un procedimiento para identificar una célula con concentración intracelular elevada de un metabolito determinado, a un procedimiento para la producción de una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada de un metabolito determinado, a una célula obtenida mediante este procedimiento, a un procedimiento para la producción de metabolitos así como a un procedimiento para la producción de una mezcla.

10 Los metabolitos producidos mediante microbiología son de gran interés económico. Así, aminoácidos tal como L-lisina, L-treonina, L-metionina y L-triptófano como aditivo para piensos, L-glutamato como aditivo para condimentos, L-isoleucina y L-tirosina en la industria farmacéutica, L-arginina y L-isoleucina como medicamento o L-glutamato, L-aspartato y L-fenilalanina como sustancia de partida para la síntesis de productos químicos nobles. Otro ejemplo de un metabolito relevante desde el punto de vista técnico es oxoglutarato, que se emplea como complemento alimenticio o como etapa previa de argenina-alfa-cetoglutarato, que promueve la liberación de hormonas de crecimiento e insulina.

15 Un método preferido para la producción de metabolitos de este tipo es la producción biotecnológica por medio de microorganismos. En particular en la producción de aminoácidos pueden obtenerse de esta manera directamente la forma biológicamente activa y ópticamente activa del metabolito respectivo y además también pueden utilizarse materias primas sencillas y económicas. Como microorganismos se utilizan por ejemplo *Corynebacterium glutamicum*, sus parientes *ssp. flavum* y *ssp. lactofermentum* (Liebl et al., Int. J System Bacteriol. 1991, 41: 255 a 260) o también *Escherichia coli* y bacterias relacionadas.

20 En la producción de los metabolitos descritos anteriormente de manera microbiológica se modifica habitualmente mediante mutaciones la regulación de la biosíntesis del metabolito respectivo, de modo que lo producen a través de la demanda de energía y lo expulsan al medio. Así, por ejemplo el documento WO-A-2005/059139 divulga la producción de L-lisina por medio de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* modificada mediante ingeniería genética, en la que se consigue una producción elevada de L-lisina mediante una mejora de la metabolización a través de la ruta metabólica de pentosafosfato. En el documento WO-A-97/23597 se consigue un aumento de la producción de aminoácidos tal como L-lisina en microorganismos por que se aumenta la actividad de portadores de exportación que expulsan estos aminoácidos fuera de la célula.

25 Superproductores de este tipo se obtienen habitualmente mediante la búsqueda de mutantes que producen el metabolito en cantidad especialmente grande. Esta búsqueda se denomina "screening" (selección). En la selección se inducen en una cepa de partida, en la mayoría de los casos por medio de mutágenos químicos o físicos habituales (por ejemplo MNNG o UV) mutaciones al azar (mutagénesis no dirigida) y se seleccionan mutantes con métodos microbiológicos habituales. Otra posibilidad de la provisión de superproductores de metabolitos consiste en reforzar determinadas rutas sintéticas mediante sobreexpresiones dirigidas de genes o deleciones o evitar rutas de síntesis concurrentes.

30 En este sentido es problemático, no obstante, que en particular en la mutagénesis no dirigida en una colección de células es difícil detectar en cuáles de las células ha tenido lugar una mutación, que ha llevado a una síntesis intracelular reforzada del metabolito que se encuentra en el foco. Los procedimientos de selección necesarios para ello requieren mucho tiempo y son muy caros.

35 Smolke et al. (Appl Microbiol Biotechnol. (2001), Vol. 57 (5-6), páginas 689-696) describen el efecto de la homogeneidad de la inducción de transcripción y la estabilidad del transcrito sobre la expresión de dos genes en un operón construido.

40 Vesala et al. (World Journal of Microbiology and Biotechnology (2008), Vol. 24 (3), páginas 353-359) describen el desarrollo de un sensor de fluorescencia de células completas verde para la determinación cuantitativa de lisina.

45 Chavola et al. (Applied Microbiology and Biotechnology (2007), Vol. 76 (1), páginas 91-99) describen la cuantificación de la cantidad de lisina en pienso que contienen proteínas con el uso de un sensor de fluorescencia verde de células completas de *E.coli*.

50 Li et al. (Biotechnol. Bioeng. (2000), Vol. 70 (2), páginas 187-196) describen el uso de una proteína de fluorescencia verde (GFP) para examinar la regulación del promotor de GAL-1 inducible por galactosa en la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

55 Ye et al. (Applied Microbiology and Biotechnology (2000), Vol. 54 (1), páginas 90-96) divulgan la construcción de una levadura modificada mediante ingeniería genética con una emisión de fluorescencia verde inducible por glucosa desde la superficie celular.

Taylor et al. (Anal Biochem. (2004), Vol. 328 (1), páginas 60-66) describen la construcción de un indicador de gen de células completas para un bioensayo de fluorescencia de nitrato.

5 Hilmi et al. (Microbiology (2006), Vol. 152 (5), páginas 1489-1496) tratan de nisina Z, un péptido antimicrobiano modificado de manera post-traduccional de *Lactococcus lactis* y la autorregulación de este péptido mediante nisina extracelular.

10 Luers et al. (Eur. J. Cell Biol. (2000), Vol. 79 (9), páginas 653-657) describen la supervisión de una expresión transgénica en células vivas con el uso de un sistema de promotor inducible de Ecdyson.

La presente invención se basaba en el objetivo de superar las desventajas que resultan del estado de la técnica en relación con la detección de células modificadas mediante ingeniería genética, que superproducen un metabolito determinado.

15 En particular la presente invención se basaba en el objetivo de proporcionar una célula modificada mediante ingeniería genética, en la que después de una mutación pueden identificarse de manera sencilla aquellos mutantes que provocan una superproducción de un metabolito determinado, y pueden separarse opcionalmente del resto de las células.

20 Un objetivo adicional en el que se basa la presente invención consistía en indicar un procedimiento para identificar una célula con concentración intracelular elevada de un metabolito determinado, que permite de manera especialmente sencilla y económica una identificación y opcionalmente separación dirigida de una célula de este tipo en o a partir de una pluralidad de células, por ejemplo en o a partir de una suspensión celular.

25 También, la presente invención se basaba en el objetivo de proporcionar una célula con producción optimizada de un metabolito determinado, en la que se introducen genes o mutaciones de manera dirigida o se generan mediante mutaciones dirigidas, que se han identificado mediante el procedimiento de selección descrito anteriormente como ventajosas para una superproducción de este metabolito.

30 Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio produce una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje tal como se define en la reivindicación 1.

35 Por el término “*metabolito*”, tal como se usa en el presente documento, se entenderá muy en general un producto intermedio de una ruta metabólica bioquímica, siendo de acuerdo con la invención aminoácidos o derivados de aminoácido, por ejemplo L-isooleucina, L-leucina, L-valina, L-lisina, L-arginina, L-citrulina, L-histidina, L-metionina, L-cisteína, L-triptófano, L-glicina u O-acetil-L-serina, nucleótidos o derivados de nucleótido, por ejemplo xantina, GTP o diguanosinmonofosfato cíclico, ácidos grasos o derivados de ácido graso, por ejemplo acil-coenzima A-tioéster, azúcares o derivados de azúcar, por ejemplo glucosa, ramnosa, ribulosa-bis-fosfato, beta-D-galactósido o D-glucosamin-6-fosfato, cetoácidos, por ejemplo oxoglutarato, antibióticos, por ejemplo tienamicina, avilamicina, nocardicina o tetraciclinas, vitaminas o derivados de vitamina, por ejemplo biotina o tiaminpirofosfato o alcaloides de purina, por ejemplo teofilina. Por “*derivados*” de los metabolitos descritos anteriormente se entienden en particular aminas, fosfatos o ésteres de los compuestos correspondientes. Metabolitos muy especialmente preferidos son aminoácidos, en particular un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-isooleucina, L-leucina, L-valina, L-lisina, L-arginina, L-citrulina, L-histidina, L-metionina, L-cisteína, L-triptófano, O-acetil-L-serina, de manera especialmente preferente del grupo que consiste en L-lisina, L-arginina, L-citrulina y L-histidina. El metabolito más preferido de acuerdo con la invención es L-lisina.

40 Por un “*tipo salvaje*” de una célula se entiende preferentemente una célula cuyo genoma se encuentra en un estado tal como se ha generado naturalmente mediante la evolución. El término se usa tanto para la célula completa como para genes individuales. En la expresión “*tipo salvaje*” no entran por lo tanto en particular aquellas células o aquellos genes cuyas secuencias génicas se han modificado al menos en parte mediante los seres humanos por medio de procedimientos recombinantes.

55 De acuerdo con la invención, son células especialmente preferidas aquellas de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Metilobacterium*, *Ralstonia* y *Clostridium*, prefiriéndose especialmente *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Zymomonas mobilis*, *Yarrowia lipolitica*, *Metilobacterium extorquens*, *Ralstonia eutropha* y *Pichia pastoris*. De acuerdo con la invención las células más preferidas son aquellas del género *Corynebacterium* y *Escherichia*, siendo cepas bacterianas muy especialmente preferidas *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli*.

60 En particular en el caso en el que el metabolito es L-lisina, las células modificadas mediante ingeniería genética pueden seleccionarse en particular de células del grupo que consiste en *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020, y mutantes o

5 cepas productoras de L-aminoácidos producidos a partir de los mismos tal como por ejemplo la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709, *Brevibacterium flavum* FERM-P 1708, *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712, *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463, *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 y *Corynebacterium glutamicum* DSM 5715 o tal como por ejemplo la cepa productora de L-metionina *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608. Como ejemplos de cepas adecuadas de *Escherichia coli* se mencionan *Escherichia coli* AJ11442 (véase el documento JP 56-18596 y el documento US 4.346.170), la cepa de *Escherichia coli* VL611 y la cepa de *Escherichia coli* WC 196 (véase el documento WO-A-96/17930).

10 Las células modificadas mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje de acuerdo con la invención se caracterizan ahora por que incluyen una secuencia génica que codifica para un productor de autofluorescencia, dependiendo la expresión de esta proteína autofluorescente de la concentración intracelular de un metabolito determinado.

15 Como secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente se tienen en cuenta todas las secuencias génicas conocidas por el experto, que codifican para una proteína autofluorescente. Se prefieren especialmente secuencias génicas que codifican para proteínas fluorescentes del género *Aequora*, tal como la *Green Fluorescent proteína* (proteína fluorescente verde) (GFP), y variantes de la misma, que fluorescen en otro intervalo de longitud de onda (por ejemplo *Yellow Fluorescent proteína* (proteína fluorescente amarilla), YFP; *Blue Fluorescent proteína* (proteína fluorescente azul), BFP; *Cian Fluorescent proteína* (proteína fluorescente cian), CFP) o cuya fluorescencia está intensificada (*enhanced GFP* o EGFP (potenciada), o EYFP, EBFP o ECFP). Así mismo, pueden usarse de acuerdo con la invención también secuencias génicas que codifican para otras proteínas autofluorescentes, por ejemplo DsRed, HcRed, AsRed, AmCian, ZsGreen, AcGFP, ZsYellow, tal como se conocen de BD Biosciences, Franklin Lakes, EE.UU.

25 La característica, según la cual la expresión de la proteína autofluorescente depende de la concentración intracelular de un metabolito determinado y por lo tanto puede controlarse mediante la célula en función de esta concentración de metabolito, puede realizarse ahora de acuerdo con la invención de distinta manera.

30 De acuerdo con una primera forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención el control de la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente tiene lugar en función de la concentración intracelular del metabolito determinado a nivel de la transcripción. En función de la concentración intracelular del metabolito respectivo se forma por consiguiente más o menos ARNm que puede traducirse en los ribosomas con la formación de la proteína autofluorescente.

35 En relación con esta primera forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención, el control de la expresión a nivel de la traducción puede tener lugar por que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente se encuentra bajo el control de un promotor heterólogo, que en el tipo salvaje de la célula controla la expresión de un gen, cuya expresión en la célula de tipo salvaje depende de la concentración intracelular de un metabolito determinado. También la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente puede encontrarse bajo el control de un promotor, que se deriva de un promotor de este tipo.

40 La formulación "*bajo el control de un promotor heterólogo*" indica que el promotor naturalmente, en particular en la célula de tipo salvaje, a partir de la que se aisló la secuencia de promotor y opcionalmente se modificó mediante ingeniería genética para el aumento adicional de la eficiencia del promotor, no regula la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente. En este contexto la formulación "*que se deriva de un promotor de este tipo*", significa que el promotor contenido en la célula modificada mediante ingeniería genética, que regula la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente, no debe ser un promotor que deba estar contenido en una célula de tipo salvaje con idéntica secuencia de ácido nucleico. Más bien, esta secuencia de promotor puede haberse modificado con el fin de aumentar la efectividad de promotor por ejemplo mediante inserción, deleción o intercambio de bases individuales, por ejemplo mediante palindromización de secuencias de ácido nucleico individuales. Tampoco el promotor, que regula la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente, no debe ser obligatoriamente un promotor o derivarse de un promotor que está contenido en el genoma de la célula modificada mediante ingeniería genética en sí. No obstante, puede resultar totalmente ventajoso cuando el promotor es un promotor o se deriva de un promotor que están contenido en el genoma de la célula modificada mediante ingeniería genética en sí, pero allí controla la expresión de un gen, cuya expresión depende de la concentración intracelular de un metabolito determinado.

60 La secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente se encuentra en esta forma de realización de la célula de acuerdo con la invención bajo el control de un promotor. La expresión "*bajo el control de un promotor*" ha de entenderse a este respecto preferentemente de modo que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente está funcionalmente enlazada con el promotor. Funcionalmente enlazados están el promotor y la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente, cuando estas dos secuencias así como opcionalmente elementos reguladores adicionales, tal como por ejemplo un terminador, están dispuestos secuencialmente de tal manera que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico. Para ello no es necesario un enlace directo en el sentido químico. Las secuencias control genéticas, tal como por ejemplo secuencias *enhancer*, pueden ejercer su función también desde posiciones más alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN sobre la secuencia diana. Se

- 5 prefieren disposiciones en las que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente se posiciona por detrás (es decir, en el extremo 3') de la secuencia de promotor, de modo que ambas secuencias están unidas covalentemente entre sí. Preferentemente, a este respecto la distancia entre la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente y la secuencia de promotor es menor de 200 pares de bases, de manera especialmente preferente menor de 100 pares de bases, de manera muy especialmente preferente menor de 50 pares de bases. También es posible que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente y el promotor estén enlazados entre sí funcionalmente, de tal manera que entre estas dos secuencias génicas se encuentre aún una secuencia parcial del gen homólogo (es decir, aquel gen, cuya expresión en la célula de tipo salvaje se regula por el promotor). En el caso de la expresión de un constructo de ADN de este tipo se obtiene una proteína de fusión a partir de la proteína autofluorescente y la secuencia de aminoácidos que se codifica por la secuencia parcial correspondiente del gen homólogo. La longitud de tales secuencias parciales del gen homólogo no son críticas siempre que no se perjudique considerablemente la funcionalidad de la proteína autofluorescente, es decir, su propiedad de fluorescer con la excitación con luz de una longitud de onda determinada.
- 10
- 15 Además del promotor y de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente, la célula de acuerdo con la invención de acuerdo con esta configuración particular, puede comprender también una secuencia génica que codifica para el regulador, siendo el regulador preferentemente una proteína que interacciona de algún modo con el metabolito y el promotor y de esta manera influye en la afinidad de unión de la secuencia de promotor a la ARN polimerasa. La interacción entre el regulador y la secuencia de promotor depende a este respecto de la presencia del metabolito. Por regla general, el metabolito se une a zonas funcionales determinadas del regulador y provoca de esta manera una variación de conformación del regulador, que repercute en la interacción entre el regulador y la secuencia de promotor. El regulador puede ser a este respecto en principio un activador o un represor.
- 20
- 25 Como promotores se tienen en cuenta de acuerdo con la invención en principio todos los promotores que controlan normalmente, a través de un enlace funcional, la expresión de un gen, cuya expresión depende de la concentración intracelular de un metabolito determinado. De manera muy especialmente preferente, en el caso del promotor se trata de un promotor que controla normalmente la expresión de un gen cuya expresión depende de la concentración intracelular de un metabolito determinado y que codifica una proteína que permite la disminución de la concentración intracelular de un metabolito o bien a través de una reacción química del metabolito o bien a través de la expulsión del metabolito de la célula. Por lo tanto, esta proteína es o bien una enzima que cataliza la conversión del metabolito en un producto metabólico distinto del metabolito, o bien, un transportador activo o pasivo, que cataliza el flujo de salida del metabolito a partir de la célula.
- 30
- 35 Además, en el caso de los promotores puede tratarse de aquellos promotores que en presencia del metabolito interaccionan con determinados activadores y así provocan la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente, o también promotores, que están inhibidos por un represor, difundiéndose el represor mediante interacción con un metabolito determinado desde el promotor, mediante lo cual se elimina la inhibición y se provoca la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente.
- 40
- 45 A continuación se describen en detalle ejemplos adecuados de células de acuerdo con la invención de esta primera forma de realización particular. Sin embargo, cabe destacar en este punto que la presente invención no está limitada a los ejemplos siguientes, que entran en la primera forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención.
- 50
- 55 Así, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización, puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Pseudomonas putida* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *bkd* (con respecto al regulador de BkdR en *Pseudomonas putida* véase por ejemplo J. Bact., 181 (1999), páginas 2.889-2.894, J. Bact., 187 (2005), página 664). En este caso, una concentración intracelular elevada de L-isoleucina, L-leucina, L-valina o D-leucina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta, además del promotor de *bkd* y la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de BkdR (*branched-chain keto acid dehydrogenase regulatory protein*). La secuencia de ADN del promotor de *bkd* regulado por el regulador de BkdR se reproduce en la SEQ. ID. N.º 01 y la secuencia del regulador de BkdR en sí se reproduce en la SEQ. ID. N.º 02.
- 60
- 65 Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Bacillus subtilis* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *ackA* (con respecto al represor de CodY véase Mol. Mic. 62 (2006), página 811). También en este caso, una concentración intracelular elevada de L-isoleucina, L-leucina y L-valina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *ackA* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el represor de CodY. La secuencia de ADN del promotor de *ackA* regulado por el activador de CodY está reproducida en la SEQ. ID. N.º 03 y la secuencia del activador de CodY en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 04.

También en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Pseudomonas putida* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *mdeA* (con respecto al regulador de MdeR véase J. Bacteriol., 179 (1997), página 3.956). En este caso, una concentración intracelular elevada de L-metionina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *mdeA* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de MdeR. La secuencia de ADN del promotor de *mdeA* regulado por el regulador de MdeR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 05 y la secuencia del regulador de MdeR en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 06.

Además en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Corynebacterium glutamicum* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *brnF* (con respecto al regulador de Lrp en *Corynebacterium glutamicum* véase J. Bact., 184 (14) (2002), páginas 3.947-3.956). En este caso una concentración intracelular elevada de L-isoleucina, L-leucina y L-valina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *brnF* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de Lrp. La secuencia de ADN del promotor de *brnF* regulado por el regulador de Lrp está reproducida en la SEQ. ID. N.º 07 y la secuencia del regulador de Lrp en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 08.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Escherichia coli* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *cysP* (con respecto al regulador de CysB en *Escherichia coli* véase Mol. Mic., 53 (2004), página 791). En este caso una concentración intracelular elevada de O-acetil-L-serina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *cysP* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de CysB. La secuencia de ADN del promotor de *cysP* regulado del regulador de CysB está reproducida en la SEQ. ID. N.º 09 y la secuencia del regulador de Lrp en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 10.

También en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Escherichia coli* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *cadB* (con respecto al regulador de CadC en *Escherichia coli* véase Mol. Mic. 51 (2004), páginas 1.401-1.412). En este caso una concentración intracelular elevada de diaminas tal como cadaverina o putrescina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *cadB* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de CadC. La secuencia de ADN del promotor de *cadB* regulado por el regulador de CadC está reproducida en la SEQ. ID. N.º 11 y la secuencia del regulador de CadC en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 12.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Corynebacterium glutamicum* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *metY*, *metK*, *hom*, *cysK*, *cysl* o *suuD* (con respecto al regulador de McbR en *Corynebacterium glutamicum* y la secuencia de promotores, que se regulan por el mismo, véase Mol. Mic. 56 (2005), páginas 871-887). En este caso una concentración intracelular elevada de S-adenosilhomocisteína lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *metY*, *metK*, *hom*, *cysK*, *cysl* o *suuD* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de McbR. La secuencia de ADN del promotor de *metY* regulado por el regulador de McB está reproducida en la SEQ. ID. N.º 13 y la secuencia del regulador de MecR en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 14.

También en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Escherichia coli* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *argO*. En este caso una concentración intracelular elevada de L-lisina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *argO* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el

regulador de ArgP. La secuencia de ADN del promotor de *argO* regulado por el regulador de ArgO está reproducida en la SEQ. ID. N.º 15 y la secuencia del regulador de ArgP en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 16.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con una configuración especialmente preferida de la primera forma de realización puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Corynebacterium glutamicum* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *lysE* (con respecto al promotor de *lysE* y su regulador LysG véase Microbiology, 147 (2001), página 1.765). En este caso una concentración intracelular elevada de L-lisina, L-arginina, L-histidina y L-citrulina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *lysE* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de LysG. La secuencia de ADN del promotor de *lysE* regulado por el regulador de LysG está reproducida en la SEQ. ID. N.º 17 y la secuencia del regulador de LysG en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 18.

En *Corynebacterium glutamicum* el gen *lysE* codifica para un portador secundario, que ni a nivel molecular ni a nivel estructural presenta similitudes con una de las 12 superfamilias de transportadores conocidas, que participan en el flujo de salida están de moléculas orgánicas y cationes. Debido a la función novedosa y la estructura extraordinaria se identificó LysE como primer miembro de una nueva familia de translocadores. Entretanto, a esta familia se asocia en el marco de la secuenciación genómica numerosas proteínas, no obstante, hasta el momento, una función mayormente desconocida aún. La familia de LysE, a la que pertenece LysE, forma con la familia de RhtB y la familia de CadD, la superfamilia de LysE, a la que están asociados hasta el momento en total 22 miembros. De la familia de LysE, el exportador de lisina de *Corynebacterium glutamicum* puede ser el único miembro funcionalmente característico hasta el momento. A nivel genético se regula *lysE* mediante el regulador LysG (*governing L-lysine export*). LysG presenta altas similitudes con proteínas reguladoras bacterianas de la familia de LTTR (*LysR type transcriptional regulador*). A este respecto, L-lisina actúa como inductor de la transcripción mediada por LysG de *lysE*. Además de L-lisina, también los dos aminoácidos básicos L-arginina y L-histidina, así como L-citrulina son inductores de la expresión de *lysE* mediada por LysG.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Escherichia coli* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *fadE* o *fadBA* (con respecto al regulador de FadR en *Escherichia coli* véase por ejemplo Mol. Biol., 29 (4) (2002), páginas 937-943). En este caso una concentración intracelular elevada de acil-coenzima A lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *fadE* o *fadBA* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de FadR. La secuencia de ADN del promotor de *fadE* regulado por el regulador de FadR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 19 y la secuencia del regulador de LysG en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 20.

También, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Bacillus subtilis* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *fadM* (con respecto al regulador de FabR en *Bacillus subtilis* véase por ejemplo J. Bacteriol., 191 (2009), páginas 6.320-6.328). También en este caso, una concentración intracelular elevada de acil-coenzima A lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *fadM* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de FabR. La secuencia de ADN del promotor de *fadM* regulado por el regulador de FabR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 21 y la secuencia del regulador de FabR en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 22.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Escherichia coli* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *rhaSR*, *rhaBAD* o *rhaT* (con respecto al regulador de RhaR y RhaS en *Escherichia coli* véase por ejemplo J. Bacteriol., 189 (1) (2007), 269-271). En este caso una concentración intracelular elevada de ramnosa lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *rhaSR*, *rhaBAD* o *rhaT* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de RhaR o RhaS. La secuencia de ADN del promotor de *rhaSR* regulado por el regulador de RhaR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 23, la secuencia del promotor de *rhaBAD* en la SEQ. ID. N.º 24, la secuencia del regulador de RhaR en la SEQ. ID. N.º 25 y la secuencia del regulador de RhaS en la SEQ. ID. N.º 26.

También en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la tercera configuración puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Anabaena sp.* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *hetC*, *nrrA* o *devB* (con respecto al regulador de NtcA en *Anabaena sp.* véase por ejemplo J. Bacteriol., 190 (18) (2008), páginas 6.126-6.133). En este caso una concentración intracelular elevada de oxoglutarato lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *hetC*, *nrrA* o *devB* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de NtcA. La secuencia de ADN del promotor de *hetC* regulado por el regulador de NtcA está reproducida en la SEQ. ID. N.º 27, la secuencia del promotor de *nrrA* en la SEQ. ID. N.º 28, la secuencia del promotor de *devB* en la SEQ. ID. N.º 29 y la secuencia del regulador de NtcA en la SEQ. ID. N.º 30.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Mycobacterium sp.* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *cbbLS-2* o *cbbLS-1* (con respecto al regulador de CbbR en *Mycobacterium sp.* véase por ejemplo Mol. Micr. 47 (2009), página 297). En este caso una concentración intracelular elevada de ribulosa-bis-fosfato lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *cbbLS-2* o *cbbLS-1* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de CbbR. La secuencia de ADN del regulador de CbbR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 31.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Streptomyces cattleya* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *pcbAB* (con respecto al regulador de ThnU en *Streptomyces cattleya* véase por ejemplo Mol. Micr., 69 (2008), página 633). En este caso una concentración intracelular elevada de tiamicina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *pcbAB* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de ThnU. La secuencia de ADN del promotor de *pcbAB* regulado por el regulador de ThnU está reproducida en la SEQ. ID. N.º 32 y la secuencia del regulador de ThnU en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 33.

También en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Streptomyces viridochromogenes*, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *aviRa* (con respecto al regulador de AviC1 o AviC2 en *Streptomyces viridochromogenes* véase por ejemplo J. Antibiotics, 62 (2009), página 461). En este caso una concentración intracelular elevada de avilamicina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *aviRa* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de AviC1 y/o AviC2. La secuencia de ADN del promotor de *aviRa* regulado por el regulador de AviC1 o AviC2 está reproducida en la SEQ. ID. N.º 34 y la secuencia del regulador de AviC1 o AviC2 en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 35.

Además, en el caso de la célula modificada mediante ingeniería genética de acuerdo con la primera forma de realización particular puede tratarse de una célula modificada mediante ingeniería genética, preferentemente de una célula de *Nocardia uniformis* modificada mediante ingeniería genética, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, que se encuentra bajo el control del promotor de *nocF* (con respecto al regulador de NocR en *Nocardia uniformis* véase por ejemplo J. Bacteriol. 191 (2009), página 1.066). En este caso una concentración intracelular elevada de nocardicina lleva a una expresión de la proteína autofluorescente. Una célula de este tipo presenta además del promotor de *nocF* y de la secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor para una proteína autofluorescente preferentemente también una secuencia génica que codifica para el regulador de NocR. La secuencia de ADN del promotor de *nocF* regulado por el regulador de NocR está reproducida en la SEQ. ID. N.º 36 y la secuencia del regulador de NocR en sí está reproducida en la SEQ. ID. N.º 37.

En principio, hay ahora distintas posibilidades de producir una célula de acuerdo con la invención de acuerdo con la primera forma de realización particular que incluye un promotor descrito anteriormente y un ácido nucleico que se encuentra bajo el control de este promotor, que codifica para una proteína autofluorescente.

Una primera posibilidad consiste por ejemplo en partir de una célula, cuyo genoma comprende ya uno de los promotores descritos anteriormente y preferentemente una secuencia génica que codifica para el regulador correspondiente, y entonces introducir una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente en el genoma de la célula de tal manera que esta secuencia génica se encuentra bajo el control del promotor.

Opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico del promotor en sí puede modificarse antes o después de la integración de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente en el genoma mediante uno o varios intercambios de nucleótidos, deleciones de nucleótidos o inserciones de nucleótidos con el fin del aumento de la efectividad del promotor.

5 Una segunda posibilidad consiste por ejemplo en introducir en la célula uno o varios constructos de ácido nucleico, que contienen la secuencia de promotor y la secuencia génica que se encuentra bajo el control del promotor, que codifica para la proteína autofluorescente, pudiendo modificarse también en este caso la secuencia de ácido nucleico del promotor en sí mediante uno o varios intercambios de nucleótidos, deleciones de nucleótidos o inserciones de nucleótidos con fin del aumento de la efectividad del promotor. La inserción del constructo de ácido nucleico puede tener lugar de manera cromosómica o de manera extracromosómica, por ejemplo en un vector de replicación extracromosómica. Como vectores son adecuados aquellos que se replican en las cepas bacterianas respectivas. Numerosos vectores de plásmido conocidos tal como por ejemplo pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos cripticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmido tal como por ejemplo aquellos que se basan en pCG4 (documento US 4.489.160), o pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), o pAG1 (documento US 5.158.891), pueden usarse de igual manera. Esta enumeración no es limitante sin embargo para la presente invención.

20 Instrucciones para la producción de constructos de gen que comprenden un promotor y una secuencia génica que se encuentra bajo el control de este promotor y la introducción de un constructo de este tipo en el cromosoma de una célula o la introducción de un vector de replicación extracromosómica que comprende este constructo de gen en una célula son suficientemente conocidas por el experto por ejemplo de Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), de Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), de Tsuchiya y Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), de Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), del documento EP-A-0 472 869, del documento US 4.601.893, de Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), de Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), de LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), del documento WO-A-96/15246, de Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), del documento JP-A-10-229891, de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) y de libros de texto conocidos de Genética y de Biología Molecular.

De acuerdo con una segunda forma de realización particular de la célula de acuerdo con la invención el control de la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente tiene lugar en función de la concentración intracelular del metabolito determinado por medio de un denominado ribointerruptor ("*riboswitch*"), pudiendo regularse por medio de un "*ribointerruptor*" de este tipo la expresión tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la traducción. Por un "*ribointerruptor*" se entienden elementos reguladores que se componen exclusivamente de ARNm. Actúan al mismo tiempo como sensor y como elemento regulador. Una visión general sobre ribointerruptores se encuentra por ejemplo en Vitrechak et al., Trends in Genetics, 20 (1) (2004), páginas 44-50. Otros detalles con respecto a la regulación de la expresión génica con ribointerruptor pueden extraerse también de la disertación de Jonas Noeske (2007) con el título "Strukturelle Untersuchungen an metabolito-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR", en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Johann Wolfgang Goethe en Frankfurt am Main.

45 Pueden usarse ribointerruptores en las células de acuerdo con la invención de acuerdo con esta segunda forma de realización particular por que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente está unida funcionalmente con una secuencia de ADN, que a nivel del ARNm puede unirse al metabolito, influyéndose en función de la unión del metabolito al ARNm o bien en la transcripción adicional a lo largo del ADN o también en la traducción en los ribosomas. De esta manera, el ribointerruptor regula a nivel de la transcripción o a nivel de la traducción en la expresión de la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente. En las células de acuerdo con la invención con elementos de ribointerruptor, el metabolito se une, sin participación de cualquier factor de proteína, directamente a una región estructurada en la 5'-UTR del ARNm e induce una variación de la estructura secundaria del ARN. Esta variación de la conformación en la 5'-UTR lleva a la modulación de la expresión del gen posterior, que codifica para la proteína autofluorescente. A este respecto, el efecto regulador génico puede conseguirse o bien influyendo en la transcripción, la traducción u opcionalmente también el procesamiento de ARN. La región de unión a metabolito del ribointerruptor (dominio de aptámero) es un dominio de ARN modular, independiente. La parte restante del ribointerruptor (plataforma de expresión) se encuentra en la mayoría de los casos en sentido 5' a 3' con respecto al dominio de aptámero. La plataforma de expresión puede aceptar, en función de si un metabolito está unido o no al dominio de aptámero, pares de bases con zonas del dominio de aptámero. En la mayoría de los casos, estos pares de bases tienen lugar entre la plataforma de expresión y el dominio de aptámero en el estado no unido a metabolito y llevan a la activación de la expresión de gen. A la inversa, en el estado unido a ligando de estos pares de bases se impide lo que en la mayoría de los casos lleva a una inhibición de la expresión de gen. Si el mecanismo de regulación repercute sobre la transcripción o la traducción, depende de la estructura secundaria que adopta la plataforma de expresión en el estado unido a metabolito o no unido a metabolito. Con frecuencia, la plataforma de expresión presenta secuencias que pueden constituir un terminador de la transcripción y un anti-terminador de la transcripción, excluyéndose sin embargo mutuamente las dos estructuras secundarias. Otro motivo que aparece frecuentemente es una estructura secundaria, mediante la que según el estado de unión a metabolito, la secuencia SD (secuencia Shine-Dalgarno) se convierte en una secuencia

monocatenaria o se enmascara. Cuando la secuencia SD se enmascara mediante la formación de una estructura secundaria, no puede reconocerse la secuencia SD por el ribosoma. De esta manera puede regularse mediante ribointerruptores la terminación de la transcripción prematura o la iniciación de la traducción prematura.

5 Como ejemplos de elementos de ribointerruptor adecuados, que a nivel de la transcripción o a nivel de la traducción permiten un control de la expresión de la proteína autofluorescente, se mencionan por ejemplo el ribointerruptor de lisina de *Bacillus subtilis* (descrito por Grundy *et al.*, 2009), el ribointerruptor de glicina de *Bacillus subtilis* (descrito por Mandal *et al.*, Science 306 (2004), páginas 275-279), el ribointerruptor de adenina de *Bacillus subtilis* (descrito por Mandal y Breaker, Nat. Struct. Mol. Biol. 11 (2004), páginas 29-35) o el ribointerruptor tándem TPP de *Bacillus anthracis* (descrito por Welz y Breaker, RNA 13 (2007), páginas 573-582). Además de estos elementos de ribointerruptor que se producen de manera natural pueden usarse también elementos de ribointerruptor sintéticos, tal como, por ejemplo, el ribointerruptor de teofilina (descrito por Jenison *et al.*, Science 263 (1994), páginas 1425-1429 o por Desai y Gellivan, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004), páginas 1.3247-54), el ribointerruptor de biotina (descrito por Wilson *et al.*, Biochemistry 37 (1998), páginas 14.410-14419) o el ribointerruptor de Tet (descrito por Berens *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 9 (2001), páginas 2.549- 2.556).

Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio la proporciona además un procedimiento para identificar una célula con concentración intracelular elevada de un metabolito determinado en una suspensión celular tal como se define en la reivindicación 8.

20 En la etapa i) del procedimiento de acuerdo con la invención se proporciona en primer lugar una suspensión celular que comprende un medio nutriente así como una pluralidad de las células modificadas mediante ingeniería genética, descritas al principio.

25 En la etapa ii) del procedimiento de acuerdo con la invención se modifica o se modifican mediante ingeniería genética entonces una o varias de las células en la suspensión celular, para obtener una suspensión celular, en la que las células se diferencian con respecto a la concentración intracelular de un metabolito determinado.

30 La modificación mediante ingeniería genética de la suspensión celular puede tener lugar de manera dirigida al sitio o mediante mutagénesis no dirigida, prefiriéndose especialmente la mutagénesis no dirigida.

En el caso de la mutagénesis dirigida al sitio se generan mutaciones de manera dirigida en determinados genes de la célula. Como mutaciones se tienen en cuenta transiciones, transversiones, inserciones y deleciones. En función de la acción del cambio de aminoácidos sobre la actividad enzimática se habla de mutaciones de sentido erróneo (*"missense mutations"*) o mutaciones sin sentido (*"nonsense mutations"*). Inserciones o deleciones de al menos un par de bases en un gen llevan a mutaciones de desplazamiento del marco (*"frame shift mutations"*), a consecuencia de las cuales se incorporan aminoácidos erróneos o la traducción se interrumpe antes de tiempo. Deleciones de varios codones llevan normalmente a una pérdida completa de la actividad enzimática. Instrucciones para la generación de mutaciones de este tipo pertenecen al estado de la técnica y puede extraerse de libros de texto conocidos de Genética y Biología Molecular, tal como por ejemplo el libro de texto de Knippers (*"Molekulare Genetik"*, 6ª edición, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker (*"Gene und Klone"*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann (*"Allgemeine Genetik"*, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1986).

45 Detalles, en particular referencias bibliográficas útiles con respecto a estos métodos de la mutagénesis dirigida, pueden extraerse por ejemplo del documento DE-A-102 24 088.

De acuerdo con la invención se prefiere especialmente sin embargo cuando la modificación mediante ingeniería genética en la etapa de procedimiento ii) tiene lugar mediante mutagénesis no dirigida. Un ejemplo de una mutagénesis no dirigida de este tipo es el tratamiento de las células con productos químicos tal como por ejemplo N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina o la irradiación de las células con luz UV. Procedimientos de este tipo para disparar la mutación son conocidos en general y pueden consultarse, entre otros, en Miller (*"A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria"* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) o en el manual *"Manual of Methods for General Bacteriology"* de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., EE.UU., 1981).

Mediante la modificación mediante ingeniería genética de la célula en la etapa de procedimiento ii), según el tipo de la mutación realizada en la célula, en una célula determinada, por ejemplo como consecuencia de una actividad enzimática aumentada o disminuida, una expresión aumentada o disminuida de una enzima determinada, una actividad aumentada o disminuida de una proteína transportadora determinada, una expresión aumentada o disminuida de una proteína transportadora determinada, una mutación en una proteína reguladora, una mutación en una proteína estructural o una mutación en un elemento de control de ARN, puede llegarse a un aumento de la concentración intracelular de aquel metabolito que mediante interacción con una proteína reguladora correspondiente a través del promotor o mediante interacción con un elemento de ribointerruptor, ejerza una influencia sobre la expresión de la proteína autofluorescente. Una célula, en la que como consecuencia de la mutación está aumentada la concentración de un metabolito determinado, se caracteriza por lo tanto por que en esta

célula se forma la proteína autofluorescente. El gen para la proteína autofluorescente actúa por lo tanto como gen indicador para una concentración de metabolito intracelular elevada.

5 En la etapa de procedimiento iii) del procedimiento de acuerdo con la invención se identifican por lo tanto células individuales en la suspensión celular con concentración intracelular elevada de este metabolito determinado mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular. Para ello se expone la suspensión celular a radiación electromagnética en aquella frecuencia que excita a las proteínas autofluorescente para la emisión de luz.

10 De acuerdo con una configuración particular del procedimiento de acuerdo con la invención tiene lugar a continuación, preferentemente directamente a continuación de la identificación de las células en la etapa de procedimiento iii) una etapa de procedimiento adicional iv), en la que las células identificadas se separan a partir de la suspensión celular, teniendo lugar esta separación preferentemente por medio de citometría de flujo (FACS = *fluorescens activated cell sorting*), de manera muy especialmente preferente por medio de citometría de flujo de alto rendimiento (HAT-FACS = *high throughput fluorescens activated cell sorting*). Detalles con respecto al análisis de suspensiones celulares por medio de citometría de flujo pueden extraerse por ejemplo de Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Basel, Karger, 2007, páginas 27 - 70.

20 Por medio del procedimiento de acuerdo con la invención es por lo tanto posible, en una suspensión celular, en la que se han generado mutaciones dirigidas o no dirigidas en las células, sin influir en la vitalidad de las células, aislar de manera dirigida aquellas células en las que la mutación ha llevado a una concentración intracelular aumentada de un metabolito determinado.

25 Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio la produce también un procedimiento para la producción de una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada de un metabolito determinado tal como se define en la reivindicación 12.

30 De acuerdo con las etapas de procedimiento I) a IV) se generan en primer lugar células con concentración intracelular elevada de un metabolito determinado mediante mutagénesis y se separan a partir de una suspensión celular, pudiendo remitirse en este caso a las etapas de procedimiento i) a iv) descritas anteriormente.

35 En la etapa de procedimiento V) se identifican entonces en las células identificadas y separadas por medio del procedimiento de ingeniería genética conocido por el experto, aquellos genes modificados mediante ingeniería genética G_1 a G_n o aquellas mutaciones M_1 a M_m , que son responsables de la concentración intracelular elevada del metabolito determinado, dependiendo el valor numérico de n o m del número de genes modificados observados o de las mutaciones observadas en la célula identificada y separada. Preferentemente se procede a este respecto de modo que en primer lugar se analiza la secuencia de aquellos genes o secuencias de promotor en las células de las que se conoce que estimulan la formación de un metabolito determinado. En el caso de L-lisina como metabolito estos son por ejemplo los genes *lysC*, *hom*, *zwf*, *mgo*, *leuC*, *gnd* o *pyk*. Si no se reconoce una mutación en ninguno de estos genes, entonces se analiza todo el genoma de la célula identificada y separada, para identificar opcionalmente otros genes modificados G_i u otras mutaciones M_i . De esta manera pueden identificarse secuencias génicas modificadas ventajosas G_i o mutaciones ventajosas M_i , que en una célula llevan a un aumento de la concentración intracelular de un metabolito determinado.

45 En una etapa de procedimiento adicional VI) puede producirse entonces una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada del metabolito determinado, cuyo genoma comprende al menos uno de los genes G_1 a G_n y/o al menos una de las mutaciones M_1 a M_m . Para ello se introduce o introducen uno o varios de los genes G modificados ventajosos, observados en la etapa de procedimiento V) y/o mutaciones modificadas M de manera dirigida en una célula. Esta introducción dirigida de determinadas mutaciones puede tener lugar por ejemplo por medio de sustitución de genes ("*gene replacement*"). En el caso de este procedimiento se produce una mutación tal como por ejemplo una delección, inserción o cambio de bases en el gen de interés *in vitro*. El alelo producido se clona a su vez en un vector no de replicación para el huésped diana y, a continuación, este, mediante transformación o conjugación, se convierte en el huésped diana. Después de la recombinación homóloga por medio de un primer acontecimiento de "*cross-over*" que provoca la integración, y de un segundo acontecimiento de "*cross-over*" adecuado, que provoca una escisión en el gen diana o en la secuencia diana, se consigue la incorporación de la mutación o del alelo.

60 Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio la produce también una célula con producción optimizada de un metabolito determinado, que se obtuvo mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio la produce también un procedimiento para la producción de metabolitos, que incluye las etapas de procedimiento:

65 (a) producir una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada de un metabolito determinado mediante el procedimiento descrito anteriormente;

(b) cultivar la célula en un medio de cultivo que incluye nutrientes en condiciones en las que la célula produce el metabolito determinado a partir de los nutrientes.

5 Las células modificadas mediante ingeniería genética, de acuerdo con la invención, producidas en la etapa de procedimiento (a), con producción optimizada de un metabolito determinado, pueden cultivarse en la etapa de procedimiento (b) de manera continua o discontinua en el procedimiento *batch* (cultivo por lotes) o en el procedimiento *fed-batch* (procedimiento de alimentación) o procedimiento *repeated-fed-batch* (procedimiento de alimentación repetitivo) con el fin de la producción del metabolito en el medio nutriente. Puede concebirse también en un procedimiento semi-continuo, tal como se describe en el documento GB-A-1009370. Un resumen sobre los métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel ("Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik" (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas ("Biore-aktoren und periphere Einrichtungen", Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

15 El medio nutriente que va a usarse debe satisfacer de manera adecuada los requisitos de las cepas respectivas. Descripciones de medios de cultivo de distintos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., EE.UU., 1981).

20 Como fuente de carbono, el medio nutriente puede contener hidratos de carbono tal como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa, aceites y grasas tal como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos tal como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tal como, por ejemplo glicerol y metanol, hidrocarburos tal como metano, aminoácidos tal como L-glutamato o L-valina u ácidos orgánicos tal como por ejemplo ácido acético. Estas sustancias pueden usarse individualmente o como mezcla.

25 Como fuente de nitrógeno el medio nutriente puede contener compuestos que contienen nitrógeno orgánicos tal como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, aguas del remojo del maíz, harina de soja y urea o compuestos inorgánicos tal como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuente de nitrógeno pueden usarse individualmente o como mezcla.

30 Como fuente de fósforo, el medio nutriente puede contener ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o las sales que contienen sodio correspondientes. El medio nutriente debe contener además sales de metales, tal como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Por último, pueden utilizarse sustancias de crecimiento esenciales tal como aminoácidos y vitaminas además de las sustancias mencionadas anteriormente. Al medio nutriente pueden añadirse sobre todo etapas previas adecuadas. Las sustancias utilizadas mencionadas pueden agregarse al cultivo en forma de una preparación única o alimentarse de manera adecuada durante el cultivo.

40 Para el control de pH del cultivo se utilizan de manera adecuada compuestos básicos tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o agua amoniacal o compuestos ácidos tal como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control de la formación de espuma pueden utilizarse agentes antiespumantes tal como por ejemplo ésteres de poliglicol de ácido graso. Para mantener la estabilidad de los plásmidos pueden agregarse al medio sustancias de acción selectiva adecuadas, tal como por ejemplo antibióticos. Para mantener condiciones aeróbico se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tal como por ejemplo aire. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente en de 20 °C a 45 °C y preferentemente de 25 °C a 40 °C.

45 Una contribución a la solución de los objetivos mencionados al principio la produce también un procedimiento para la producción de una mezcla, que incluye las etapas de procedimiento:

50 (A) producir metabolitos mediante el procedimiento descrito anteriormente;

(B) mezclar el metabolito con un componente de mezcla distinto del metabolito.

55 Siempre que en el caso del metabolito se trate de un aminoácido, en particular de L-lisina, la mezcla es preferentemente un alimento, de manera muy especialmente preferente un pienso para animales, o una composición farmacéutica.

La invención se explica en detalle ahora por medio de Figuras y de ejemplos no limitantes.

60 La Figura 1 muestra constructos posibles, en los que la secuencia génica de una proteína autofluorescente (afp) de acuerdo con la primera forma de realización de la célula de acuerdo con la invención se encuentra bajo el control de un promotor (promotor de *lysE*).

65 La Figura 2 muestra el vector producido en el Ejemplo 1 pJC1lysGE'eYFP (ly-sE'eYFP, secuencia codificante de la proteína de fusión LysE'eYFP; lysG, secuencia codificante de la proteína reguladora LysG; kanR, secuencia codificante de la resistencia mediada por canamicina; repA: origen de replicación; BamHI: secuencia de reconocimiento y puntos de corte de la enzima de restricción BamHI).

La Figura 3 muestra una microscopía confocal de la cepa obtenida en el Ejemplo 1 ATCC 13032 pJC1lysGE'eYFP (parte superior) y DM1800 p JC1lysGE'eYFP (parte inferior). Las barras blancas en la figura inferior corresponden a una longitud de 10 μm . En cada caso 3 μl de suspensiones celulares se colocaron sobre un portaobjetos y se inmovilizaron mediante una capa fina al 1 % de agarosa. Se excitó la suspensión inmovilizada con luz de la longitud de onda 514 nm y un tiempo de iluminación de 700 ms. La medición de emisión de fluorescencia de eYFP tuvo lugar con Zeiss Axiomager M1 con el uso de un filtro de banda ancha en el intervalo de 505 nm a 550 nm.

La Figura 4 muestra la secuencia de la secuencia génica producida en el Ejemplo 2, que se basa en un elemento de ribointerruptor, que comprende un elemento de ribointerruptor y una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, enlazada funcionalmente con este elemento de ribointerruptor, (negrita: aptámero; cursiva: secuencia de terminador; subrayado: EYFP).

La Figura 5 muestra el vector pJC1lrp-brnF'eYFP.

La Figura 6 muestra la correlación de la concentración de L-metionina interna con señal de salida de fluorescencia de los cultivos de ATCC13032pJC1lrp-brnF'-eYFP obtenidos en el Ejemplo 3.

La Figura 7 muestra la formación de lisina mediante los mutantes de la cepa de partida ATCC13032pSenLysTKC en el Ejemplo 4c).

La Figura 1 muestra constructos posibles, en los que la secuencia génica de una proteína autofluorescente (afp) de acuerdo con la primera forma de realización de la célula de acuerdo con la invención se encuentra bajo el control de un promotor (promotor de *lysE*). La variante A indica una situación inicial, en la que el regulador dependiente de metabolito se encuentra directamente adyacente a su gen diana (*lysE*), que lo regula en función de la concentración de metabolito. De acuerdo con la variante B, en el caso más sencillo, el gen diana está sustituido por una proteína fluorescente (afp). De acuerdo con la variante C, tiene lugar una fusión traduccional de los primeros aminoácidos del gen diana con la proteína fluorescente. En la variante D, ha tenido lugar una fusión transcripcional, de manera que se forma un transcrito largo a partir de la región de promotor, que comprende los primeros aminoácidos del gen diana, terminado mediante un codón de parada, seguido de un sitio de unión a ribosoma (RBS) y el marco de lectura abierto para la proteína fluorescente. En la variante E ha tenido lugar una fusión transcripcional, de manera que se forma un transcrito largo a partir de la región de promotor, que comprende los primeros aminoácidos del gen diana, terminado mediante un codón de parada, seguido de un sitio de unión a ribosoma y el inicio de una proteína conocida y expresada adecuadamente tal como por ejemplo la beta-galactosidasa de *E. coli*, LacZ, que, a su vez está fusionada con la proteína fluorescente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de una célula de acuerdo con la invención de acuerdo con la primera forma de realización en el ejemplo de una célula, en la que una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente se encuentra bajo el control del promotor de *lysE* y en la que la expresión de la proteína autofluorescente depende de la concentración intracelular de L-lisina.

a) Construcción del vector pJC1lysGE'eYFP

La construcción de la fusión de *lysE* ' con el gen indicador *eyfp* (SEQ. ID. N.º 49; secuencia de proteína de eYFP: SEQ. ID. N.º 72) se consiguió mediante una *overlap-extension-PCR*. Como molde sirvió pUC18-2,3-kb-lysGE-BamHI, que porta la secuencia codificante de *lysE* junto con el gen del regulador transcrito de manera divergente LysG (Bellmann et al., 2001; Microbiology 1471765-74), así como pEKEx2-yfp-tetR (Frunzke et al., 2008; J Bacteriol. 190:5111-9), que permite la amplificación de *eyfp*. Para crear el fragmento *lysGE'eyfp* se amplificaron en primer lugar las secuencias codificantes *lysGE'* y *lysGE'ns* (1010 pb) con las combinaciones de oligonucleótidos *plysGE_for* (SEQ. ID. N.º 38) y *plysGE_rev* (SEQ. ID. N.º 39). Para la amplificación de la secuencia codificante de *eyfp* se usaron las dos combinaciones de oligonucleótidos *peYFP_rev* (SEQ. ID. N.º 40) y *peYFP_fw2* (SEQ. ID. N.º 41).

plysGE_for 5'-CGCGGATCCCTAAGCCGCAATCCCTGATTG-3'
plysGE_rev 5'-TCCGATGGACAGTAAAAGACTGGCCCCAAAGCAG-3'

peYFP_rev 5'-TGAGGATCCTTATTACTTGTCAGCTCGTCCATGCCGA-
 GAGTGATCC-3'

peYFP_fw2 5'-CTTTTACTGTCCATCGGAACTAGCTATGGTGAGCAAG-
 GGCGAGGAGCTGTTACC-3'

Después de la purificación de los fragmentos amplificados a partir de un gel de agarosa al 1 % se utilizaron estos en una segunda reacción PCR con los cebadores externos *plysGE-for* y *peYFP_rev* como matrices. Mediante

hibridación de los fragmentos de molde en una zona complementaria de 17 pb, que se creó por los cebadores oligonucleotídicos internos *plysGE_rev* y *peYFP_fw2*, pudo crearse el *overlap-extension-Fragment*. El producto así generado *lysGE'eyfp* se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI y tras la purificación de la preparación de reacción se utilizó en reacciones de ligamiento con el vector así mismo abierto por *Bam*HI y desfosforilado pJC1. La preparación de ligamiento se usó directamente para la transformación de *E. coli* DH5 α MCR, y la selección de transformantes tuvo lugar sobre placas de LB con canamicina 50 μ g/ml. 20 colonias, que crecieron sobre estas placas y por consiguiente eran resistentes a canamicina, se utilizaron para una PCR de colonia. La PCR de colonia tuvo lugar en cada caso con las combinaciones de oligonucleótidos descritas anteriormente, para comprobar si el fragmento *lysGE'eyfp* se había insertado en el vector pJC1. El análisis de la PCR de colonia en un gel de agarosa presentaba el producto de PCR esperado con un tamaño de 1010 pb en las muestras analizadas, después de lo cual se cultivó una colonia para una preparación de plásmido a mayor escala. A través de la escisión de ensayo con las enzimas de restricción *Bgl*II, *Xho*I y *Pvu*I pudo detectarse la presencia del fragmento insertado pJC1lysGE'eYFP.

La secuenciación del inserto mostró una coincidencia del 100 % con la secuencia esperada.

b) Transformación de *Corynebacterium glutamicum* con pJC1lysGE'eYFP

Se produjeron células competentes de las cepas de *C. glutamicum* ATCC 13032 y DM1800 tal como se describe en Tauch et al., 2002 (Curr Microbiol. 45(5) (2002), páginas 362-7). La cepa ATCC 13032 es un tipo salvaje de la lisina separada, mientras que la cepa DM1800 se preparó mediante mutaciones dirigidas a gen dando un separador de lisina (Georgi et al. Metab Eng. 7 (2005), páginas 291-301). Estas células se transformaron con pJC1lysGE'eYFP tal como se describe en Tauch et al. (Curr Microbiol. 45(5) (2002), páginas 362-7) mediante electroporación. La selección de los transformantes tuvo lugar sobre placas de BHIS con canamicina 25 μ g/ml. Las colonias, que crecieron sobre estas placas y por consiguiente eran resistentes a canamicina, se examinaron mediante preparaciones de plásmido y escisiones de ensayo con las enzimas *Bgl*II, *Xho*I y *Pvu*I para detectar la presencia de los vectores. Respectivamente, un clon correcto, se designó con ATCC 13032 pJC1lysGE'eYFP y DM1800 pJC1lysGE'eYFP.

c) Detección de la fluorescencia específica de lisina

El examen de la emisión de fluorescencia *in vivo* tuvo lugar a través de microscopía confocal con Zeiss Axiomager MI. Para este fin se añadieron 3 μ l de suspensión celular de las cepas ATCC 13032 pJC1lysGE'eYFP y DM1800 pJC1lysGE'eYFP sobre un portaobjetos, sobre el que se había aplicado previamente para la inmovilización, una capa delgada de agarosa al 1 %. Se excitó la suspensión inmovilizada con luz de longitud de onda 514 nm y un tiempo de iluminación de 700 ms. La medición de emisión de fluorescencia de eYFP tuvo lugar con el uso de un filtro de banda ancha en el intervalo de 505 nm a 550 nm. Las células fluorescentes se documentaron digitalmente con ayuda del software AxioVision 4.6. En la figura puede apreciarse que la emisión de fluorescencia sólo aparece en la cepa que forma lisina DM1800 pJC1lysGE'eYFP, mientras que la cepa que no forma lisina ATCC13032 pJC1lysGE'eYFP no fluoresce.

Ejemplo 2

Producción de una célula de acuerdo con la invención de acuerdo con la segunda forma de realización en el ejemplo de una célula, en la que se regula la expresión de una proteína autofluorescente bajo ribointerruptor de adenina (ARS) y en la que la expresión de la proteína autofluorescente depende de la concentración de adenina intracelular.

El ribointerruptor de adenina (ARS) de *Bacillus subtilis* (véase Mandai y Breaker, Nat Struct Mol Biol, 11 (2004), páginas 29-35) se amplificó en primer lugar a partir del ADN genómico de *Bacillus subtilis* con los cebadores ARS_for (SEQ. ID. N.º 42) y ARS_rev (SEQ. ID. N.º 43). En una segunda PCR se amplificó, a partir del amplicón ARS purificado por medio del kit de extracción de gel Qiagen MinElute con el uso del cebador ARS_for_BamHI y ARS_rev_NdeI un amplicón ARS con sitios de corte de *Bam*HI en el extremo 5' terminal y *Nde*I en el extremo 3' terminal y se cortó con estas enzimas de restricción.

El gen indicador *eyfp* se amplificó a base de pEKEx2-EYFP con los cebadores EYFP_for_NdeI (SEQ. ID. N.º 44) y EYFP_rev_EcoRI (SEQ. ID. N.º 45), se restringió con las enzimas *Nde*I y *Eco*RI y se purificó así mismo por medio del kit de extracción de gel Qiagen MinElute.

ARS_for: 5'-TCAACTGCTATCCCCCCTGTTA-3'

ARS_rev: 5'-AAACTCCTTTACTTAAATGTTTTGATAAATAAA-3'

EYFP_for_NdeI: 5'-TACATATGGTGAGCAAGGGCGA-3'

EYFP_rev_EcoRI: 5'-TAGAATTCTTATCTAGACTTGTACAGCTCG-3'

Los dos productos de PCR restringidos se ligaron juntos en el vector pEKEx2 previamente restringido con *Bam*HI y *Eco*RI y por lo tanto se pusieron bajo el control del promotor *ptac* inducible por IPTG. *E. coli* XL1 blue se transformó a continuación con la preparación de ligamiento.

Transformantes resistentes a canamicina se examinaron por medio de *colony*-PCR para determinar la presencia del constructo pEKEx2-ARS-EYFP (cebador pEKEx2_for (SEQ. ID. N.º 46) y EYFP_rev (SEQ. ID. N.º 47)) y se purificó el plásmido para el análisis adicional.

5 Para verificar el constructo preparado pEKEx2-ARS-EYFP se cortó este con la enzima de restricción Ndel y se examinó por medio del patrón de bandas.

Una secuenciación mostrada en la Figura 4 (SEQ. ID. N.º 48) del sensor de adenina confirmó la fusión intacta del ribointerruptor dependiente de adenina (ydhL) con la proteína autofluorescente EYFP.

10 pEKEx2_for: 5'-CGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC-3'
EYFP_rev: 5'-TAGAATTCTTATCTAGACTTGTACAGCTCG-3'

Ejemplo 3

15 Producción de una célula de acuerdo con la invención de acuerdo con la primera forma de realización en el ejemplo de una célula, en la que una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente se encuentra bajo el control del promotor de *brnFE* y en la que la expresión de la proteína autofluorescente depende de la concentración de L-metionina intracelular.

20 a) Construcción del vector pJC1lrp-brnF'eYF

En la construcción de la fusión de *brnF* con el gen indicador *eyfp* se procedió tal como sigue. En dos reacciones separadas se amplificó en primer lugar el *lrp* codificante y los primeros 30 nucleótidos de la secuencia de *brnF* (25 *brnF*) junto con la región intergénica (560 pb) con el par de oligonucleótidos *lrp-fw-A-BamHI* (SEQ. ID. N.º 50) /*lrp-brnF-rv-I-NdeI* (SEQ. ID. N.º 51) así como *eyfp* (751 pb) con el par de oligonucleótidos *eyfp-fw-H-NdeI* (SEQ. ID. N.º 52) / *eyfp-rv-D-SalI* (SEQ. ID. N.º 53). Como molde sirvió ADN genómico de *C. glutamicum*, así como el vector pEKEx2-yfpetR (Frunzke et al., 2008, J. Bacteriol. 190: 5111-5119), que permite la amplificación de *eyfp*. Los oligonucleótidos *fw-A-BamHI* y *lrp-brnF-rv-I-NdeI* se completaron con sitios de corte de restricción de *BamHI* y *NdeI* 5' terminales, los oligonucleótidos *eyfp-fw-H-NdeI* y *eyfp-rv-D-SalI* con sitios de corte de restricción de *NdeI* y *SalI* 5' terminales. Después de la restricción de los amplicones de *lrp-brnF'* con *BamHI* y *NdeI* o del amplicón de *eyfp* con *NdeI* y *SalI*, se fusionaron los amplicones de *lrp-brnF'* con el amplicón de *eyfp* a través de los extremos libres del sitio de corte de *NdeI* en una preparación de ligamiento y, al mismo tiempo, se clonan en el vector pJC1 así mismo abierto mediante *BamHI-SalI* (Figura 5). La preparación de ligamiento se usó directamente para la transformación de *E. coli* DH5 α . La selección de transformantes tuvo lugar sobre placas de LB con canamicina 50 μ g/ml. Colonias, que crecieron sobre estas placas y por consiguiente eran resistentes a canamicina, se examinaron para una PCR de colonia. Para comprobar si el fragmento *lrp-brnF'eyfp* se había insertado en el vector pJC1, tuvo lugar la PCR de colonia con oligonucleótidos que flanquean la zona del "multiple cloning site" en el vector pJC1. El análisis de la PCR de colonia en un gel de agarosa presentaba el producto de PCR esperado con un tamaño de 1530 pb en las muestras analizadas, después de lo cual se cultivó una colonia para preparaciones de plásmido a mayor escala. A través de la escisión de ensayo con las enzimas de restricción *BamHI*, *NdeI* y *SalI* se detectó la presencia del fragmento insertado. La secuenciación del inserto mostró una coincidencia del 100 % con la secuencia esperada. La transformación de las células de *C. glutamicum* competentes con el vector pJC1lrp-brnF'eYFP tuvo lugar según el método de Tauch y Kirchner (Curr. Microbiol. (2002) 45:362- 367), y se obtuvo la cepa *C. glutamicum* ATCC13032 pJC1lrp-brnF'eYFP.

45 *lrp-fw-A-BamHI* 5'-GCGCGGATCCTCACACCTGGGGGCGAGCTG-3'

lrp-brnF-rv-I-NdeI 5'-GCGCCATATGATATCTCCTTCTTAAAGTTCAGC-
TTGAATGAATCTCTTGCG-3'

50 *eyfp-fw-H-NdeI* 5'-GCGCCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'

eyfp-rv-D-SalI 5'-GCGCGTTCGACTTATCTAGACTTGTACAGCTCG-
TC-3'

55 Seq_pJC1_for1 (SEQ. ID. N.º 54) 5'-CGATCCTGACGCAGATTTTT-3'
Seq_pJC1_rev1 (SEQ. ID. N.º 55) 5'-CTCACCGGCTCCAGATTTAT-3'

b) Correlación de la concentración de metionina intracelular con la salida de fluorescencia

60 Para la caracterización más detallada se determinó la sensibilidad y la región dinámica del sensor para L-metionina. Para ello se ajustaron en ATCC13032 pJC1lrp-brnF'eYFP distintas concentraciones internas de metionina con péptidos. Este procedimiento se describe por ejemplo en Trötschel et al. (J. Bacteriol. 2005, 187: 3786-3794). Se

utilizaron los siguientes dipéptidos: L-alanil-L-metionina (Ala-Met), L-metionil-L-metionina (Met-Met), así como L-alanil-L-alanina (Ala-Ala). Para conseguir diferentes concentraciones de L-metionina, se utilizaron las siguientes relaciones de mezcla: Ala-Met 0,3 mM más Ala-Ala 2,7 mM, Ala-Met 0,6 mM más Ala-Ala 2,4 mM, Ala-Met 0,9 mM más Ala-Ala 2,1 mM, Ala-Met 1,5 mM más Ala-Ala 1,5 mM, Ala-Met 2,1 mM más Ala-Ala 0,9 mM, Ala-Met 2,7 mM más Ala-Ala 0,3 mM, Ala-Met 3 mM, Met-Met 3 mM, que se añadieron al medio CGXII (Keilhauer et al., 1993, J Bacteriol. 175:5595-603). El cultivo tuvo lugar con 0,6 ml de medio a escala de microtitulación (Flowerplate® MTP-48-B) en el sistema BioLector (m2p-labs GmbH, Forckenbeckstrasse 6, 52074 Aachen, Alemania). Siete minutos después de la adición de los péptidos se separaron células a partir de 200 µl de la suspensión celular mediante centrifugación con aceite de silicona del medio y se inactivaron tal como se describe en Klingenberg y Pfaff (Methods in Enzymology 1967; 10: 680-684). La fracción citoplasmática de las muestras se procesó tal como se describe en Ebbinghausen et al. (Arch. Microbiol. (1989), 151:238-244) y se cuantificó la concentración de aminoácidos por medio de HPLC de fase inversa tal como se indica en Lindroth y Mopper (Anal. Chem. (1979) 51, 1167-11174). La fluorescencia de los cultivos de ATCC13032 pJC1lrp-brnF'eYFP con las diferentes concentraciones de péptido se registró con el sistema BioLector (m2plabs GmbH, Forckenbeckstrasse 6, 52074 Aachen, Alemania). La correlación de la concentración de L-metionina interna con la señal de salida de fluorescencia se muestra en la Figura 6. Puede apreciarse que el plásmido de sensor pJC1lrpbrnF'eYFP permite la detección intracelular de metionina en una región lineal de aproximadamente 0,2-25 mM. Puede detectarse ya una acumulación de metionina por debajo de la región mM (< 1 mM).

20 Ejemplo 4

Utilización de un sensor de metabolitos para el aislamiento de células con formación de lisina aumentada e identificación de nuevas mutaciones que llevan a la formación de lisina.

25 a) Construcción de un tipo salvaje recombinante de *Corynebacterium glutamicum* con el sensor de lisina pSenLysTK-C

El vector pJC1 se describe en Cremer et al. (Molecular and General Genetics, 1990, 220:478-480). Este vector se cortó con *Bam*HI y *Sal*I, y con se ligó con el fragmento de 1.765 kb *Bam*HI-<-EYFP-lysE'-lysG->-*Sal*I (SEQ. ID. N.º 56) sintetizado mediante GATC (GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, 78467 Konstanz).

El vector resultante pSenLysTK se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI, y se ligó con el fragmento de 2.506 kb *Bam*HI-T7terminator- <-Crimson----lacIQ->-*Bam*HI (SEQ.-ID.-Nr. 57) sintetizado por GATC (GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, 78467 Konstanz).

El vector resultante se denominó pSenLysTK-C. Este contiene EYFP como fusión transcripcional y como marcador vivo la proteína Crimson. El plásmido de sensor pSenLysTK-C se introdujo en células competentes del tipo salvaje tal como se describe en Tauch et al. (Curr. Microbiol. 45 (2002), páginas 362-7), y se obtuvo la cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 pSenLysTK-C.

40 b) Mutagénesis de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 pSenLysTK-C

La cepa producida ATCC13032 pSenLysTK-C se cultivó durante la noche en el medio "*Difco Brain Heart Infusion*" (Difco, Becton Dickinson BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ EE.UU.) a 30 °C, y 5 ml de este cultivo se mezclaron con 0,1 ml de una disolución de 0,5 mg de N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina, disueltos en 1 ml de dimetilsulfóxido. Este cultivo se agitó a 30 °C durante 15 minutos. A continuación se separaron por centrifugación las células a 4 °C y 2.500 g, y se resuspendieron en 5 ml de NaCl al 0,9 %. La etapa de centrifugación y la resuspensión se repitieron. A la suspensión celular así obtenida se añadieron 7,5 ml de glicerol al 80 %, y se almacenaron alícuotas de esta suspensión celular mutada a -20 °C.

50 c) Citometría de flujo de alto rendimiento (HT-FACS = "*high throughput fluorescence activated cell sorting*") y clasificación celular

De la suspensión celular obtenida en b) se añadieron 200 µl en 20 ml de medio líquido CGXII-Kan25 (Keilhauer et al., J. Bacteriol. 1993; 175(17):5595-603) y se incubó el cultivo a 30 °C y 180 rpm. Después de 45 minutos se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido en una concentración final de 0,1 mM. Después de incubación adicional durante 2 horas tuvo lugar el análisis de las propiedades ópticas y la clasificación de partículas celulares en el clasificador celular FACS Aria II de Becton Dickinson (Becton Dickinson BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ EE.UU.). Los ajustes de FACS como límites umbral para "*forward scatter*" y "*side scatter*" ascendieron a 500 con una intensificación electrónica de 50 mV para "*forward scatter*" (filtro ND 1.0) y 550 mV para "*side scatter*". La excitación de EYFP tuvo lugar a una longitud de onda de 488 nm y la detección por medio de "*parameter gain*" (PMT) de 530 a 30 a 625 mV. La excitación de Crimson tuvo lugar a una longitud de onda de 633 nm y la detección por medio de PMT de 660 a 20 a 700 mV. Se clasificaron 2 millones de células Crimson-positivas en 20 ml de CGXII-Kan25 y el cultivo se cultivó durante 22 horas a 180 rpm y 30 °C. A continuación se añadió de nuevo isopropil-β-D-tiogalactopiranosido en una concentración final de 0,1 mM. Después de 2 horas más se analizaron 18.000.000 células con una velocidad de análisis de 10.000 partículas por segundo en cuanto a la fluorescencia de Crimson y EYFP, y se separaron 580 células que se leyeron automáticamente con ayuda del clasificador celular FACS Aria II

sobre placas de BHIS-Kan25. Las placas se incubaron durante 16 h a 30 °C. De las 580 células leídas crecieron 270. Todas estas se transfirieron en 0,8 ml de CGXII-Kan25 a placas de microtitulación, y se cultivaron durante 48 h a 400 rpm y 30 °C. Las placas se centrifugaron durante 30 min a 4 °C en el rotor de placas de microtitulación a 4000 x g, los sobrenadantes se diluyeron con agua 1 : 100 y se analizaron por medio de HPLC. Se identificaron 185 clones como formadores de lisina. Para la caracterización detallada se llevó a cabo de nuevo un análisis de 40 de estos clones para detectar la formación de producto en 50 ml de CGXII-Kan25 en matraces con agitación. Mientras que de la cepa de partida ATCC13032 pSenLysTK-C no se separaba nada de lisina, los 40 mutantes forman diferentes cantidades de lisina, en la región de 2 - 35 mM (Figura 7).

10 d) Identificación de mutaciones en *lysC*, *hom*, *thrB* y *thrC*

Para la caracterización adicional de los 40 mutantes se aisló su ADN cromosómico por medio del kit DNeasy de Quiagen (Quiagen, Hilden, Alemania). El gen *lysC* se amplificó con los cebadores *lysC*-32F (SEQ. ID. N.º 58) y *lysC*-1938R (SEQ. ID. N.º 59), y los amplicones se secuenciaron en Eurofins MWG Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania).

lysC-32F 5'-GAACATCAGCGACAGGACAA-3'
lysC-1938R 5'-GGGAAGCAAAGAAACGAACA-3'

20 Se obtuvieron las mutaciones ya conocidas T311I, T308I, A279T, A279V y A279T. Adicionalmente se obtuvieron las nuevas mutaciones H357Y (cac->tac), T313I (acc->atc), G277D (ggc->gac) y G277S (ggc->agc). Entre paréntesis está indicado en cada caso el triplete codificante del tipo salvaje, y a continuación el mutado correspondiente del mutante.

25 El gen *hom* se amplificó con los cebadores *hom*-289F (SEQ. ID. N.º 60) y *thrB*-2069R (SEQ. ID. N.º 61), y los amplicones se secuenciaron en Eurofins MWG Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Alemania).

hom-289F 5'-CCTCCCCGGGTTGATATTAG-3'
thrB-2069R 5'-GGCCAGCACGAATAGCTTTA-3'

30 Se obtuvieron las nuevas mutaciones A346V (gct->ggt), V211F (gtc->ttc), G241S (ggt->agt), A328V (gct->ggt), T233I (acc->atc), así como la mutación doble R158C (cgc->tgc) T351I (acc->atc).

35 La secuenciación adicional de *thrB* en los mutantes con el par de cebadores *hom*-1684F (SEQ. ID. N.º 62) y *thrB*-2951R (SEQ. ID. N.º 63) dio como resultado la nueva mutación S102F (tcc->ttc).

hom-1684F 5'-AGGAATCTCCCTGCGTACAA-3'
thrB-2951R 5'-CCGATTCATCCAAGAAAGC-3'

40 La secuenciación adicional de *thrC* en los mutantes con el par de cebadores *thrC*-22F (SEQ. ID. N.º 64) y *thrC*-2046R (SEQ. ID. N.º 65) dio como resultado la nueva mutación A372V (gcc->gtc).

thrC-22F 5'-GCCTTAAAACGCCACTCAAT-3'
thrC-2046R 5'-GGCCGTTGATCATTGTTCTT-3'

45 e) Identificación de una mutación en *murE*

Para la identificación adicional de mutaciones en mutantes que no presentan mutaciones ni en *lysC*, ni *hom*, *thrB* o *thrC*, se secuenció adicionalmente *murE*. El gen *murE* se amplificó con los cebadores *murE*-34F (SEQ. ID. N.º 66) y *murE*-1944R (SEQ. ID. N.º 67), y los amplicones se secuenciaron en GATC (GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, 78467 Konstanz).

murE-34F 5'-AACTCCACGCTGGAGCTCAC-3'
murE-1944R 5'-AGAACGCGGAGTCCACG-3'

55 Se determinó la secuencia génica de *murE* (SEQ. ID. N.º 69), que presenta una transición de C a T en el nucleótido 361 (ctc->ttc), lo que en la proteína MurE (SEQ. ID. N.º 68) lleva al cambio de aminoácido L121F en la posición 121 de la proteína.

60 f) Repercusión de la mutación de *murE* sobre la formación de lisina en el tipo salvaje

Por medio de los cebadores 7-39-L-F (SEQ. ID. N.º 70) y 7-39-R-R (SEQ. ID. N.º 71) se amplificó 1 kb del gen *murE* con ADN cromosómico del mutante M39 de *C. glutamicum* del Ejemplo e) y por lo tanto se obtuvo un fragmento de *murE*, que porta la mutación recién identificada. El amplicón obtenido se clonó a través de *Bam*HI y *Sal*I en el vector pK19mobsacB no de replicación en *C. glutamicum* (Schäfer et al., Gene 1994; 145:69-73) y se introdujo por medio de recombinación homóloga en el genoma de tipo salvaje (Tauch et al., Curr. Microbiol. 45 (2002), páginas 362-7; Schäfer et al., Gene 1994; 145:69-73). La cepa resultante *C. glutamicum* Lys39 se cultivó a continuación en 50 ml de

BHIS-Kan25 a 30 °C y 130 rpm durante 12 h. A partir de este cultivo se transfirieron 500 µl a 50 ml de CGXII-Kan25, y se cultivó de nuevo a 30 °C y 130 rpm durante 24 h. A partir de esto se inocularon los 50 ml de cultivo principal de CGXII con una DO inicial de 0,5 y se cultivó durante 48 h a 130 rpm y 30 °C. El sobrenadante de cultivo se diluyó con agua 1 : 100, y se determinó por medio de HPLC la concentración de L-lisina obtenida en la Tabla 1.

5

7-39-L-F 5'-TAGGATCCCGACAACATCCCCTGTCTG-3'
7-39-R-R 5'-AAGTCGACGTCTGCTTCTTGCCCAAGG-3'

Tabla 1

Cepa	L-lisina (mM)
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	0,5
<i>C. glutamicum</i> Lys39	3,4
<i>L-lisina en el sobrenadante de C. glutamicum</i>	

10

SECUENCIAS

SEC ID N° 01

agtttgcgca tgagacaaaa tcaccggttt tttgtgttta tgcggaatgt ttatctgccc 60
cgctcggcaa aggcaatcaa ttgagagaaa aattctcctg ccggaccact aagatgtagg 120
ggacgctga 129

15

SEC ID N° 02

ctattcgcgc aaggatcatgc cattggccgg caacggcaag gctgtcttgt agcgcacctg 60
tttcaaggca aaactcgagc ggatattcgc cacacceggc aaccgggtca ggtaatcgag 120
aaaccgctcc agcgcctgga tactcggcag cagtaccgc aacaggtagt ccgggtcgcc 180
cgatcatcagg tagcactcca tcacctcggg ccgttcggca atttcttctc cgaagcggtg 240
cagcgactgc tctacctgtt tttccaggct gacatggatg aacacattca catccagccc 300
caacgcctcg ggcgacaaca aggtcacctg ctggcggatc acccccagtt ctccatggc 360
ccgcacccgg ttgaaacagc gcgtggcga caggttgacc gagcgtgcca gctcggcgtt 420
ggatgatcgg gcgttttctt gcaggctgtt gagaatgccg atatcggtac gatcgagttt 480
gcgcat 486

20

SEC ID N° 03

aacctatagt gaatgtgtct gaaaataacg acttcttatt gtaagcgtta tcaatcgcga 60
agttgacttg aaaagccgac atgacaatgt ttaaatggaa aagtc 105

SEC ID N° 04

atggctttat tacaaaaaac aagaattatt aactccatgc tgcaagctgc ggcagggaaa 60
ccggtaaact tcaaggaaat ggcggagacg ctgcgggatg taattgatc caatattttc 120
ggtgtaagcc gcagaggaa actccttggg tattcaatta accagcaaat tgaaaatgat 180
cgtatgaaaa aaatgcttga ggatcgtcaa ttccctgaag aatatacga aaatctgttt 240
aatgtccctg aaacatcttc taacttggat attaatagt aatatactgc tttccctgtt 300
gagaacagag acctgtttca agctggttta acaacaattg tgccgatcat cggaggcggg 360
gaaagattag gaacacttat tctttcgcgt ttacaagatc aattcaatga cgatgactta 420
attctagctg aatcggcgc aacagttgtc ggaatggaaa tcctaagaga aaaagcagaa 480
gaaattgaa aggaagcaag aagcaaaact gtcgtacaaa tggtatcag ctctgtttct 540
tacagtgagc ttgaagcaat tgagcacatt tttgaggagc ttgacggaaa tgaaggcttt 600
cttgttgcaa gtaaaattgc tgaccgtgct ggcattacc gttctgttat tgtgaacgca 660
ctcagaaaagc tggagagcgc cgggtgtatc gagtctagat cattaggaat gaaaggtaact 720
tatatcaagg tactaaacaa caaattccta attgaattag aaaatctaaa atctcattaa 780

25

SEC ID N° 05

tgttgttttt atgtcagtga gcggcgttt tcgtaggcgt atttggaaaa atttaagccg 60
gtccgtggaa taagcttata acaaaccaca agaggcgggt gccatg 106

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 06

tcaaatatgc ttctgtgcca ccggaatcac ccgcttctcc ttcaccgcct tgaacgagaa 60
 gctcgaatag atctccttca cccccggcag ccgctgcagt acctcgcggg tgaactcgc 120
 gaacgactcc agatccccgc ccagaatctc cagcaggaag tcatagcgcc cggagatgtt 180
 gtggcacgcc acgatttcgg ggatatccat cagccgctgc tcgaatgccc gggccatctc 240
 cttgctgtgc gaatccatca tgatgctgac gaaggcggtc actccgaagc ccagtgcctt 300
 gggtgacagg atggcctgat agccggtgat gtagcccgac tcctccagca gcttgaccgc 360
 ccgccagcac ggcgaggtgg tcagggcgac gctgtcggcg agctcggcca cggtcagtcg 420
 ggcattgtct tgcagcgcgg ccagcagtgcc gcggtcggta cggtcgatgg cgctaggcat 480

SEC ID N° 07

tttttagacc ttgcgcgatt tcgtagcgcc gataaccttt atcatctggt tccagggctg 60
 ccttgatgg cgacacctcc aggcttgaat gaatctcttg cgttttttgc aactacaat 120
 catcacacaa ttgccgggta gttttgttgc cagtttgccg acctcaacta ggctattgtg 180
 caatat 186

5

SEC ID N° 08

atgaagctag attccattga tcgcgcaatt attgcggagc ttagcgcgaa tgcgcgcac 60
 tcaaatctcg cactggctga caaggctgat ctactccgg gaccttgctt gaggagggtg 120
 cagcgtttgg aagccgaagg aatcattttg ggctacagcg cggacattca ccctgcgggtg 180
 atgaatcgtg gatttgaggt gaccgtggat gtcactctca gcaacttca ccgctccact 240
 gtagacaatt ttgaaagctc cgttgccgag catgatgaag tactggagtt gcacaggctt 300
 tttggttcgc cagattattt tgtccgcac gccggttctg atttgaggc gtatgagcaa 360
 tttttatcca gtcacattca aaccgtgcca ggaattgcaa agatctcacc acgttttgc 420
 atgaaagtgg tgaaccagc tcgccccag gtgtga 456

10

SEC ID N° 09

aacttattcc cttttcaact tccaaatcac caaacgggat ataaaaccgt tactccttc 60
 acgtccgta taatatgat ggctattag 89

SEC ID N° 10

atgaattac aacaacttcg ctatattgtt gaggtggta atcataacct gaatgtctca 60
 tcaacagcgg aaggacttta cacatcacia cccgggatca gtaacaagt cagaatgctg 120
 gaagacgagc taggcattca aattttttcc cgaagcggca agcacctgac gcaggtaacg 180
 ccagcagggc aagaaataat tcgtatcgct cgcgaagtc tgtcgaaagt cgatgceata 240
 aaatcgggtg ccggagagca cacctggccg gataaagggt cactgtatat cgcaccacg 300
 catacccagg cacgctacgc attaccaaac gtcacaaag gctttattga gcgttatcct 360
 cgcgtttctt tgcatacgca ccagggtcgc ccgacacaaa ttgctgatgc cgtctctaaa 420
 ggcaatgctg atttcgctat cgcacagaa gcgctgcatc tgtatgaaga tttagtgatg 480
 ttaccgtgct accactggaa tcgggtatt gtagtcactc eggatcacc gctggcaggc 540
 aaaaaagcca ttaccattga agaactggcg caatatccgt tggtgacata taccttcggc 600
 tttaccggac gttcagaact ggatactgcc ttaatcgcg cagggttaac gccgcgtatc 660
 gttttcacgg caacggatgc tgacgtcatt aaaacttacg tccggttagg gctgggggta 720
 ggggtcattg ccagcatggc ggtggatccg gtcgcgatc ccgaccttgt gcgtgtgat 780
 gctcacgata tcttcagcca cagtacaacc aaaattggtt ttcgccgtag tactttcttg 840
 cgcagttata tgtatgattt cattcagcgt tttgcaccgc atttaacgcg tgatgctggt 900
 gatgcggctg tcgcattgcy ctctaataaa gaaattgagc tcatgtttaa agatataaaa 960
 ctgccggaaa aataa 975

15

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 11

tttttattac ataaatttaa ccagagaatg tcacgcaatc cattgtaaac attaaatggt	60
tatcttttca tgatatcaac ttgcgatcct gatgtgttaa taaaaaacct caagttctca	120
cttacagaaa cttttgtggt atttcaccta atcttttagga ttaatccttt tttcgtgagt	180
aatcttatcg ccagtttggg ctggtcagga aatagttata catcatgacc cggactccaa	240
attcaaaaat gaaattagga gaagagcatg	270

5

SEC ID N° 12

ttattctgaa gcaagaaatt tgtcgagata aggtacaaca taaggaacag aagtctggaa	60
tataccattt tcaatccagt aaagggtggt tgcccctggg cgtaaattaa aggcggtgag	120
atatgcatca gctgcttccc ggttcacccc cttcatttca taaaccttgc caagcaacac	180
ataatttagc caggacattt caagatcaat gccagtatct atcgctggt aagactcatc	240
tgttttacct ttaaccagag cactgaccgc ttttatttga tatataatgg acaggttgtt	300
caattccggc agtgtaacaa tgttatctat ttctgtgttc agtgctgcta attgttttct	360
atctaaagga tgttgagaat ggcgcacgat atcaactaat gctttttctg ctctcgcgta	420
ggtaaattct ggggatgatt gaacaatctc acctaaatct tcaactggac ggttcaatga	480
tttatcatcg ccatgcagta aataatcatg tgccctgataa aaattagtta ataacgcacc	540
acgatgcggc aaaattttct ggagcgtctc ctgcatcctg tgtggccacg gttggtttaa	600
cgcttttgat aaactctcca gtaaatcatt ttgaaatgcc agctgattac cgttagtgat	660
gacataacgt ttatccagca tggttgaacc atctgcattg tctaccaatt ttatcgacat	720
aaagcattgt tgagcacggt attggcgcgt attaacaac gcaatagata atgttttacc	780
ggaactgctc ggttcacaa tgtttagtct gattttgtca tgcaccataa aggtggagaa	840
ggtgttaagt gatgtcgcca ccaaatcacc cagcctatc gcgtaagaga gctgatacgg	900
ggaactccag ctgttacaac ttttatttac catattaatg tcaatatcgc gtggattgag	960
caaaatagc gatattgctca taggaagacg tgtatcaaga cttgaaaacg ctaccagtgc	1020
tacacagata cctaacgaca acaggaaaa aaaccatacc caaaaggtag tgaatcgttt	1080
gcttttaact ggggattggt cagggtggct tgcggtgttt tgaatgttaa gactgtggga	1140
gggagaatct gtggcaggaa ccgcctctgg tataggggga ggcgagata gcattatttc	1200
ctctccctct tcttcgctgt accagataac cggcaccatt aatttatagc cgcgcttgg	1260
tacagtagcg atatagacag gactatcttc atcattatct tttaatgact tacgtagtct	1320
tgagatactc tgcgtcacia cgtgattggt gacaatactt ctcttcaga cattatcgat	1380
aagttcatcc ctgctaagta cttcgccact gtgttgagca aagaaaacca gaagatcgat	1440
taatctcggc tcaagggtaa gttgacgcc attgcgctca atttggttta tggacggagt	1500
aacaagccat tcgccaacgc gaactacagg ttgttgcct	1539

10

SEC ID N° 13
tagaccaaga tgttca 16

SEC ID N° 14

ctaaattgag tagtccgag gtggagccga caacaactgc cgagccaaat cgcgagccgt	60
ctcaagagga ctgatgttgt ggaccaatcg agatccagca agtccaccat caaggaacac	120
caacagctga ttcgcctggg tgggtgcctgg gttagccgttc ttctcagtga gcaaatcagt	180
cagagtctta tgacaccact cgcggtgctc taacactgct gcaacaatgc ccttttcgct	240
atcagtttct gggcgagggt actcactagc cgcattctga aagtgcgagc cgcggaaatc	300
ttttctggt tcttctcaa tgcactgate aaagaaocgg atgattttat ctccggatc	360
cttcataacc acggtgcgct cagccacgc ttcacgccac agctgatcga ggttctccag	420
gtatgcaata accaaggcgt ccttcgatcc gaaaagggaa tagaggctcg ccttcgccac	480
gtcagcttca cggaggatac gatcaatacc gatgacgca atacctctg tgggaaaag	540
gttggttgct ctatcgagga gacgctgctg ggggcttggg cgattgagc gacggtttgc	600
cccggcactt gttttactct tgcctgaagc gctagcagcc ac	642

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 15

cttattagtt tttctgattg ccaattaata ttatcaattt cgcctaataa caatcccgcg 60
 atatagtctc tgcacagat acttaattcg gaatatccaa c 101

SEC ID N° 16

atgaaacgcc cggactacag aacattacag gcaactggatg cggatgacg tgaacgagga 60
 tttgagcgcg cggcacaana gctgtgcatt acacaatcag ccgtctcaca gcgcattaag 120
 caactggaaa atatgttcgg gcagccgctg ttgggtcgtg ccgtaccgcc gcgcccgcg 180
 gaacaagggc aaaaactgct ggcactgctg cgccagggtg agttgctgga agaagagtgg 240
 ctgggcgatg aacaaaccgg ttcgactcgg ctgctgcttt cactggcggg caacgccgac 300
 agtctggcga cgtgggtgct tccctgactg gctcctgtgt tggctgatte gcctatccgc 360
 ctcaacttgc aggtagaaga tgaaccgcc actcaggaac gtctgcgcgg cggcgaagtg 420
 gtcgcccgcg tgagtattca acatcaggcg ctgcccaggt gtcttgctga taaacttggg 480
 gcgctcgact atctgttcgt cagctcaaaa cctttgccc aaaaatattt ccctaaccggc 540
 gtaacgcggt cggcattact gaaagcgcca gtggctcggg ttgaccatct tgacgatatg 600
 caccaggcct ttttgagca aaacttcgat ctgcctccag gcagcgtgcc ctgccatctc 660
 gttaattctt cagaagcgtt cgtacaactt gctcgcagg gcaccacctg ctgtatgatc 720
 ccgcacctgc aaatcgagaa agagctggcc agcgggtaac tgattgactt aacgcctggg 780
 ctatttcaac gacggatgct ctactggcac cgtttgctc ctgaaagccg catgatgctg 840
 aaagtccactg atgcgttact cgattatggt cacaagtcc ttcgtcagga ttaa 894

5

SEC ID N° 17

gcaaagtgtc cagttgaatg gggttcatga agctatatta aacctgtta agaaccaatc 60
 atttactta agtacttcca taggtcacga tgggatcat ggaatcttc 110

10

SEC ID N° 18

atgaaacca ttcaactgga cactttgctc tcaatcattg atgaaggcag cttcgaaggc 60
 gccctcctag ccctttccat ttccccctg gcgggtgagc agcgcgttaa agctctcgag 120
 catcacgtgg gtcgagtgtt ggtatcgcgc acccaaccgg ccaaagcaac cgaagcgggt 180
 gaagtccctg tgcaagcagc gcggaanaatg gtgttgctgc aagcagaaac taaagcgcaa 240
 ctatctggac gccttgctga aatcccgtta accatcgcca tcaacgcaga ttctctatcc 300
 acatggtttc ctcccgtgtt caacgagga gcttcttggg gtggagcaac gctcacgctg 360
 cgcttggaa atgaagcgca cacattatcc ttgctcgggc gtggagatgt tttaggagcg 420
 gtaaccctg aagctaacc cgtggcggga tgtgaagtag tagaacttgg aacctgcgc 480
 cacttggcca ttgcaacccc ctcaattcgg gatgcctaca tggttgatgg gaaactagat 540
 tgggctgca tgcctctctt acgcttcggg ccaaaagatg tgcttcaaga ccgtgacctg 600
 gacggcgcg tcgatgttcc tgtggggcgc aggcgcgtat ccattgtccc gtcggcggaa 660
 ggttttgggt aggcaattcg ccgagccctt ggttggggac ttcttcccga aaccaagct 720
 gctcccatgc taaaagcagg agaagtgate ctctcgatg agatacccat tgacacaccg 780
 atgtattggc aacgatggcg cctggaatct agatctctag ctgactcac agacgcctc 840
 gttgatgcag caatcgaggg attgcggcct tag 873

SEC ID N° 19

gtaccggata ccgcaaaaag cgagaagtac gggcaggtgc tatgaccagg actttttgac 60
 ctgaagtgcg gataaaaaca gcaacaatgt gagcttctgt gtaattatat tgtaaacata 120
 ttgctaana tttttacatc cactacaacc atatcatcac aagtggctag acctctaca 180
 agtaaggggc ttttcggt 198

15

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 20

atggtcatta aggcgcaaag cccggcgggt ttcgcggaag agtacattat tgaaagtate 60
 tggataaacc gcttccctcc cgggactatt ttgcccgcag aacgtgaact ttcagaatta 120
 attggcgtaa cgcgtactac gttacgtgaa gtgttacagc gtctggcacg agatggctgg 180
 ttgaccattc aacatggcaa gccgacgaag gtgaataatt tctgggaaac tcccggttta 240
 aatatccttg aaacactggc gcgactggat cacgaaagtg tgcccagctc tattgataat 300
 ttgctgtcgg tgcgtaccaa tatttccact atttttatc gcaccgcgct tgcgtcagcat 360
 cccgataaag cgcaggaagt gctggctacc gctaataaag tggccgatca cgcctgatgc 420
 tttgccgagc tggattacaa catattccgc ggccctggcg ttgcttccgg caacccgatt 480
 tacggctcga tctttaacgg gatgaaaggg ctgtatacgc gtattggctg tcaactattc 540
 gccaatccgg aagcgcgcag tctggcgctg ggcttctacc aaaaactgtc gccgttgtgc 600
 agtgaaggcg cgcacgatca ggtgtacgaa acagtgcgct gctatgggca tgagagtggc 660
 gagatttggc accggatgca gaaaaatctg ccgggtgatt tagccattca ggggcgataa 720

5 SEC ID N° 21

ttaatttgca tagtggcaat tttttgccag actgaagagg tcataccagt tatgacctct 60
 gtacttataa caacaacgta aggttattgc gctatgcaaa cacaaatcaa agttcgtgga 120
 tatcatctcg acgtttacca gcacgtcaac aacgcccgcct accttgaat 169

SEC ID N° 22

atgggcgtaa gagcgcaaca aaaagaaaa accccgcgct cgetgggtgga agccgcattt 60
 agccaattaa gtgctgaacg cagcttcgcc agcctgagtt tgcgtgaagt ggcgcgtgaa 120
 gcgggcattg ctcccacctc tttttatcgg catttccgcg acgtagacga actgggtctg 180
 accatgggtg atgagagcgg tttaatgcta cgccaactca tgcgccagc gccgtcagcgt 240
 atcgccaaag gcgggagtgat gatccgcacc tgggtctcca catttatgga gttcactcgt 300
 aataatccta acgccttcgg gttattattg cgggaacgct ccggcacctc cgtgcgcttt 360
 cgtgccgccc ttgcgcgtga aattcagcac ttcattgcgg aacttgcgga ctatctggaa 420
 ctcgaaaacc atatgccgcg tgcgtttact gaagcgcaag ccgaagcaat ggtgacaatt 480
 gtcttcagtg cgggtgccga ggcgttggac gtcggcgtcg aacaacgtcg gcaattagaa 540
 gagcgcactg tactgcaact gcgaatgatt tggaaagggg cttattactg gtatcccgct 600
 gaacaagaga aaaccgcaat tattccggga aatgtgaagg acgagtaa 648

10 SEC ID N° 23

ccgtcatact ggctcctgta tgtcgtcaac acggcgaaat agtaatcacg acgtcaggtt 60
 cttaccttaa attttcgacg gaaaaccacg taaaaaacgt cgatttttca agatacaagc 120
 gtgaattttc aggaaatggc ggtgagcatc ac 152

SEC ID N° 24

atcaccacaa ttcagcaaat tgtgaacatc atcacgttca tctttccctg gttcccaatg 60
 gccattttc ctgtagtaac gagaacgtcg cgaattcagg cgctctttag actggctcgt 120
 atgaaattca gcaggatcac attatgacc 149

15 SEC ID N° 25

gtggcgcate agttaaaact tctcaaagat gatttttttg ccagcgacca gcaggcagtc 60
 gctgtggctg accgltatcc gcaagatgic tttgctgaac atacacatga tttttgtgag 120
 ctggtgattg tctggcgcgg taatggcctg catctggttt tgcagaatat tattttattg 180

ES 2 560 302 T3

ccggagcgtc tgaagctgaa tcttgactgg cagggggcga ttccgggatt taacgccagc 240
 gcagggcaac cacactggcg cttaggtagc atggggatgg cgcagggcgc gcaggttacc 300
 ggtcagcttg agcatgaaag tagtcagcat gtgccgtttg ctaacgaaat ggctgagttg 360
 ctgttcgggc agttggatgat gttgctgaat cgccatcgtt acaccagtga ttcggtgccg 420
 ccaacatcca gcgaaacggt gctggataag ctgattacce ggctggcggc tagcctgaaa 480
 agtccctttg cgctggataa attttggatg gaggcatcgt gcagtgagcg cgttttgcgt 540
 cagcaatttc gccagcagac tggaatgacc atcaatcaat atctgcgaca ggtcagagtg 600
 tgtcatgcgc aatatcttct ccagcatagc cgctgttaa tcagtgatat ttcgaccgaa 660
 tgtggctttg aagatagtaa ctatttttcg gtgggttta cccgggaaac cgggatgacg 720
 ccagccagt ggcgtcatct caattcgcag aaagattaa 759

SEC ID N° 26

gtggcgcacc agttaaaact tctcaaagat gatttttttg ccagcgacca gcaggcagtc 60
 gctgtggctg accgttatcc gcaagatgct ttgctgaac atacacatga tttttgtgag 120
 ctggtgattg tctggcgcgg taatggcctg catgtactca acgatcgccc ttatcgcatt 180
 acccgtggcg atctctttta cattcatgct gacgataaac actcctacgc ttcggtaac 240
 gatctggttt tgcagaatat tttttattgc ccggagcgtc tgaagctgaa tcttgactgg 300
 cagggggcga ttccgggatt taacgccagc gcagggcaac cacactggcg cttaggtagc 360
 atggggatgg cgcagggcgc gcaggttacc ggtcagcttg agcatgaaag tagtcagcat 420
 gtgccgtttg ctaacgaaat ggctgagttg ctgttcgggc agttggatgat gttgctgaat 480
 cgccatcgtt acaccagtga ttcggtgccg ccaacatcca gcgaaacggt gctggataag 540
 ctgattacce ggctggcggc tagcctgaaa agtccctttg cgctggataa attttggat 600
 gaggcatcgt gcagtgagcg cgttttgcgt cagcaatttc gccagcagac tggaatgacc 660
 atcaatcaat atctgcgaca ggtcagagtg tgtcatgcgc aatatcttct ccagcatagc 720
 cgctgttaa tcagtgatat ttcgaccgaa tgtggctttg aagatagtaa ctatttttcg 780
 gtgggttta cccgggaaac cgggatgacg ccagccagt ggcgtcatct caattcgcag 840
 aaagattaa 849

5

SEC ID N° 27

tatcggaaaa aatctgtaac atgagataca caatagcatt tatatttgct ttagtatctc 60
 tctcttgggt gggattc 77

SEC ID N° 28

gtaattgtgg ctagagtaac aaagactaca aaaccttggg catgggcttg ttactttgaa 60
 attcatcgac gctaag 76

10

SEC ID N° 29

cctcgeccct catttgtaac gtctgttacc tttacotgaa acagatgaat gtagaattta 60
 taaaactagc atttgat 77

15

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 30

atgatcgtga cacaagataa ggcctagca aatgttttc gtcagatggc aaccggagct	60
tttctcctg ttgtcgaac gttgaacgc aataaaacga tctttttcc tggcgatcct	120
gccgaacgag tctactttct ttgaaaggg gctgtgaaac tttccagggg gtacgaggca	180
ggagaagaga ttacagtagc actactacgg gaaaatagcg tttttgggtg cctgtctttg	240
ttgacaggaa acaagtcgga taggttttac catgcggtgg catttactcc agtagaattg	300
ctttctgcac caattgaaca agtggagcaa gcactgaagg aaaatcctga attatcgatg	360
ttgatgctgc ggggtctgtc ttgcgggatt ctacaaacag agatgatgat tgaaacctta	420
gvcgaccgag atatgggttc gagattggtg agttttctgt taattctctg tcgtgatatt	480
gggtttcctt gtgcagatgg aatcacaatt gatttaaagt tatctcatca ggcgatcgcc	540
gaagcaattg gctctactcg cgttactgtt actaggctac taggggattt gcgggagaaa	600
aagatgattt ccattccaaa aaagaagatt actgtgcata aacctgtgac tctcagcaga	660
cagttcactt aa	672

SEC ID N° 31

atgaccaacg cgcgattgag agctctggtc gaactggcgg ataccggttc ggtgcgcgcc	60
gctgctgagc gactcgtggt caccgaatct tccatctcct cggctttacg cgcattgagc	120
aacgacatcg gcatcagctt ggtcgaccgg catggccgag gggcgcggtt gactcctgcc	180
ggcctgcgtt acgtcgaata cgcgcggcgg atcctcggct tgcacgacga ggcgatattg	240
gctgcccgcg gagaggccga cccggagaat ggctcgatcc ggtcggtgct ggtcacctcc	300
gvcgggggaa tgctcatccc cgcgcggtt gcatcgttcc gtgcccgtg ccccgggtgc	360
gttctgcabc tggaggtggc ggcgcgcagc ttgggtgtgg ctatgctggc ccgccacgag	420
gtcgacctcg ttgtggcggg acggccgccc gacgaattgg tccggaaaagt gtgggtgcyg	480
gccgtcagcc cgaacgcgct tctcgtcgtg ggaccaccgc cggtagcga gggattccag	540
cccgccaccg cgacctggct gctgctgag accggatccg gtaccgcctc tacgttgacg	600
gcactgcttg acgacctcga tctcgcgcca cctcaattgg tctcggatc gcacggcgcg	660
gtggttgccg cggcgggtggc cgggctgggc gtgacgttgg tctcgcgca ggcgtgtcag	720
cgcgaactgg ccgccggcgc actcgtcga ctgccggtgc ccggtactcc gataagccgg	780
ccatggcatg ttgtcagcca gatcagtcgg acgatgtcga ccgaactgct catcaagcac	840
ctctgtccc agcagacct gggctggcgc gatatcaaca ccaccttcg gggagccgtt	900
accgctga	909

5

SEC ID N° 32

gtgctggtcc cgcaccgggc ggtggacagc ttccggcggc agctgaccgg ccgctacttc	60
ggcgcccccg acacctcccg cgaggcgtg ctcttctctg ccaactacgt cttecgactc	120

10

SEC ID N° 33

atggacgcag acgactgttg ggcgcggcgg ggcaccgtgc ggatccgctt gctcggcccg	60
gtggagctgg cctgcccac gcggccgggt ccggtgaccg ggcggcgcga gttgaggggtg	120
gtggccgcgc tcgcgctgga ggcggacagg gtgctctcca ccgcggggct gatcgcctcg	180

ES 2 560 302 T3

ttgtgggagg acgagccgcc gcgcaccgcc gcccggcagc tccagaccag cgtgtggatg 240
atccgcccgg cgtcgcctc ggtgggcgag ccgcagtgag tcgtccgctc caccgccgcc 300
ggctacctgc tcgaccggc ccaactacgaa ctgcacagcg accggttccg gcaecgggtg 360
ctgaaccgcc gggagttgca gcgggacggg cggctggccc aggcccgggc ccgggtcgac 420
gaggggctgg cgtgtggcg cggccccgcc ctccggcggg cggcggggcg cggactccag 480
ccccggccc gccggctgga ggaggaacgg gtcttcgccc tggagcagcg cggcgggctc 540
gacctcgcgc tcggccgcc caagacggcc atcggcgaac tcctcgacct catcgcccag 600
catccgctgc gcgaggcggc ctaccgccac ctgatgctcg ccctgtaccg ttccggcccgc 660
cagtcgcagc cgtcgcctc ctaccgcagg gcgcagcggg tgctcgcga cagctggcc 720
gtccgcccgc gccccgcct cgcggcctg gagcgggcca tcctcggca ggacgagtcg 780
ctgctggcgg gcggggcgt gccctga 807

SEC ID N° 34

tcaggggct gccccagca cgtcggctgc ccggaccagt acggccgagc gggtgccgat 60
cttcagccgc tccagggcct ttaccggagc caccgggac ttaccgctgc ggtcggtagc 120

5

SEC ID N° 35

ctaggaacc gcggacgtat cgggtggatg stcggatccc tctgcatcgc cgtgtgtcc 60
gggaagccc tgggcgaagg caaccagtc gccctgaaga cgggattcga ccccgagctt 120
cgccagtatc tggccatat gagcctgac ggtgcgctcg gtgacccga gcagcgggc 180
gatctcacgg ttggagtagc cgtggctcag caggaggaag acctggagct cgcggtcggg 240
gagtaaatgt acctggctga gccctccag ccaggggaac tggctcctct ggagaaatcg 300
atcgtcgcca gaatcactgg aatcgagcc ggaatatggc aaagtctggc ccccgatatga 360
gcgtgtggtc ctgcatgcc ctaagaggtc atccgacgca tcgagtatca aggcggcga 420
gggcgccacc actgaactat gaagacgtga gggcgatacc acccatgcga cgaatgggtc 480
ctggacatta ctcatctga tcatcttacc gcactacgg ccgggttggg gcgccttggg 540
gccgctgct gtcgtgagca gggcccgcg aggcgtgggc aaggcggata aggcggcccg 600
tgcccgggtg gtgcacggca a 621

SEC ID N° 36

catcacgaac ctccagcctg gggatcggcc tccggcagca tttatagac gtttgcttat 60
cgatccggtt tcacattcac ccgcagtgat aaggaattga taaacgattt tccatgcctg 120
agcggactat 130

10

SEC ID N° 37

gtgcgcgagc gcgggcggc ggtccaggtc ggcggggcgc gccagcggac ggtgctggcg 60
acgtgctgc tcaacgccga ccgcgtggg tccgtggagc cgtggccga gacggctcgg 120
ggcggccggc ccccgtcgac cagccggagc caggtggcga tctgctgtgc cgcctgcgc 180
aaggcgttc gcgcgagcgg cggcagcag gtgatcgaga ccgtcgcgc ggggtacgtc 240
ctgcgctccg gcgggcaccg gctggacacc ctggacttcg acgaactggt ggcgctggcg 300

ES 2 560 302 T3

agggcggcgg cccggcaggg ccggggcgcg gaggccgtcc ggctgtacgg ctccggcgtc 360
 ggcgtgcgcc ggggccccgt gctggcgaac gtgaccggga cggtgcccga gcacctgtcc 420
 tggcagtggg aggagaccct gctcaccgcc tacgaggagc aggtcgagct gcgcctggcg 480
 ctgggcgagc accgcctgct ggtcgccggg ctccggcggc cggtcgagcg gcaccgcctg 540
 cgcgaccggc tctacggcct gctcatcacc gccacgtacc gctccggcca ccgggcccgc 600
 gcgctggaga cgttcgcccg gttgcggcgc cgctcggtcg acgagctcgg cctggagccc 660
 gggatggagc tgcgcggcct gcacgagcgc atcctgcgcg acgaggaccg cccggcggtc 720
 gagcggcccgc cgtcgcagct gcccgccgcg acgcaggtgt tcgtcgggcg cggccaggag 780
 ctggcgggtgc tggaccggct ggccggcggg gacgggcagg cgggcgcgcc gccgctcgga 840
 ctgctggtcg ggcgctcggc cgtgggcaag accgcgctgg cggtcggtg ggcgcaccgc 900
 aacgcggacc tgttccccga cggccagctg ttcgtcgacc tgggcgggca cggaccgcac 960
 caccgcccgt cggcccccg cgcctgctc gcgcacctgc tgcacgcgct gggcgtgccg 1020
 cccgagcggg tgcgggtcgc cgcgaacga cccgcyctgt tccgcaccgc gatggcccgc 1080
 cggcggatgc tgcgtgtgct ggaacgcgc cgcgacggcg cccaggtctg gccgctgctg 1140
 ccgaacaccg ccacctgcg ggtgctggtg acctcccgcg acccgctgcg cgagctggtc 1200
 gcccgacgcg gggcgggtgc gctgcccgtg ggcggcctcg ggttcgacga gtcctggcg 1260
 ctggtgcgcg gcatcatcgg cagggcgcg gccgggcgcg acccgacgc cctggtcggg 1320
 ctggtcgagc tggtcgagct gtgcccggcg gtgcccggcg cgctgctggc cgcgcgcgcg 1380
 caccggcca gcaaaccgca ctggggcgtg cccaggatgg tccgggagct caaccgcccg 1440
 cgcagcaggc tgtccggcct cggcgggtag cacctgcgcg accggctcgc ctccagcgc 1500
 cgctgcctgg acccggtggc ggccgacctg taccgggcgc tgggcggcct gccacgcccg 1560
 gagctgacgt cctggacggc cacggccctg ctgggctgct cgacaccgga ggcgacgac 1620
 gtgctggagc gctggtcga cgcgcacctg ctggagcccg cggggcggg cgcggcggc 1680
 gagagccact accggctgcc cagcctgtcc cagcctacg cggcgaactt gccacgaccg 1740
 gcccgta 1748

- SEC ID N° 38 cgcgatccc taagccgcaa tccctgattg 30
- 5 SEC ID N° 39 tccgatggac agtaaaagac tggccccaa agcag 35
- SEC ID N° 40 tgaggatcct tattactgt cagctcgtcc atgcccagag tgatcc 46
- 10 SEC ID N° 41 ctttactgt ccatcgaac tagctatggt gagcaagggc gaggagctgt tcacc 55
- SEC ID N° 42
tcaactgta tccccctgt ta 22
- 15 SEC ID N° 43
aaactcctt acttaaatgt ttgataaat aaa 33
- SEC ID N° 44
tacatatggt gagcaagggc ga 22
- 20 SEC ID N° 45
tagaattctt atctagactt gtacagctcg 30
- SEC ID N° 46
cggcgttca ctctgagtt cggc 24
- 25 SEC ID N° 47
tagaattctt atctagactt gtacagctcg 30

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 48

tcaactgcta tccccctgt tattaaaacg cttacattga ttattatagt catttaattt	60
taaatgtcta tacttttata aaataaatat aatcatattt ttttccggtt caccgtttta	120
taaatttttc tatggaagat tcattcataa tgtggtacac tcatcaacgg aaacgaatca	180
attaaatagc tattatcact tgtataacct caataatag gtttgagggt gtctaccagg	240
aaccgtaaaa tctgattac aaaatttgtt tatgacattt tttgtaatca ggattttttt	300
tatttatcaa aacatttaag taaaggagt tgttatggtg agcaaggcg aggagctgtt	360
caccggggtg gtgcccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagtccag	420
cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg	480
caccaccggc aagctgcccg tgcctggcc caccctctg accaccttcg gctaccggcct	540
gcagtgttc gcccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat	600
gcccgaaggc tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac	660
ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcctcgagc tgaaggcat	720
cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca	780
caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcacc aaggtgaact tcaagatccg	840
ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgcgcaccac taccagcaga acacccccat	900
cggcgacggc cccgtgctgc tgcgccaaa ccactacctg agctaccagt ccgcccctgag	960
caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagtctgtga ccgcccggg	1020
gatcactctc ggcatggagc agctgtacaa gtctagataa	1060

SEC ID N° 49

gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcctggctga gctggacggc	60
gacgtaaaac gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc caccctacggc	120
aagctgacct tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaacctc	180
gtgaccacct tcggctacgg cctgcagtgc ttcgcccgt accccgacca catgaagcag	240
cacgacttct tcaagtccgc catgcccga ggetacgtcc aggagcgcac catcttcttc	300
aaggacgacg gcaactacaa gaccccgccc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg	360
aaccgcatcg agctgaagg catcaacttc aaggaggacg gcaacatect ggggcacaag	420
ctggagtaca actacaacag ccacaactgc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc	480
atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcagggggc gcagcgtgca gctcgccgac	540
cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac	600
ctgagctacc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggctctg	660
ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcaet ctccggcatgg acgagctgta caagtctaga	720
taa	723

5

SEC ID N° 50

gcgcgatcc tcacacctg gggcgagctg 30

10

SEC ID N° 51

gcgccatag atatctctt cttaaagttc agcttgaatg aatctcttg c 51

15

SEC ID N° 52

gcgccatag gtgagcaagg gcgaggag 28

SEC ID N° 53

gcgctgcac ttatctagac ttgtacagct cgtc 34

20

SEC ID N° 54

cgatcctgac gcagattttt 20

SEC ID N° 55

ctcaccggct ccagatttat 20

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 56

ggatccttat	tactttgtaca	gctcgtccat	gccgagagt	atccccggcg	cggtcacgaa	60
ctccagcagg	accatgtgat	cgcgcttctc	gttggggct	ttgctcaggg	cgactcggta	120
gctcaggtag	tggttgtcgg	gcagcagcac	ggggccgctc	ccgatggggg	tyttctgctg	180
gtagtggtcg	gcgagctgca	cgtcgcgcgc	ctcgatggtg	tggcggatct	tgaagttcac	240
cttgatgccc	ttcttctgct	tgteggccat	gataataga	ttgtggctgt	tgtagttgta	300
ctccagcttg	tgccccagga	tgttgccgct	ctccttgaag	ttgatgccct	tcagctcgat	360
gctggttcacc	aggggtgtcgc	cctcgaactt	caectcggcg	cggtctctgt	agttgccgct	420
gtccttgaag	aagatggtgc	gctcctggac	gtagccttcg	ggcatggcgg	acttgaagaa	480
gtcgtgctgc	ttcatgtggt	cggggtagcg	ggcgaagcac	tgcaaggcgt	agccgaagg	540
ggtcacgagg	gtgggcccagg	gcacgggag	cttgccggtg	gtgcagatga	acttcagggt	600

cagcttgccc	taggtggcat	cgccctcgcc	ctcggccgac	acgctgaact	tgtggccggt	660
tagctcgcgg	tccagctcga	ccaggatggg	caccaccccg	gtgaacagct	cctcgcctt	720
gctcaccata	tgatatctcc	ttcttaaagt	tcatctaggt	ccgatggaca	gtaaaagact	780
ggccccaaa	agcagacctg	taatgaagat	ttccatgatc	accatcgtga	cctatggag	840
tacttaagta	aaatgattgg	ttcttaacat	ggtttaatat	agcttcatga	accccatca	900
actggacact	ttgctctcaa	tcattgatga	aggcagcttc	gaaggcgcct	ccttagccct	960
ttccatttcc	ccctcggcgg	tgagtcagcg	cgtaaagct	ctcagcctc	acgtgggtcg	1020
agtgttggtg	tcgcgacccc	aaccggccaa	agcaaccgaa	gcgggtgaag	tccttgtgca	1080
agcagcgcgg	aaaatggtgt	tgctgcaagc	agaaactaaa	gcgcaactat	ctggacgcct	1140
tgctgaaatc	ccgtaacca	tcgccatcaa	cgcagattcg	ctatcccat	ggtttctcc	1200
cgtgttcaac	gaggtagctt	cttgggggtg	agcaacgctc	acgctgcgct	tggaaagatga	1260
agcgcacaca	ttatccttgc	tgccgctggt	agatgtttaa	ggagcggtaa	cccgtgaagc	1320
taatcccgtg	gcgggatgtg	aagtagtaga	acttggaaac	atgcgccact	tgccattgct	1380
aacccccca	ttgcgggatg	cctacatggt	tgatgggaaa	ctagattggg	ctgcgatgcc	1440
cgtcttacgc	ttcgggtccc	aagatgtgct	tcaagaccgt	gacctggacg	ggcgcgtcga	1500
tggctctgtg	gggcgcagge	gcgtatccat	tgtcccgtcg	gcggaagggt	ttgggtgaggc	1560
aattcgcgca	ggccttggtt	ggggacttct	tcccgaacc	caagctgctc	ccatgctaaa	1620
agcaggagaa	gtgatcctcc	tcgatgagat	acccattgac	acaccgatgt	attggcaacg	1680
atggcgctg	gaaatctagat	ctctagctag	actcacagac	gccgtcgttg	atgcagcaat	1740
cgagggatgg	cggccttagg	tcgac				1765

ES 2 560 302 T3

SEC ID N° 57

ggatcccag	aaaggaaggg	aagaaagcga	aaggagcggg	cgctaggggc	ctggcaagt	60
tagcgggtcac	gctgcccgt	accaccacac	ccgcccgcct	taatgccc	ctacagggcg	120
cgccccattc	gccaatccc	atatagttcc	tcctttcagc	aaaaaacccc	tcaagacccg	180
tttagagggc	ccaaggggtt	atgctagtta	ttgctcagcg	gtggcagcag	ccaactcagc	240
ttcctttcgg	gctttcgttag	cagccggatc	tcagtgggaa	ttcctactgg	aacaggtggt	300
ggcgggcctc	ggcgcgctcg	tactgctcca	ccacgggtga	gtcctcgttg	tgggaggtga	360
tgtcgaagct	gtagtccacg	tagtggtagc	cgggcagctt	cacgggcttc	tgggcatgt	420
agatggactt	gaactcacac	aggtagtggc	cgcccctctt	cagcttcagc	gccatgtggt	480
tctcgccctt	cagcacgccc	tcgcccgggt	agttgcgctc	agtggagggc	tcccagccca	540
gagtccttct	ctgcattacg	gggcccgtcg	aggggaagtt	cacgcccgat	aacttcacgt	600
ggtagatgag	ggtgcccgtc	tgcaaggagg	agtcctgggt	cacggtcacc	acgcccggct	660
cctcgaagtt	catcacgccc	tcccacttga	agccctcggg	gaaggactgc	tggaggtagt	720
cggggatgtc	ggcgggggtg	ttgatgtacg	ccttgaggcc	gtagaagaac	tggggggaca	780
ggatgtccca	ggcgaagggc	agggggcccg	ccttggtcac	ttgcagcttg	gcggctcggg	840
tgcctcogta	gggcttgccc	tcgcccacgc	cctcgatctc	gaactcgtgg	ccgttcacgg	900
agccctccat	gtgcaccttg	aagcgcctga	agggcttgat	gacgttctca	gtgctatcca	960
tatgtatatc	tccttctgca	ggcatgcaag	cttggcgtaa	tcattggtcat	atcttttaat	1020
tctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	caattatcac	gagccatga	1080
ttaattgtca	acagctcatt	tcagaatatt	tgcgagaacc	gttatgatgt	cggcgaaaa	1140
aacattatcc	agaacgggag	tgcgccttga	gcgacacgaa	ttatgcagtg	atctacgacc	1200
tgcacagcca	taccacagct	tccgatggct	gcctgacgcc	agaagcattg	gtgcaccgtg	1260
cagtcgataa	gcccggatca	gcttgcaatt	cgcgcgcgaa	ggcgaagcgg	catgcattta	1320
cgttgacacc	atcgaatggt	gcaaaacctt	tcgcccgtatg	gcatgatagc	gcccgaaga	1380
gagtcatttc	aggggtggtga	atgtgaaacc	agtaacgta	tacgatgtcg	cagagtatgc	1440
cgggtgtctc	tatcagaccg	tttcccgcgt	ggtgaaccag	gccagccacg	ttctcgcgaa	1500
aacgcgggaa	aaagtgggag	cggcgatggc	ggagctgaat	tacattccca	accgcgtggc	1560
acaacaactc	gcccggcaaac	agtcgttgct	gattggcgtt	gccacctcca	gtctggccct	1620
gcacgcgccc	tcgcaaatg	tcgcccgcgt	taaatctcgc	gccgatcaac	tgggtgccag	1680
cgtgggtggt	tcgatggtag	aacgaagcgg	cgtcgaagcc	tgtaaagcgg	cgggtgcacaa	1740
tcttctcgcg	caacgcgtca	gtgggctgat	cattaactat	ccgctggatg	accaggatgc	1800
cattgctggt	gaagctgcct	gcactaatgt	tcggcggtta	tttcttgatg	tctctgacca	1860
gacaccatc	aacagtatta	ttttctccca	tgaagacggt	acgcgactgg	gcgtggagca	1920
tctggtcgca	ttgggtcacc	agcaaatcgc	gctgttagcg	ggccattaa	gttctgtctc	1980
ggcgcgctct	cgtctggctg	gctggcataa	atctctcact	cgcaatcaaa	ttcagccgat	2040
agcggaacgg	gaaggcgact	ggagtgccat	gtccggtttt	caacaaacca	tgcaaatgct	2100
gaatgagggc	atcgttccca	ctgcgatgct	ggttgccaac	gatcagatgg	cgctggggcg	2160
aatgcgcgcc	attaccgagt	ccgggctgcg	cgttggtgcg	gatatctcgg	tagtgggata	2220
cgacgatacc	gaagacagct	catgttata	cccgcctta	accaccatca	aacaggattt	2280
tgcctcgtct	gggcaaacca	gcgtggaccg	cttgcctgca	ctctctcagg	gccaggcggg	2340
gaagggcaat	cagctgttgc	ccgtctcact	ggtgaaaaga	aaaaccacc	tggcgcacca	2400
tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgtcggc	cgccatgccc	gcgataatgg	cctgcttctc	2460
gccgaaacgt	ttgggtggcg	gaccagtgc	gaaggcttga	ggatcc		2506

5	SEC ID N° 58 gaacatcagc gacaggacaa	20
10	SEC ID N° 59 gggaagcaaa gaaacgaaca	20
10	SEC ID N° 60 cctccccggg ttgatattag	20
15	SEC ID N° 61 ggccagcagc aatagcttta	20
20	SEC ID N° 62 aggaatctcc ctgctfaca	20
20	SEC ID N° 63 ccggattcat ccaagaaagc	20
25	SEC ID N° 64 gcctaaaaac gccactcaat	20
25	SEC ID N° 65 ggccgttgat cattgttctt	20
25	SEC ID N° 66 aactccacgc tggagctcac	20

SEC ID N° 67
agaacgcgga gtccacg 17

SEC ID N° 68

MATLLDLTK	LIDGILKGS	QGVPAHAVGE	QAIAAIGLDS	SSLPTSDAIF	AAVPGTRTHG	60
AQFAGTDNAA	KAVAILTDA	GLEVLNEAGE	TRPVIVVDDV	RAVLGAASSS	IYGDPSKDFP	120
FIGVTGTSK	TTTSYLLEK	LMEAGHKVGL	IGTTGTRIDG	EEVPTKLTTP	EAPTLQALFA	180
RMRDHGVTHV	VMEVSSHLS	LGRVAGSHFD	VAAFTNLSQD	HLDFHPTMDD	YFDAKALFFR	240
ADSPLVADKQ	VVCVDDSWGQ	RMASVAADVQ	TVSTLGQEAD	FSATDINVSQ	SGAQSFKINA	300
PSNQSYQVEL	ALPGAFNVAN	ATLAFAAAAR	VGVDGEAFAR	GMSKVAVPGR	MERIDEGQDF	360
LAVVDYAHKP	AAVAAVLDTL	RTQIDGR LGV	VIGAGGDRDS	TKRGP HQLS	AQRADLVIVT	420
DDNPRSEVPA	TIRAAVTAGA	QQGASESERP	VEVLEIGDRA	EAIRVLVEWA	QPGDGIVVAG	480
KGHEVGQLVA	GVTHHFDDRE	EVRAALTEKL	NNKLP L TTEE	G		521

5

SEC ID N° 69

atggcaacca	cgttgctgga	cctcaccaaa	cttatcgatg	gcacccctcaa	gggctctgccc	60
caggcggcttc	ccgctcacgc	agtaggggaa	caagcaatcg	cggtctattgg	tcttgactccc	120
tcacgcttac	ctacctcggg	cgctatlttt	gctgcagttc	caggaaacccg	cactcacggc	180
gcacagtttg	caggtacgga	taacgcctgcg	aaagctgtgg	ccattttgac	tgacgcagct	240
ggacttgagg	tgctcaacga	agcaggagag	accgcgccag	tcctcgttgt	tgatgatgtc	300
cgcgcagtac	ttggcgcagc	atcatcaagc	atztatggcg	atccttcaaa	agatttccag	360
ttcattggag	tcactgggac	ctcaggtaaa	accaccacca	gctacctctt	ggaaaaggga	420
ctcatggagg	caggcccaaa	agttggtttg	atcggcacca	caggtacacg	tattgacggg	480
gaagaagtac	ccacaaagct	caccactcca	gaagcgcgca	ctctgcaggc	attgtttgct	540
cgaatgcgct	atcacgggtg	caccacgctg	gtgatggaag	tatccagcca	tgattgttca	600
ttgggcagag	ttggcgggtc	ccactttgat	gtagctgctg	ttaccaacct	gtcgcaggat	660
cacottgat	tcaccccac	catggatgat	tactttgacg	cgaaggcatt	gttcttccgc	720
gcagattctc	cacttggtgg	tgacaacacg	gtcgtgtgct	tgatgatctc	ttggggctag	780
cgcatggcca	gcgtggcagc	ggatgtgcaa	acagtatcca	ccctgggcca	agaagcagac	840
ttcagcgtca	cagacatcaa	tgctcagcgc	tctggcgcgc	agagttttaa	gatcaacgcc	900
ccctcaaac	agtcctacca	ggtcgagcta	gctcttccag	gtgcgttcaa	cgttgctaac	960
gccacgttgg	catttgccc	tgccgcacgc	gtgggtggtg	atggcgaagc	gtttgctcga	1020
ggcatgtcca	aggtcgcggt	tccagggcgt	atggaaacga	ttgatgaggg	acaagacttc	1080
cttgccagtg	tgatttatgc	ccacaagcct	gctgcagtg	ctgctgtgtt	ggatacgttg	1140
aggaccacga	ttgacgggcg	cctcggagtg	gttatcggtg	ctggtggaga	ccgcgattcc	1200
accaagcgtg	gccccatggg	gcagttgtcc	gcacagcgtg	ctgatctagt	tattgtcact	1260
gatgacaacc	ctcgttcaga	ggtgctgtcc	acgatctcgc	cagcagtcac	tgaggagca	1320
cagcagggtg	cttcagagtc	cgaacgaccg	gtggaagtcc	tagaaattgg	tgaccgtgca	1380
gaagcaatcc	gcgttttggt	cgagtgggca	cagcctggag	atggcattgt	agtagctgga	1440
aaaggccatg	aagttggaca	actagttgct	ggtgtcacc	accattttga	tgaccgcgaa	1500
gaagttcgcg	ctgctttgac	agaaaagctc	aacaataaac	ttccccttac	tacggaagaa	1560
ggatag						1566

10 SEC ID N° 70
taggatccc acaatccc actgtctg 28

15 SEC ID N° 71
aagtcgacgt ctgcttctg cccaagg 27

SEC ID N° 72

VSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GEGEGDATYG	KLTLKPICTT	GKLPVPWPTL	60
VTTFGYGLQC	FARYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFF	KDDGNYKTRA	EVKFEGDTLV	120
NRIELKGINF	KEDGNILGKH	LEYNYNSHNV	YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IBGGSVQLAD	180
HYQONTPIGD	GPVLLPDNHY	LSYQSALS KD	PNEKRDMV L	LEFVTAAGIT	LCMDELYKSR	240

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Forschungszentrum Julich GmbH

<120> Sensores para la detección de metabolitos intracelulares

25

<130> FJ10049PC

<150> DE 10 2010 019 059.4

<151> 03-05-2010

ES 2 560 302 T3

aacctalagt gaatgtgtct gaaaalaacg acttctatt glaagcgta lcaatagca 60
 agttgactg aaaagccgac atgacaatgt ttaaattgaa aagtc 105

5 <210> 4
 <211> 780
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del activador de CodY

<400>4

atggcittat tacaaaaaac aagaaltatt aactccatgc tgcaagctgc ggcagggaaa 60
 ccggtaaact tcaaggaaat ggccggagacg ctgccggatg taattgatic caatatitic 120
 gttglaagcc gcagagggaa actccttggg taitcaatta accagcaaat tgaaaaatgat 180
 cgtalgaaaa aatgcttga ggalcgtcaa ttccctgaag aatatacga aatctgttt 240
 aatgiccctg aaacatctc taactggat attaatagtg aatatactgc ttccctgitt 300
 gagaacagag acctgttca agctggltta acaacaattg tcccgatcat cggagggcgg 360
 gaaagattag gaacacttat tcttccggt ttacaagatc aattcaatga cgaigactta 420
 attctagctg aatagggcg aacagttgc ggaatggaaa tctaagaga aaaagcagaa 480
 gaaattgaag aggaagcaag aagcaaagct gtcglacaaa tggctatcag ctgcttct 540
 tacagtgagc ttgaagcaat tgagcacatt ttgaggagc ttgacggaaa tgaaggctct 600
 ctgttgcaa gtaaaattgc tgaccgtgc ggcattacc gttctgital tgtgaacgca 660
 ctcaaaaagc tggagagcgc cgggttalc gagtctagat cattaggaat gaaagglact 720
 tataicaagg lactaaacaa caaatccta attgaattag aaaalctaaa aictattaa 780

15 <210> 5
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de mdeA

25 <400>5

tgttgtttt aigtcagtga gcggcgcitt tctagggcgt atttgaaaa atttaagccg 60
 gtccgtggaa taagcttata acaaaccaca agaggcgggt gccatg 106

30 <210>6
 <211>480
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

ES 2 560 302 T3

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de MdeR

5 <400> 6

lcaaalatgc ttctgtgccca ccggaatcac ccgcttctcc ttaccgcct tgaacgagaa 60
gctcgaalag atctcttca ccccggcag ccgctgcagt acctcgggg tgaactcgcc 120
gaacgactcc agatcccgcg ccagaatctc cagcaggaag tcatagcgcc cggagatggt 180
gtggcacgcc acgattcgg ggatatccat cagccgctgc tcgaatgcc gggccatctc 240
cttgcctgic gaatccatca tgalgctgac gaaggcggic actccgaagc ccagtgcctt 300
gggtgacagg atggcctgal agccgggat gtagcccgac tctccagca gcttgacctg 360
ccgccagcac ggcgaggtag tcagggcgac gctgtcggcg agctcggcca cggtcagtcg 420
ggcattgtct tgcagcggg ccagcagtc gcggtcggta cggtcgatgg cgctaggcat 480

<210> 7
<211> 186
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

10

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del promotor de brnF

15

<400>7

ttttagacc ttgcgcgatt tcgtagcgcc gataacctt atcatctggt tccagggctg 60
ccttggatgg cgacacctcc aggcctgaat gaatctctg cgtttttgc aactacaat 120
calcacacaa ttgccggga gttttgtgc cagtttgcg acccaacta ggctattg 180
caatat 186

20

<210> 8
<211> 456
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

25

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de Lrp

<400> 8

ES 2 560 302 T3

atgaagctag attccattga tgcgcaalt attgCGgagc ttagcgcgaa tgcgCGcalc 60
tcaaatctcg cacTggctga caaggtgcat ctcaclccgg gaccltgctt gaggagggtg 120
cagcglttg aagccgaagg aatcatttg ggctacagcg cggacattca cccTgCGgtg 180
atgaatcgtg gattlgaggt gaccgtggat gtcactctca gcaactcga ccgctccact 240
gtagacaalt ttgaaagctc cgttgcgag catgatgaag tactggagtt gcacaggctt 300
ttggltcgc cagattattt tgcCGcatic ggcgttgctg attTggagc gtatgagcaa 360
ttttatcca gtcacattca aaccgtcca ggaattgcaa agatctcatic acgttttgc 420
atgaaagtgg tgaaccagc tgcCCCCag gtgtga 456

5 <210> 9
<211> 89
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del promotor de cysP

<400>9

aacttattcc ctttcaact tccaaatcac caaacggat ataaaaccgt tactccttc 60
acgtccgtta taaatatgat ggctattag 89

15 <210> 10
<211> 975
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

20 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de CysB

<400> 10

25 atgaaattac aacaactcgc ctatattgt gaggtggta atcataacct gaatgctca 60
tcaacagcgg aaggacttta cacalcacaa cccgggatca gtaaacaagt cagaatgctg 120

ES 2 560 302 T3

gaagacgagc taggcattca aatttttcc cgaagcggca agcacctgac gcagglaacg 180
 ccagcagggc aagaaataat tcglatcgct cggaagtc tgcgaaagt cgatccata 240
 aaatcggtg ccggagagca cacctggccg gataaagglt cactgtatc cccaccacg 300
 cataccagg cacgctacgc attaccaaac gtcacaaag gctttatga gcgttatcct 360
 cgcgttctt tgcatalgca ccagggctcg ccgacacaaa ttgctgatgc cgtctctaaa 420
 ggcaatgctg atttcgctat cggcacagaa gcgctgcatc tgtatgaaga tttagtgatg 480
 ttaccgtgct accactggaa tggggctatt gtagtcac cggatcacc cctggcaggc 540
 aaaaaagcca ttaccattga agaactggcg caatalccgt tggtgacata tacctcggc 600
 ttaccggac gtcagaact ggatacggc ttaalcgcy cagggttaac gccgcglatc 660
 gtttcacgg caacggatgc tgacgtcatt aaaacttac tccggttagg gctgggggta 720
 ggggtcaltg ccagcatggc ggtggatccg gtcgccgatc ccgacctgt gcgltgtgat 780
 gctcagata tcttcagcca cagtacaacc aaaattggtt ttcccgtag tactttctg 840
 cgcagttala tgalgatit caltcagcgt ttgcaccgc attaacgcg tgalgtcgtt 900
 gatcggcctg tcgcatgcy cictaatgaa gaaatgagg tcatgtflaa agafataaaa 960
 ctgccggaaa aataa 975

5 <210> 11
 <211> 270
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de cadB

<400> 11
 tttttattac ataaatttaa ccagagaatg tcacgcaatc cattgtaaac attaaatgtt 60
 tatctttca tgalatcaac ttgcgalcct gatgtgttaa taaaaaacct caagttcica 120
 cttacagaaa ctttggltt atticaccia atcttagga ttaalccttt ttctgtgagt 180
 aatcttalcg ccagittggt ctggkagga aalagtala calcagacc cggactccaa 240
 attcaaaaat gaaattagga gaagagcatg 270

15 <210> 12
 <211> 1539
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

20 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 560 302 T3

<223> Secuencia génica del regulador de CadC

<400> 12

ttattctgaa gcaagaaatt tgcgagata aggtacaaca laaggaacag aagtctggaa 60
 tataccattt tcaatccagt aaaggggtgt tgcctctggg cgtaaaitaa aggcgggtgag 120
 atatgcatca gctgcttccc ggttcatccc cttcattca taaaccttgc caagcaaacac 180
 ataaitfagc caggacattt caagalcaat gccaglatft algcctctgt aagactcatc 240
 tgttttacct ttaccagag cactgaccgc tttatttga tatafaatgg acaggttgtt 300
 caaitccggc agtgaacaa tgtatctat ttctgtgtc agtgcctcta atgtttttc 360
 atctaaagga tgttgagaat ggcgcacgat atcaactaat gcttttctg ctctcgcgta 420
 ggfaaatcti ggggatgatt gaacaatctc acctaafaat tcactggcac ggticaatga 480
 tttatcatcg ccatgcagta aataatcatg tgccigataa aaattagtta ataacgcacc 540
 acgatcgggc aaaattttct ggagcgtctc ctgcattctg tggggccacg gttggtftaa 600
 cgcctttgat aaactctcca gtaaatcait ttgaatcgcc agctgattac cgttagtgat 660
 gacataacgt ttatccagca tggttgaacc atctgcattg tclaccaatt ttatcgacat 720
 aaagcattgt tgagcacggt attggcgtg attaaccaac gcaatagata atgttttacc 780
 ggaactgctc ggttcatcaa tgtttagit gattttgca tgcaccataa aggtggagaa 840
 ggtglttaag taltctgcca ccaaatcacc caccctatc gcgtaagaga gctgatacgg 900
 ggaactccag ctgttacaac tttatttac catattaatg tcaatatcgc gtggaitgag 960
 caaaatcgc gatttgcctc taggaagacg tglatcaaga ctggaaaacg ctaccagtgc 1020
 tacacagata cclaacgaca acaggaaaa aaaccatacc caaaagglag tgaatcgttt 1080
 gctttaact ggggaitgtt caggtggcgt tgcgggtttt tgaatgttaa gactgtggga 1140
 gggagaatct gtggcaggaa ccgcctctgg tataggggga ggcaagata gcattatttc 1200
 ctctccctct tctcgtctgt accagataac cggcaccatt aatttatagc cgcgctttgg 1260
 tacagtagcg alatalagacg gactatcttc atcattatct ttaatgact tacgtagttc 1320
 tgagatactc tgcgtcaciaa cglgatttgt gacaatactt ctctccaga callatcgat 1380
 aagttcalcc ctgctaagta ctctgccact gtgtgagca aagaaaacca gaagatcgat 1440
 taatctgggc tcaagggtaa gttgacgccc attgccgcta atttggttta tggacggagt 1500
 aacaagccat tgcgaacgc gaactacagg itgttgcatt 1539

ES 2 560 302 T3

<210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de metY
 10
 <400> 13
 tagaccaaga tgttca 16
 <210> 14
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de McbR
 20
 <400 14
 ctaaaltgag taglccgcag gtggagccga caacaactgc cgagccaaat cgcgagccgt 60
 ctcaagagga ctgatgtgt ggaccaatcg agatccagca agtccacat caaggaacac 120
 caacagctga ttcgctggg tggcgctgg glagccgttc ttctcagta gcaaatcagt 180
 cagagtcta tgacaccact cgcggtgctc taacactgct gcaacaatgc cctttcgtc 240
 atcagttcg gggcgaggtt actcactagc cgcattctga aagtcgagc cgcggaatc 300
 ttttctggt tcttcccaa tgcactgac aaagaacgcg atgatttat ctccggatc 360
 ctccataccg acggtgctc cagccaacg ttacgccaac agctgatcga ggttccag 420
 glatgcaala accaaggcgt ccttcgatcc gaaaagggaa tagaggctcg ccttcgccac 480
 gtcagctca cggaggatc gatcaalacc gatgacgca atacctctg tggtaaaag 540
 gttggtgcg ctatcgagga gacgctgctg ggggctggt cgattgcgac gacggttgc 600
 cccggcactt gtttactct tgccgaagc gctagcagcc ac 642
 25
 <210> 15
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de argO
 35
 <400> 15
 cttattagtt ttctgattg ccaatlaata ttalcaattt ccgctaataa caatccgcg 60
 atalagtctc tgcatcagat acttaattcg gaataiccaa c 101
 <210> 16
 <211> 894

ES 2 560 302 T3

<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

5 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de ArgP

<400> 16

atgaaacgcc cggactacag aacattacag gcactggatg cggtgatag tgaacgagga 60
 ttgagcgcg cggcacaaaa gclgtgcatl acacaatcag ccgltcaca gcgcattaag 120
 caactggaaa atatgtcgg gcagccgctg ttggtgcta ccgtaccgcc gcgcccagc 180
 gaacaagggc aaaaactgct ggcactgctg cggcaggtag agltgctgga agaagagtg 240
 ctgggcgatg aacaaaccgg ttgactccg ctgctcttt cactggcggg caacgccgac 300
 agtctggcga cgtggtgct tctgcactg gctcctgtg tggctgatt gcctatccg 360
 ctcaactgc aggtagaaga tgaacccgc actcaggaac gctctgccc cggcgaagtg 420
 gtcggcgcg tgagtattca acatcaggcg ctgccgaglt gctctgca taaactgg 480
 gcgctcgact atctgtcgt cagctcaaaa cctttgccg aaaaalatt cctaaccgc 540
 gtaaccglt cggcattact gaaagcgcca gtggtcgtg ttgacctt tgacgatag 600
 caccaggcct tttgcagca aaactcgtat ctgcctccag gcagcgtgcc ctgccatc 660
 gtaattctt cagaagcgt cglacaact gctgccagg gcaccacctg ctgtatgac 720
 ccgcacctgc aatcagagaa agagctggc agcgggtaac tgattgact aacgcctgg 780
 ctattcaac gacggatgct ctactggcac cgtttgctc ctgaaagccg calgatgct 840
 aaagtcactg atgcgttact cgattatgt cacaagtc tctgcagga ttaa 894

10 <210> 17
<211> 110
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

15 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del promotor de lysE

20 <400> 17

gcaaagtgc cagttgaatg gggttcatga agctatatta aaccatgta agaaccaatc 60
 allttactta agtacticca taggtcacga tgggatcat ggaaatctc 110

25 <210> 18
<211> 873
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<221> misc_feature

ES 2 560 302 T3

<223> Secuencia génica del regulador de LysE

<400> 18

algaaccca ttcaactgga cactttgctc tcaatcattg atgaaggcag ctctgaaggc 60
 gcctcccttag cccttccat ttccccctcg gcgglgagtc agcgcgttaa agctctcgag 120
 caicacgtgg gtcgagtgtt ggtatcgcc acccaaccgg ccaaagcaac cgaagcgggt 180
 gaagtccttg tgcaagcagc gcggaaaatg gttgtgctgc aagcagaaac faagcgcaa 240
 clatcggac gccttgctga aalccccgta accatcgcca tcaacgcaga ttcgctatcc 300
 acatggittc ctcccgtgt caacgaggta gctcttggg gggagcaac gctcacgctg 360
 cgcttgaag atgaagcgca cacattatcc figctcgcc gtagagatgt ttaggagcg 420
 gtaaccctg aagclaatcc cgtggcggga tgaagtag tagaacttg aaccatcgcc 480
 cactggcca ttgcaacccc ctcatcgcg gatgcctaca tggttgatgg gaaactagat 540
 tgggctgca tgcccgtctt acgctcggg cccaaagatg tgctcaaga ccgtgacctg 600
 gacgggcgcg tcgatggcc tglggggcgc aggcgcgtat ccattgtccc gtcggcgaa 660
 ggtttggg aggcaatcg ccgaggcctt ggtggggac ttctccga aaccaagct 720
 gctccatgc taaaagcagg agaagtalc ctctcgatg agataccat tgacacaccg 780
 atgtattggc aacgatggcg cctggaatct agatcctag ctgactcac agacccgctc 840
 gttgatgcag caatcgaggg atgcggcct tag 873

5

<210> 19
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

10

<220
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de fadE

15

<400> 19

gtaccggata ccgccaaaag cgagaaglac gggcaggctc tatgaccagg acttttgac 60
 ctgaagtgcg gataaaaaca gcaacaatgt gagctttgtt gtaattatat tglaaacala 120
 ttgctaaatg ttttaccatc cactacaacc atalcalcac aagtggcag accicctaca 180
 agtaaggggc tttcgtt 198

20

<210> 20
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<220>

ES 2 560 302 T3

<221> misc_feature

<223> Secuencia génica del regulador de FadR

<400> 20

atggtcatta aggcgcaaag cccggcgggt ttgcggaag agtacattat tgaagatc 60
tggataaacc gcttccctcc cgggactatf ttgccgcag aacgtgaact ttcagaatta 120
attggcgtaa cgcgtactac gttacgtgaa gtgttacagc gctggcacg agatggctgg 180
ttgaccattc aacaiggtcaa gccgacgaag gtgaataatt tctgggaac tccggttta 240
aatatccttg aaacactggc ggcactggat cacgaaagtg tggccagct tattgataat 300
ttgctgicgg tgcgtaccaaa tattccact attttattc gcaccgcgt tgcagcat 360
cccgataaag cgcaggaagt gctggctacc gctaafgaag tggccgaica cgccgatgcc 420
ttgcccgagc tggattacaa catattccgc ggcctggcgt ttgctccgg caaccggatt 480
tacggtctga ttctaacgg gatgaaaggg ctgtatcgc gtattggtc tcaactattc 540
gccaatccgg aagcgcgcag tctggcgctg ggctctacc acaaactgtc ggcgttgtc 600
agtgaaggcg cgcacgatca ggtglacgaa acagtgcgtc gctatgggca tgagagtggc 660
gagattggc accggatgca gaaaaatctg ccgggtgatt tagccattca ggggcgataa 720

5

<210>21

<211> 169

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

10

<220>

<221> misc_feature

<223> Secuencia génica del promotor de fadM

15

<400> 21

ttaattgca tagtggcaat ttttgccag actgaagagg tcataccagt tatgacctt 60
glacitataa caacaacgta aggttattgc gctatgcaaa cacaaatcaa agtctgtgga 120
tatcatctg acgtttacca gcacgtcaac aacgcccgt accitgaat 169

20

<210> 22

<211> 648

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

25

<220>

<221> misc_feature

<223> Secuencia génica del regulador de FabR

<400> 22

ES 2 560 302 T3

atgggcgtaa gagcgcaaca aaaagaaaa acccgccgtt cgctgggga agccgcaltt 60
 agccaattaa gtgctgaacg cagcttcgcc agcctgaglt tgcgtgaagt ggcgcglgaa 120
 gcgggcattg ctcccacctc tttatcgg caiffccgcg acgtagacga actgggtctg 180
 accatggftg atgagagcgg ttaalgcta cgccaactca tgcgccaggc gcgicagcgt 240
 atcgcaaag gcgggaggtg galccgcacc tgggtlcca cattatgga gttcatcgtt 300
 aalaatccta acgccttcg gttattatg cgggaacgct ccggcacctc cgctgcgttt 360
 cgtgcccggt ttgcgcgtga aattcagcac ttattgcgg aactgcgga ctatcggaa 420
 ctgaaaacc atatcccgcg tgcgttact gaagcgcaag ccgaagcaat ggtgacaalt 480
 gtctcagtg cgggtccga ggcgttgac gtcggcgtcg aacaacgtcg gcaaltagaa 540
 gagcgactgg tactgcaact gcgaaigalt tgcgaaaggg ctattactg gtaicccgtt 600
 gaacaagaga aaaccgcaal tatccggga aatggaagg acgagtaa 648

5 <210> 23
 <211> 152
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de rhaSR

<400> 23
 ccgctactt ggcctcctga tgcgtcaac acggcgaaat agtaatcacg acgtcaggtt 60
 ctaccctaa atttcgacg gaaaaccacg taanaaacgt cgattttca agatacaagc 120
 gtgaatttc aggaaatggc ggtgagcatc ac 152

15 <210> 24
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de rhaBAD

<400> 24
 atcaccacaa ttacgcaaat tgaacatc atcacgttca tcttccctg gttccaatg 60
 gccalttc ctgtagaac gagaacgtcg cgaattcagg cgctctttag aclygtcgtg 120
 atgaaattca gcaggatcac attatgacc 149

25 <210> 25
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

ES 2 560 302 T3

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de RhaR

5 <400> 25

gTggcgcatc agTtaaaact tctcaaagat gatTttttg ccagcgacca gcaggcagtc 60
gctgtggctg accgltalcc gcaagatgtc ttgtctgaac atacacatga ttttTlgag 120
ctggTgattg TcTggcgcg taatggcctg calctggTt Tgcagaatat taittatTc 180
ccggagcgic Tgaagctgaa TctTgactgg cagggggcga Tccgggatt TaaCgcccagc 240
gcaggccaac cacactggcg cttaggtagc atggggatgg cgcaggcgcg gcaggTtatc 300
ggTcagctg agcatgaaag tagtcagcat gtgccgtTg cTaaCgaaat ggctgagTg 360
ctgtccggc agTtggTgat gTgtctgaat cgccatcgt acaccagTga TcgTtgcg 420
ccaacalcca gcgaaacgtT gctggataag ctgattacc ggctggcggc tagcctgaaa 480
agTccctTg cgctggataa attTtTgat gaggcatcgt gcagTgagcg cgTttTcgt 540
cagcaaltc gccagcagac Tggaatgacc atcaatcaat atctgcgaca ggTcagagTg 600
Tgtatcgc aatatctct ccagcatagc cgccTgtTaa TcagTgatat Tcgaccgaa 660
TgtggctTg aagatagTaa ctattTtcg gTggTgtTaa cccgggaaac cgggalgacg 720
cccagccagT ggctcatct caatTcgag aaagattaa 759

<210> 26
<211> 849
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

10

<220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia génica del regulador de RhaS

15

<400> 26

gTggcgcatc agTtaaaact tctcaaagat gatTttttg ccagcgacca gcaggcagtc 60
gctgtggctg accgltalcc gcaagatgtc ttgtctgaac atacacatga ttttTlgag 120
ctggTgattg TcTggcgcg taatggcctg calgtactca acgatcggc Ttatcgatt 180

ES 2 560 302 T3

acccg1ggcg alc1ct1l1ta cat1calgci gacgataaac actcclacgc t1ccg1taac 240
 galctggt1t1 tgcagaatat lat1lat1gc ccggagcgc tgaagc1gaa lct1gactgg 300
 cagggggcga t1ccgggatt taaccaccgc gcagggcaac cacactggcg ct1aggt1agc 360
 atggggatgg cgcaggcgcg gcaggtatc ggcagct1g agcalgaaag tag1cagcat 420
 glgccc1t1g c1aacgaaal ggctgag1g ctgt1cgggc ag1lgg1gat g1t1gct1gaa1 480
 cgccatcgt1 acaccagtga t1cgt1gccg ccaacalcca gcgaaacgt1 gct1ggataag 540
 ctgattaccg ggctggcggc tagcctgaaa ag1ccct1t1g cgctggataa at1t1t1gat 600
 gaggcacgt1 gcagtgagcg cgt1t1gct1 cagcaat1c gccagcagac tggaa1gacc 660
 alcaalcaat atctgcgaca ggcagag1g t1c1cat1gc aalatctct1 ccagcatagc 720
 cgctgt1taa t1cag1gat1t1 t1cgaccgaa t1ggcct1t1g aagatag1aa ctat1t1t1cg 780
 gtgg1gt1ta cccgggaaac cgggatgacg cccagccagt1 ggc1cat1ct1 caat1cgcag 840
 aaagattaa 849

5 <210> 27
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> *Anabaena* sp.

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de hetC

<400> 27

tatcggaaaa aalc1g1aac algagalaca caatagcatt tatattt1gct ttag1a1ctc 60
 tctct1gggt1 gggattc 77

15 <210> 28
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> *Anabaena* sp.

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de nrrA

<400> 28

g1aatt1gg ct1agag1aac aaagactaca aaaccl1ggg ca1gggct1g t1act1t1gaa 60
 attcalcgcac gctaag 76

30 <210> 29
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> *Anabaena* sp.

<220>

ES 2 560 302 T3

<221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de devB

<400 29

cctcgccct catttgfaca gtcigtacc ttacctgaa acagatgaat gtagaattta 60

5

taaaactagc atttgat 77

<210> 30
 <211> 672
 <212> ADN
 <213> *Anabaena* sp.

10

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de NtcA

15

<400> 30

atgatcgtga cacaagataa ggcctagca aatgttttc gtcagatggc aaccggagct 60

ttcctcctg ttgtcgaac gttgaacgc aataaacga tcttttcc tggcgtcct 120

gccgaacgag tctacttct ttgaaagg gctglgaac ttccaggt glacgaggca 180

ggagaagaga ttacagtagc actactacgg gaaaatagcg ttttggtgt cctgtcttg 240

ttgacaggaa acaagtcgga taggtttac catgctgtg cattactcc agtagaattg 300

cttctgcac caattgaaca agtggagcaa gcactgaagg aaaatcclga attatcgatg 360

ttgatcgc ggggclgc ttgcggait clacaacag agatgatgat tgaacctta 420

gcgaccgag atatgggtc gagatgggt agtttctgt taattctg tctgatttt 480

gggttctt gtgcagatgg aatcacaatt gatttaaagt tatctcaica ggcgatgcc 540

gaagcaattg gctclactcg cgtactgt actaggctac taggggattt gcgggagaaa 600

aagatgattt ccatccaca aaagaagatt actgtcata aacctgtac tctcagcaga 660

cagttcact aa 672

20

<210> 31
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium* sp.

25

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de CbbR

30

<400> 31

ES 2 560 302 T3

atgaccaacg cgcgattgcg agctctggtc gaactggcgg ataccggttc ggtgcccgcg 60
 gctgctgagc gactcgtggt caccgaalct tgalctcct cggcttiacg cgcattgagc 120
 aacgacatcg gcatcagctt ggtcgaccgg catggcccgg gggtgccgct gactcctgcc 180
 ggccctcgtt acgtcgaata cgcgcggcgg atcctcggct tgcacgacga ggcgatattg 240
 gctgcccgcg gagaggccga cccggagaat ggctcgatcc ggctggctgc ggtcacctcc 300
 gcgggggaac tgcctalccc cgcgcglttg gcalcgtfcc gtcccgcgta ccccgggtgc 360
 gttctgcatc tggaggtagc ggcgcgcagc ttggtgtagc ctatgctggc ccgccacgag 420
 gtcgacctcg ttgtggcggg acggcccgcg gacgaattgg lccggaaagl gtgggtgccc 480
 gccctcagcc cgaacgcgct tgcctcgtg ggaccaccgc cggtagcga gggattccag 540
 cccgccaccg cgacctggtt gctgcgtgag accggatccg gfaccgcctc tacgttgacg 600
 gcactgcttg acgacctga tgcgcgccca cctcaattgg tgcctggatc gcacggcgcg 660
 gtggttgccg cggcgggtggc cgggctgggc gtgacgttgg tgcgcgtca ggctgtgacg 720
 cgcaactgg ccgccggcgc actcgtcga ctgccgggic ccggtactcc galaagccgg 780
 ccatggcatg tggcagcca galcagtcgg acgatgcca ccgaactgct calcaagcac 840
 ctcttgctcc agcgagacct gggctggcgc galatcaaca ccaccttcg gggagccgtt 900
 accgcctga 909

5 <210> 32
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces cattleya*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de pcbAB
 <400> 32

gtgctggtcc cgcaccgggc ggtggacagc ttccggcggc agctgaccgg ccgctacttc 60
 ggcggcccgg acacctcccg cgagggcgtg ctctctctgg ccaactacgt cttcgacttc 120

15 <210> 33
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces cattleya*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de ThnU

25 <400> 33

ES 2 560 302 T3

atggacgcag acgactgttg ggcgcgggcg ggcaccgtgc ggalccgcct gctcggcccc 60
 gtggagclgg cctgcggcac gcggccggcg ccggtgaccg ggcggcgcca gttgagggtg 120
 gtggccgcgc tcgcgctgga ggccggacgg gtgctctcca ccgcggggct gatcgccctg 180
 ttgtgggcgg acgagccgcc gcgcaccgcc gcccggcagc tcagaccag cglgtggatg 240
 atccgccggg cgctcgccct ggtgggcgcg ccgcagtgcg tcgtccgctc caccocggcc 300
 ggtlaccctg tcgaccggc ccaclacgaa ctgcacagcg accggttccg gcaagcggtg 360
 ctgaccgcc gggagltgca gcgggacggg cggctggccc aggcccgggc ccgggctgac 420
 gaggggcgg cgctgtggcg cggccccgcc ctgcggcgcg cggcggggcg cggactccag 480
 ccccgggccc gccggctgga ggaggaacgg gllctcgccc tggagcagcg cgcggggctc 540
 gacctcgcgc tcggccgcca cgagacggcc atcggcgaac tcctcgacct catcgcccag 600
 catccgctgc gcgagggcg ctaccggac ctgatgctg cctgtaccg ttccggccgc 660
 cagtcgcagc cgctcgccgt claccgcagg gcgcagcggg tgctcgccga cgagctggcc 720
 glccgcccc gcccccgcct cgccggcctg gagcgggcca tcctcgcca ggacgagtcg 780
 ctgctggccc gcgcggcgt gccclga 807

5 <210> 34
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces viridochromogenes*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de aviRa
 <400> 34

tcagggcct gcctccagca cgtcggctgc ccggaccagt acggccgagc gggtgccgat 60
 cttcagccgc tccagggcct ttacgggagc caccgggata ttacggctgc ggtcggtgac 120

15 <210> 35
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces viridochromogenes*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de AviCI o AviC2

25 <400> 35

ES 2 560 302 T3

claggaaccc gcggacgtat cgggtagtg gfcggatccc tctgcatcgc cgatgtgtcc 60
 gggaaagccc tgggcaagg caaccagtc gccctgaaga cgggaltca ccccagctt 120
 cggcagtaic tggccatal gagcctgac ggtgcgctcg gtagcccca gcagcgcggc 180
 gatctacgg ttggagtag cglggctcag caggaggaag acctggagct cgcggtcgga 240
 gagtaaatgt acctggctga gccctccag ccaggggaac tggctcctgt ggagaaatcg 300
 atcgtcgcca gaatcactgg aatcgcagcc ggaatatggc aaagtcggc ccccgatga 360
 gcgtgtggtc ctgcatgcc ctaagaggic atccgacgca tctagtalca aggcgccgaa 420
 gggcgccacc actgaactat gaagacgta gggcgatacc acctatgca cgaatgggtc 480
 cggacatta ctcactga tcacttalc gcatctacgg ccgggtggg ggccttgg 540
 gccgcctgt gtcgtgagca gggcccgcc aggcgtggc aaggcggata aggcggccc 600
 tgcccgtgt gtcacggca a 621

5 <210> 36
 <211> 130
 <212> ADN
 <213> *Nocardia uniformis*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del promotor de nocF

<400> 36

catcacgaac cccagccgt gggatcggc tccggcagca ttatagacg gtttcttat 60
 cgalccgtt tcaattcac ccgagtgat aaggaattga taaacgatt tctagcctg 120
 agcggactat 130

15 <210> 37
 <211> 1748
 <212> ADN
 <213> *Nocardia uniformis*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia génica del regulador de NocR

25 <400> 37

ES 2 560 302 T3

gtgcgcgcgg gcgggcgcgg ggtccaggtc ggccggcccgc gccagcggac ggtgctggcg 60
acgctgctgc tcaacgccga ccgcgtggcg tccgtggacg cgtcggccga gacggctcgg 120
ggcgcgccgc ccccgctcac cagccggacg caggctggcga tctgcgtgtc cgcgctgcgc 180
aaggcgctcc gcgcgagcgg cgcgcacgag gtgacgcaga ccgctgcgcc gggglacgtc 240
ctgcgctccg gcgggcaccg gctggacacc ctggacttcg acgaactggg ggcgctggcg 300
agggcggcgg cccggcaggg ccggggcgcg gaggccgtcc ggctgtaccg ctgggcgctc 360
gcgctgcgcc ggggcccggt gctggcgaac gtgaccggga cggctcccga gcacctgtcc 420
tgccagtggg aggagacctt gctaccgcc tacgaggagc aggtcagct gcgcctggcg 480
ctgggcgagc accgcctgct ggtcgcggg ctgcggcgg cggctgagcg gcacctgctg 540
cgcgaccgac tctaccgctt gctcatcacc gccagctacc gctccggcca ccggggcgcg 600
gcgctggaga cgttcgcccg gttgcgccgc cgtcggctcg acgagctcgg cctggagccc 660
gggatggagc tgcgccgctt gcacgagcgc atcctgcgcg acgaggaccg cccggcggtc 720
gagcgcgccg cgtcgcagct gccgcgccg acgcagggtg tctcggggcg cgcgaggag 780
ctggcggctc tggaccgctt gccgcgccg gacgggcagg cgggcgcgcc gccgctcggg 840
ctgctggctg gcggcgtcgg cgtgggcaag accgcgctgg cggctcggcg ggcgcacgcc 900
aacgcgacc tgtccccga cggccagctg ttctcgcacc tgggcgggca cgacctgcac 960
caccgcctt cggccccg cgcgctgct gcgcacctgc tgcacgcgct gggcgtgccg 1020
cccgagcggg tcccggtcgc cgcgcaacga cccgcgctgt lccgcaccgc gatggcccgc 1080
cgccggatgc tctgggtgct ggacgacgcc cgcgacgcg cccaggtctg gccgctgctg 1140
ccgaacaccg ccacctgccg ggtgctggtg acctcccgcg accgcctcgc cgagctggtc 1200
gcccgcagcg gggcggctcc gctcggcctg ggcggcctcg ggttcgacga gtccgtggcg 1260
ctggctgcgc gcatcatcgg cgaggcgcg gccgggcgcg acccggacgc cctggctcgg 1320
ctggctgagc tggctgagct gtgcggctcg gtccggggcg cgtctctggc cgcgcgccg 1380
cacctggcca gcaaaccca ctggggcgtg cccaggatgg lccgggagct caaccgcccg 1440

ES 2 560 302 T3

cgcagcaggc tgcggcct cggcggcag cacctgcgc acgggctgc ctccagcgc 1500
 cgcgcctgg acccggggc gcccgacctg laccggggc lggcggcct gccacgccc 1560
 ggcctgacgt cctggacggc cacggccctg ctgggctgct cgacaccga ggccgacgac 1620
 glgctggagc gcctggcga cgcgcacctg ctggagccc cggggcggg cgcggcggc 1680
 gagagccact accggctgc cagcctgtcc cacgcctacg cggcgaacti gccacgaccg 1740
 gcccgtag 1748

5 <210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> plysGE_for

 15 <400> 38
 cgcgatccc taagcccaa tccctgattg 30

 20 <210> 39
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> plysGE_rev

 30 <400> 39
 tccgatggac agtaaaagac tggccccaa agcag 35

 35 <210> 40
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> peYFP_rev

 45 <400> 40
 tggagatcct tattactgt cagctgtcc atgccgagag tgatcc 46

 50 <210> 41
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

ES 2 560 302 T3

<220>
<221> misc_feature
<223> peYFP_fw2
5 <400> 41
ctttactgt ccatcggaac tagctatggt gagcaagggc gaggagctgt tcacc 55
<210> 42
10 <211 >22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> Cebador
<220>
<221> misc_feature
<223> ARS_for
20 <400> 42
tcaactgcta tccccctgt ta 22
<210> 43
25 <211> 33
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> Cebador
<220>
<221> misc_feature
<223> ARS_rev
35 <400> 43
aaactcctt acttaaagt ttgataaat aaa 33
<210> 44
40 <211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
45 <223> Cebador
<220>
<221> misc_feature
<223> EYFP_for_Ndel
50 <400> 44
tacatatggt gagcaagggc ga 22
55 <210> 45
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
60 <220>
<223> Cebador
<220>
<221> misc_feature
65 <223> EYFP_rev_EcoRI
<400> 45

ES 2 560 302 T3

tagaattctt atctagactt gtacagctcg 30

5 <210> 46
<211 >24
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

15 <220>
<221> misc_feature
<223> pEKEx2_for

20 <400> 46
cggcgtttca cttctgagtt cggc 24

25 <210> 47
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

35 <220>
<221> misc_feature
<223> EYFP_rev

40 <400> 47
tagaattctt atctagactt gtacagctcg 30

45 <210> 48
<211> 1060
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Constructo de gen

55 <400> 48

ES 2 560 302 T3

tcaactgcta lccccctgt tattaacag cttacattga ttattatgt catttaatt 60
taaalgcta tactttata aaataaatat aatcataatt ttcccggt caccgttta 120
taaatttct tatggaagat tcatcataa tglggtacac tcatcaacgg aaacgaatca 180
atlaaalagc laltatcact tgtataacct caalaatag gtttgagggt gtctaccagg 240
aacccgtaaaa tccigtatc aaaatttgt tatgacatt ttgtaatca ggatttttt 300
tatttalca aacatitaag taaaggagt tgtatgggt agcaaggcg aggagctgt 360
caccgggggt gtgccatcc tggctgagct ggacggcgac gtaaaccgcc acaagttcag 420
cgtgtccggc gagggcgagg gcgalgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg 480
caccaccggc aagctgccc tgcctggcc caccctctg accacctctg gctacggcct 540
gcagtgttc gcccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gactcttca agtccgccat 600
gcccgaaggc tacgtccagg agcgaccat ctcttcaag gacgacggca actacaagac 660
ccgcgccgag tgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcctcgagc tgaaggcat 720
cgactcaag gaggacggca acatctggg gcacaagctg gactacaact acaacagcca 780
caacgtctat atcatggcg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 840
ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cggcgaccac taccagcaga acaccccat 900
cggcgacggc cccgtgtct tgcctgacaa ccactacctg agctaccagt ccgccctgag 960
caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccg 1020
gatcactct gccatggagc agctgtacaa gcttagataa 1060

- <210> 49
- <211> 723
- <212> ADN
- <213> proteína fluorescente amarilla potenciada (eyfp)
- <400> 49

5

gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgcca tcttggtcga gctggacggc 60
gacgtaaacg gccacaagt cagcgtgtcc ggcgagggcg agggcgatgc cacctacggc 120
aagctgacct tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc 180

ES 2 560 302 T3

gtgaccacct tggctacgg cctgcagtc tgcgcccgt accccgacca calgaagcag 240
 cacgacttct tcaaglccgc calgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catcttcitc 300
 aaggacgacg gcaactlaca gacccgcgcc gaggtgaagt tggagggcga cacccctggtg 360
 aaccgcatcg agctgaagg catcaacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag 420
 ctggagtlaca actlacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 480
 aicaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgagggcg gcagcgtgca gctcggcgc 540
 cactaccagc agaacacccc catcggcgcac ggccccgtgc tgcigcccga caaccactac 600
 ctgagctacc agtccgccc gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca calggtcctg 660
 ctggagttcg tgaccggcg cgggatcact ctggcatgg acgagctgta caagcttata 720
 taa 723

5 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Irp-fw-A-BamHI

15 <400> 50
 ggcgggatcc tcacacctgg gggcgagctg 30

20 <210> 51
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Irp-brnF-rv-I-Ndel

30 <400>51
 ggcccatag atatctcctt cttaaagtc agcttgaatg aatctctgc g 51

35 <210> 52
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> misc_feature
 <223> eyfp-fw-H-Ndel

ES 2 560 302 T3

<400> 52
 ggcccatattg gtgagcaagg gcgaggag 28

 5 <210> 53
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Cebador

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> eyfp-rv-D-Sall

 <400> 53
 ggcgctcgac ttatctagac ttgtacagct cgtc 34

 20 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Seq_pJC1_for1

 <400> 54
 cgatcctgac gcagatttt 20

 35 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Seq_pJC1_rev1

 <400> 55
 ctcaccggct ccagattat 20

 50 <210> 56
 <211> 1765
 <212> ADN
 <213> Fragmento BamHI-<-EYFP-lysE'-lysG->-Sall

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <223> BamHI-<-EYFP-lysE'-lysG->-Sall

 <400> 56

ES 2 560 302 T3

ggatccttat tactgtiaca gctcgtccat gccgagagt atcccggcgg cggtcacgaa 60
ctccagcagg accatlgat cgcgctctc gttggggctc ttgctcaggg cggactggla 120
gctcagglag tgggtgctg gcagcagcac ggggcccctg ccgatggggg tgtctgctg 180
glagtggtg gcgagctgca cgtgcccgc ctcgatgtg tggcggatc tgaagtcac 240
ctgatgccc ttctctgct tctggccat gatatagac ttgggctgt ttagttgta 300
ctccagctg tccccagga lgtgcccgc ctcctgaag ttgatccct tcagctgat 360
gcggtcacc aggggtgctc cctcgaact cacctcggcg cgggtctgt agttgccgc 420
gctctgaag aagatggtc gctcctggac glagcctcg ggcctggcg acttgaagaa 480
gtcgtgctg tcatgtgtt cggggtagcg ggcgaagcac tgcagggcgt agccgaaggt 540
ggtcacgagg gttggccagg gcacgggag cttgccggtg gtcagatga acttcaggtt 600
cagctgccc taggtggcat cgcctcgcc ctcgccgac acgtgaact tglggccgtt 660
tacgtgccc tccagctga ccaggatgg caccacccc gtaaacagc cctcgcctt 720
gctcaccata tgatctcc ttctaaagt tcatctaggt ccgatggaca gtaaaagact 780
ggccccaaa agcagacctg taatgaagt tccatgat accatctga cctatggaag 840
tactaaagta aatgattgg ttctaacat ggttaatat agctcatga accccattca 900
actggacact ttgctctca tcatgatga aggcagctc gaaggccct ccttagccct 960
ttcatttc cctcggcgg tgagtcagcg cgttaaagc ctcgagcat acgtgggtg 1020
agtttgta tgcgcaccc aaccggcaa agcaaccgaa gcgggtgaag tcttgtgca 1080
agcagcggg aaaaagggt tgcgcaagc agaaactaaa gcgcaactat ctggacgct 1140
tgcgaaaic cgttaacca tgcctcaa cgcagattcg ctatccat ggttccctc 1200
cgtgtcaac gaggtagct ctgggggg agcaacgct acgctgctc tggaaagla 1260
agcgcacaca ttatcctgc tgcggctg agatgttta ggagcgglaa cccgtgaagc 1320
laatcccgt gcgggatgt aaglaglaga acttgaacc atgcgccact tggcattgc 1380
aaccctca tgcgggatg cctacatgt ttagggaaa ctgattggg ctgcatgcc 1440
cgtctacg ttcggtcca aagatgtct tcaagaccg gacctggag ggcgctgca 1500
tggctctg gggcgcagg gcgtatccat tctccgctg gcggaaggit ttggtgaggc 1560
aatcgcga ggccttggf ggggactct tccgaaacc caagctgct ccatgctaaa 1620
agcaggagaa gtatcctc tcatgagat accattgac acaccgatgt atggcaacg 1680
atggcgcctg gaactagat cttagctag actcacagac gccgtctg atgcagcaat 1740

cgaggattg cggccttagg tcgac

1765

ES 2 560 302 T3

<210> 57
<211> 2506
<212> ADN
<213> Fragmento BamHI-T7terminator-<-Crimson—lacIQ->-BamHI

5

<220>
<221> misc_feature
<223> BamHI-T7terminator-<-Crimson-lacIQ->-BamHI

10

<400> 57

ggatcccgag aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg 60
lagcggcac gctgcgcta accaccacac ccgccgcgt taatgcgccg ctacagggcg 120
cgtccattc gccaatccgg atatagtcc tctttcagc aaaaaacccc tcaagaccgg 180
tttagagcc ccaaggggt atgctagta ttgctcagc gtggcagcag ccaactcagc 240
ttccttcgg gctttgttag cagccggatc tcagtgggaa ttctactgg aacaggtggt 300
ggcgggccic ggcgcgctcg tactgtcca ccacggtgta gtcctcgtg tgggagggtg 360
tgicgagctt gtagccacg tagtgtagc cgggcagctt cacgggcttc ttggccatgt 420
agatggactt gaactcacac aggtatggc cggcgccctt cagcttcagc gccatgtggt 480
tctcgccctt cagcacgccg tcgcgggggt agttgcgctc agtggagggc tccagccca 540
gagctctct ctgcattacg gggccgctcg aggggaagt caccgccgatg aacttcacgt 600
ggtagalbag ggtgccgtcc tgcagggagg agtcctgggt cacggtcacc acgccgccgt 660
cctcgaagt catcacgcgc tcccactga agccctcggg gaaggactgc ttgaggtagt 720
cggggatgic ggcgggggtc ttgatgtacg ccttggagcc gtagaagaac tggggggaca 780
ggatgtcca ggcgaagggc agggggccgc ccttggcac ttgcagctg gccgtctggg 840
tgccctcga gggcttgcct tcgcccacgc cctcgatcic gaactcgtgg ccgttcacgg 900
agcccccat gtcaccttg aagcgcataga agggctgat gacgttctca gtgctatcca 960
tatgtatc tcttctgca ggcatacaag ctggcgtaa tcattggcat atctttaat 1020

ES 2 560 302 T3

tctgttctct gttgaaatt gttaccgct cacaattcca cacattatc gagccgalga 1080
ttaattgtca acagctcatt tcagaalatt tgcagaacc gttatgalgt cggcgcaaaa 1140
aacattatcc agaacgggag tgcgccttga gcgacacgaa ttatgcagtg atttacgacc 1200
tgcacagcca taccacagct tccgatggct gcttgacgcc agaagcattg tgcaccgtg 1260
cagtcgataa gcccggatca gcttgaatt cgcgcgcgaa ggcgaagcgg catgcattta 1320
cgttgacacc atcgaatgtt gcaaaacctt tgcgggatg gcatgatagc gcccgaaga 1380
gagtcattc aggggtgga atgtgaaacc agtaacgta tacgalgtc cagagtatgc 1440
cgggtgtct taccagacc ttcccgctt ggtgaaccag gccagccag ttctgcgaa 1500
aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat tacattcca accgcgtggc 1560
acaacaactg gcgggcaaac agtcgttct gattggcgtt gccacctcca gctggccct 1620
gcaccgccc tgcgaattg tgcggcgat taaatctgc gccgatcaac tgggtgccag 1680
cgtgtgtgt tgalgttag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgaagcgg cggtcacaa 1740
tctctcgc caacgcgca ggggctgat cattaactt ccgctggatg accaggatgc 1800
cattgtgtg gaagctgct gcaactagt tccggcgtt ttcttgatg tcttgacca 1860
gacaccatc aacaglatc ttcttcca tgaagacgtt acgagctgg gcgtggagca 1920
tctgtcga ttgggtacc agcaaatgc gctgttagc ggcctttaa gttctctc 1980
ggcgcgtct cgtctgctg gctggcataa atatctact cgaatcaaa ttacccgat 2040
agcgaacgg gaagggact ggagtccat gtccggtt caacaaacca tcaaatgt 2100
gaatgagggc atcttcca ctgcgatgt ggttccaac gatcagatgg cgtggggc 2160
aalgcgcc attaccgagt ccggctgc cgttggcgc gatactcgg tagtgggata 2220
cgacgatcc gaagacagct catgtatat cccgcgtta accaccatca aacaggatt 2280
tcgcctctg gggcaacca gcgtggacc ctgtcga ctctctcagg gccaggcgt 2340
gaagggcaat cagctgttc ccgtctact ggtgaaaaga aaaaccacc tggcgccaa 2400
tacgaaacc gccctccc gcgcctgc cccatgcc gcgalaatgg cctgtctc 2460
gccgaaact tgggtggcg gaccagtac gaaggctga ggatcc 2506

- <210> 58
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>

<223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> lysC-32F
 <400> 58
 gaacatcagc gacaggacaa 20
 10 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <223> lysC-1938R
 <400> 59
 gggaagcaaa gaaacgaaca 20
 25 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <223> hom-289F
 <400> 60
 cctccccggg ttgatattag 20
 40 <210>61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <223> thrB-2069R
 <400> 61
 ggccagcacg aatagcttta 20
 55 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 65 <223> hom-1684F
 <400> 62

ES 2 560 302 T3

	aggaatctcc ctgcgtaaa	20
5	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<220> <221> misc_feature <223> thrB-2951R	
	<400> 63 ccggattcatccaagaaagc	20
20	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
30	<220> <221> misc_feature <223> thrC-22F	
	<400> 64 gcctaaaac gccactcaat	20
35	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador	
45	<220> <221> misc_feature <223> thrB-2951 R	
50	<220> <221> misc_feature <223> thrC-2046R	
	<400> 65 ggccgttgat cattgttctt	20
55	<210> 66 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Cebador <220> <221> misc_feature <223> murE-34F	
65	<400> 66 aactccacgc tggagctcac	20
	<210> 67 <211> 17	

ES 2 560 302 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador

10 <220>
<221> misc_feature
<223> murE-1944R

<400> 67
agaacgcgga gtccacg 17

15 <210> 68
<211> 521
<212> PRT
<213> Secuencia de aminoácidos de murE L121 F

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Secuencia de proteína MurE

<400> 68
Met Ala Thr Thr Leu Leu Asp Leu Thr Lys Leu Ile Asp Gly Ile Leu
1 5 10 15

ES 2 560 302 T3

Lys Gly Ser Ala Gln Gly Val Pro Ala His Ala Val Gly Glu Gln Ala
20 25 30

Ile Ala Ala Ile Gly Leu Asp Ser Ser Ser Leu Pro Thr Ser Asp Ala
35 40 45

Ile Phe Ala Ala Val Pro Gly Thr Arg Thr His Gly Ala Gln Phe Ala
50 55 60

Gly Thr Asp Asn Ala Ala Lys Ala Val Ala Ile Leu Thr Asp Ala Ala
65 70 75 80

Gly Leu Glu Val Leu Asn Glu Ala Gly Glu Thr Arg Pro Val Ile Val
85 90 95

Val Asp Asp Val Arg Ala Val Leu Gly Ala Ala Ser Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

Gly Asp Pro Ser Lys Asp Phe Thr Phe Ile Gly Val Thr Gly Thr Ser
115 120 125

Gly Lys Thr Thr Thr Ser Tyr Leu Leu Glu Lys Gly Leu Met Glu Ala
130 135 140

Gly His Lys Val Gly Leu Ile Gly Thr Thr Gly Thr Arg Ile Asp Gly
145 150 155 160

Glu Glu Val Pro Thr Lys Leu Thr Thr Pro Glu Ala Pro Thr Leu Gln
165 170 175

Ala Leu Phe Ala Arg Met Arg Asp His Gly Val Thr His Val Val Met
180 185 190

Glu Val Ser Ser His Ala Leu Ser Leu Gly Arg Val Ala Gly Ser His
195 200 205

ES 2 560 302 T3

Phe Asp Val Ala Ala Phe Thr Asn Leu Ser Gln Asp His Leu Asp Phe
210 215 220

His Pro Thr Met Asp Asp Tyr Phe Asp Ala Lys Ala Leu Phe Phe Arg
225 230 235 240

Ala Asp Ser Pro Leu Val Ala Asp Lys Gln Val Val Cys Val Asp Asp
245 250 255

Ser Trp Gly Gln Arg Met Ala Ser Val Ala Ala Asp Val Gln Thr Val
260 265 270

Ser Thr Leu Gly Gln Glu Ala Asp Phe Ser Ala Thr Asp Ile Asn Val
275 280 285

Ser Asp Ser Gly Ala Gln Ser Phe Lys Ile Asn Ala Pro Ser Asn Gln
290 295 300

Ser Tyr Gln Val Glu Leu Ala Leu Pro Gly Ala Phe Asn Val Ala Asn
305 310 315 320

Ala Thr Leu Ala Phe Ala Ala Ala Ala Arg Val Gly Val Asp Gly Glu
325 330 335

Ala Phe Ala Arg Gly Met Ser Lys Val Ala Val Pro Gly Arg Met Glu
340 345 350

Arg Ile Asp Glu Gly Gln Asp Phe Leu Ala Val Val Asp Tyr Ala His
355 360 365

Lys Pro Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Asp Thr Leu Arg Thr Gln Ile
370 375 380

Asp Gly Arg Leu Gly Val Val Ile Gly Ala Gly Gly Asp Arg Asp Ser
385 390 395 400

ES 2 560 302 T3

Thr Lys Arg Gly Pro Met Gly Gln Leu Ser Ala Gln Arg Ala Asp Leu
 405 410 415

Val Ile Val Thr Asp Asp Asn Pro Arg Ser Glu Val Pro Ala Thr Ile
 420 425 430

Arg Ala Ala Val Thr Ala Gly Ala Gln Gln Gly Ala Ser Glu Ser Glu
 435 440 445

Arg Pro Val Glu Val Leu Glu Ile Gly Asp Arg Ala Glu Ala Ile Arg
 450 455 460

Val Leu Val Glu Trp Ala Gln Pro Gly Asp Gly Ile Val Val Ala Gly
 465 470 475 480

Lys Gly His Glu Val Gly Gln Leu Val Ala Gly Val Thr His His Phe
 485 490 495

Asp Asp Arg Glu Glu Val Arg Ala Ala Leu Thr Glu Lys Leu Asn Asn
 500 505 510

Lys Leu Pro Leu Thr Thr Glu Glu Gly
 515 520

- <210> 69
- <211> 1566
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia de nucleótidos de murE L121F

- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <223> Secuencia génica de murE

<400> 69

atggcaacca cgtgctgga cctcaccaaa ctatcgalg gcatcctcaa gggctctgcc 60

cagggcgltc ccgctcacgc agfaggggaa caagcaatcg cggctatfgg tcltgactcc 120

ES 2 560 302 T3

lccagctac claccicgga cgctatitll gctgcagltc caggaacccg cactcacggc 180
gcacagtttg caggtacgga taacgctgcg aaagcgtgg ccattttgac tgacgcagct 240
ggacttgagg tgcacaacga agcaggagag acccgcccag tcalcgttgt tgalgatgc 300
cgcgcagtac ttggcgcagc alcaicaagc atftalggcg alccitcaaa agatttcacg 360
ttcattggag tcactggaac ctacagglaaa accaccacca gctacctctt ggaaaaagga 420
ctcatggagg caggccacaa agttggtttg atcggcacca caggtacacg tattgacggg 480
gaagaagtac ccacaaagct caccactcca gaagcgccga ctctgcaggc attgtttgct 540
cgaatgcgcg atcacggtgt caccacgctg gtgatggaag latccagcca tgcattgtca 600
ttgggcagag ttgcgggttc ccactttgat glagctgctt ttaccaacct gtcgcaggat 660
caccttgatt tccacccac catggatgat tactttgacg cgaaggcait gttctccgc 720
gcagatttc cactgtggc tgacaaacag gtcgtgtcg tgatgattc ttgggtcag 780
cgcatggcca gcgtggcagc ggatgtgcaa acagatcca cccitgggca agaagcagac 840
ttcagcgta cagacalcaa tgcagcgac tctggcggcc agagtttaa gatcaacgcc 900
ccctcaaacc agtctacca ggtcgagcta gcctccag gtgcgtcaa cgttgctaac 960
gccacgttg catttgccc tgcggcacgc gtgggtgttg atggcgaagc gttgtctga 1020
ggcatgtcca aggtcgcgtt tccaggccgt atggaacgca ttgalgagg acaagacttc 1080
ctgcagltg ttgattatgc ccacaagctt gctgcagttg ctgctgtgtt ggatcgttg 1140
aggaccaga ttgacggcg cctcggagt gttatcggtg ctggggaga ccgcgattcc 1200
accaagcgtg gccccatgg gcagttgtcc gcacagcgtg ctgatctagt tattgtcact 1260
galgacaacc ctgctcaga ggtgcctgcc acgattcgcg cagcagtcac tgcaggagca 1320
cagcagggtg ctacagatc cgaacgaccg gtggaagtcc tagaattgg tgaccgtgca 1380
gaagcaaltc gcgtttgtt cgagtgggca cagcctggag atggcattgt agtagctgga 1440
aaaggccatg aagttggaca actagtgtct ggtgtcacc accatttga tgaccgcgaa 1500
gaagttcgcg ctgcttgac agaaaagctc aacaataaac ttccccttac tacggaagaa 1560

ggatag

1566

ES 2 560 302 T3

<220>
<223> Cebador

5 <220>
<221> misc_feature
<223> 7-39-L-F

10 <400> 70
taggatcccg acaacatccc actgtctg 28

15 <210>71
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

25 <220>
<221> misc_feature
<223> 7-39-R-R

30 <400> 71
aagtcgacgt ctgcttcttg cccaagg 27

<210> 72
<211 >240
<212> PRT
<213> proteína fluorescente amarilla potenciada (eyfp)

<400> 72

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1 5 10 15

ES 2 560 302 T3

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
50 55 60

Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
115 120 125

Asn Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Gly Gly Ser Val
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser Arg
225 230 235 240

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, dependiendo la expresión de la proteína autofluorescente de la concentración intracelular de un metabolito determinado y superproduciendo la célula después de una mutación este metabolito,
- 10 - en la que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente se encuentra bajo el control de un promotor heterólogo, que en el tipo salvaje de la célula controla la expresión de un gen, cuya expresión en la célula de tipo salvaje depende de la concentración intracelular del metabolito, o
- en la que la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente está relacionada funcionalmente con una secuencia de ADN, que a nivel del ARNm puede unirse al metabolito, influyéndose en función de la unión del metabolito al ARNm en la transcripción a lo largo del ADN o en la traducción en los ribosomas.
- 15 2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, siendo la célula una célula del género *Corynebacterium* o *Escherichia*.
3. La célula de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el metabolito se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos e hidratos de carbono.
- 20 4. La célula de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el metabolito es un aminoácido.
5. La célula de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el aminoácido es L-lisina.
- 25 6. La célula de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que el promotor es el promotor de *lysE* y el gen es el gen de *lysE*.
7. La célula de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína autofluorescente es la proteína fluorescente verde (GFP) o una variante de esta proteína.
- 30 8. Un procedimiento para identificar una célula con concentración intracelular elevada de un metabolito determinado en una suspensión celular, que incluye las etapas de procedimiento:
- 35 i) proporcionar una suspensión celular que incluye una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje, que comprende una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, dependiendo la expresión de la proteína autofluorescente de la concentración intracelular de un metabolito determinado,
- 40 - encontrándose la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente bajo el control de un promotor heterólogo, que en el tipo salvaje de la célula controla la expresión de un gen, cuya expresión en la célula de tipo salvaje depende de la concentración intracelular del metabolito, o
- estando la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente relacionada funcionalmente con una secuencia de ADN, que a nivel del ARNm puede unirse al metabolito, influyéndose en función de la unión del metabolito al ARNm en la transcripción a lo largo del ADN o en la traducción en los ribosomas;
- 45 ii) modificar mediante ingeniería genética las células obteniendo una suspensión celular, en la que las células se diferencia con respecto a la concentración intracelular de un metabolito determinado;
- iii) identificar células individuales en la suspensión celular con concentración intracelular elevada de este metabolito determinado mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular.
- 50 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la modificación mediante ingeniería genética en la etapa de procedimiento ii) tiene lugar mediante mutagénesis no dirigida.
- 55 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que incluye además la etapa de procedimiento:
- iv) la separación de las células identificadas a partir de la suspensión celular.
- 60 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la separación tiene lugar por medio de citometría de flujo.
- 65 12. Un procedimiento para la producción de una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada de un metabolito determinado, que incluye las etapas de procedimiento:
- I) proporcionar una suspensión celular que incluye células modificadas mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje, que comprenden una secuencia génica que codifica para una proteína autofluorescente, dependiendo la expresión de la proteína autofluorescente de la concentración intracelular de un metabolito determinado,

- encontrándose la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente bajo el control de un promotor heterólogo, que en el tipo salvaje de la célula controla la expresión de un gen, cuya expresión en la célula de tipo salvaje depende de la concentración intracelular del metabolito, o
- 5 - estando la secuencia génica que codifica para la proteína autofluorescente relacionada funcionalmente con una secuencia de ADN, que a nivel del ARNm puede unirse al metabolito, influyéndose en función de la unión del metabolito al ARNm en la transcripción a lo largo del ADN o en la traducción en los ribosomas;
- II) modificar mediante ingeniería genética las células obteniendo una suspensión celular, en la que las células se diferencian con respecto a su concentración intracelular de un metabolito determinado;
- 10 III) identificar células individuales en la suspensión celular con concentración intracelular elevada del metabolito determinado mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular;
- IV) separar las células identificadas a partir de la suspensión celular;
- V) identificar aquellos genes modificados mediante ingeniería genética G_1 a G_n o aquellas mutaciones M_1 a M_m en las células identificadas y separadas, que son responsables de la concentración intracelular elevada del metabolito
- 15 determinado;
- VI) producir una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada del metabolito determinado, cuyo genoma comprende al menos uno de los genes G_1 a G_n y/o al menos una de las mutaciones M_1 a M_m .
- 20 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la modificación mediante ingeniería genética en la etapa de procedimiento II) tiene lugar mediante mutagénesis no dirigida.
14. Célula, obtenida mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13.
- 25 15. Un procedimiento para la producción de metabolitos, que incluye las etapas de procedimiento:
- (a) producir una célula modificada mediante ingeniería genética con respecto a su tipo salvaje con producción optimizada de un metabolito determinado mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13; (b) cultivar la célula en un medio de cultivo que incluye nutrientes en condiciones en las que la célula produce el
- 30 metabolito determinado a partir de los nutrientes.
16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el metabolito se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos e hidratos de carbono.
- 35 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el metabolito es un aminoácido.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el aminoácido es L-lisina.
19. Procedimiento para la producción de una mezcla, que incluye las etapas de procedimiento:
- 40 (A) producir metabolitos mediante el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 a 18;
- (B) mezclar el metabolito con un componente de mezcla distinto del metabolito.
- 45 20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el metabolito es L-lisina y la mezcla es un alimento o una composición farmacéutica.

Fig. 1

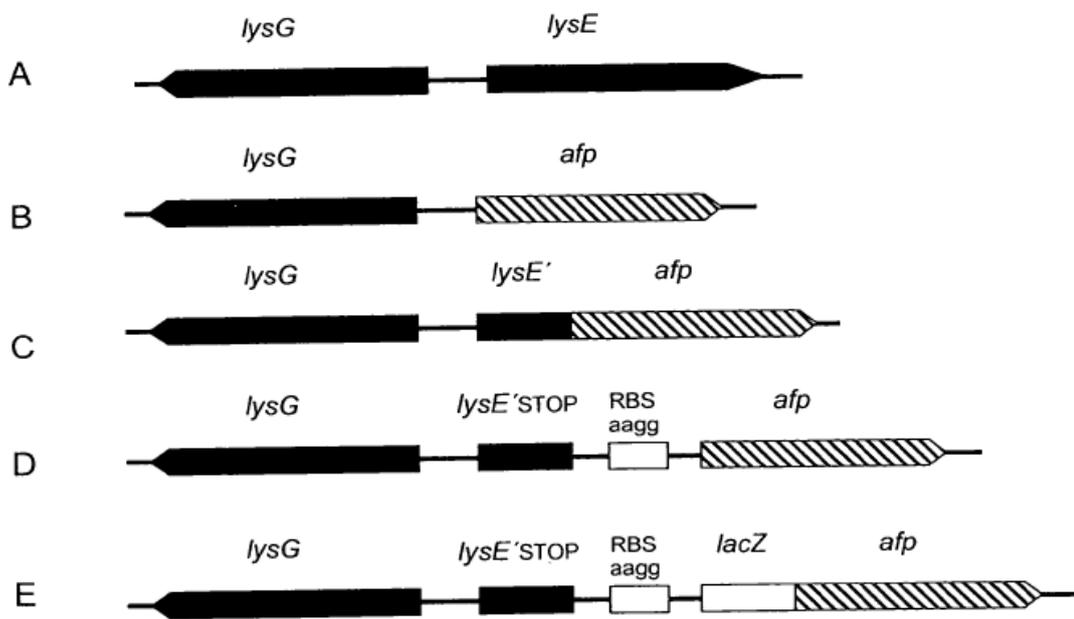


Fig. 2

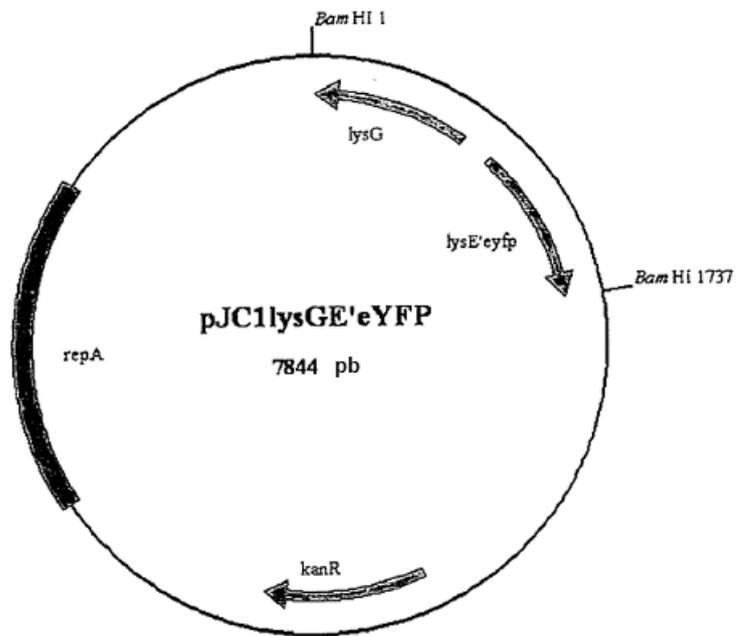


Fig. 3

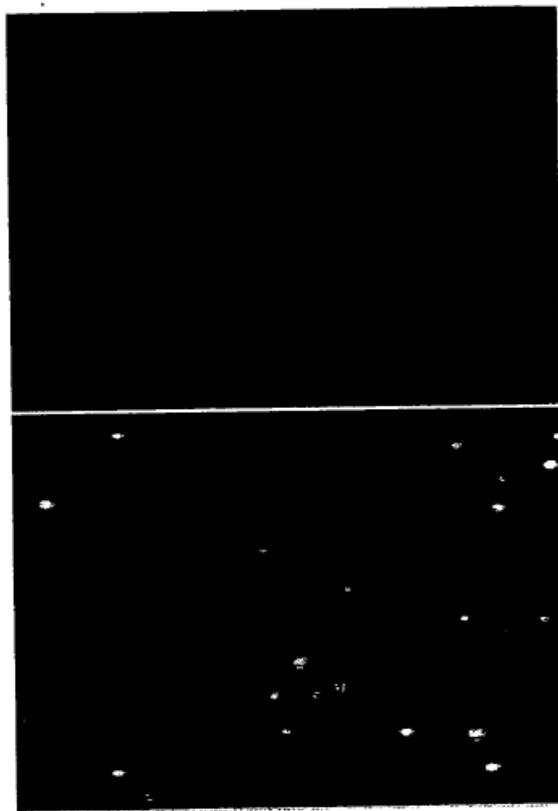


Fig. 4

TCAACTGCTATCCCCCTGTTATTTAAAACGCTTACATTGATTATTATAGTCATTTAATTT
 TAAATGTCCTATACTTTTATAAAAATAAATATAATCATATTTTTTTCCGGTTCACCGTTTTA
 TAAATTTTTCTATGGAAGATTCATTCATAATGTGGTACACTCATCAACGGAAACGAATCA
 ATTAAATAGCTATTATCACTTGTATAACCTCAATAATATGGTTTGAGGGTGTCTACCAGG
AACCGTAAAATCCTGATTACAAAATTTGTTTATGACATTTTTTGTAATCAGGATTTTTTT
TATTTATCAAAACATTTAAGTAAAGGAGTTTGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT
CACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG
CACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCT
GCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT
CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCA
CAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCG
CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAT
CGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAG
CAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCTAGATAA

Fig. 5

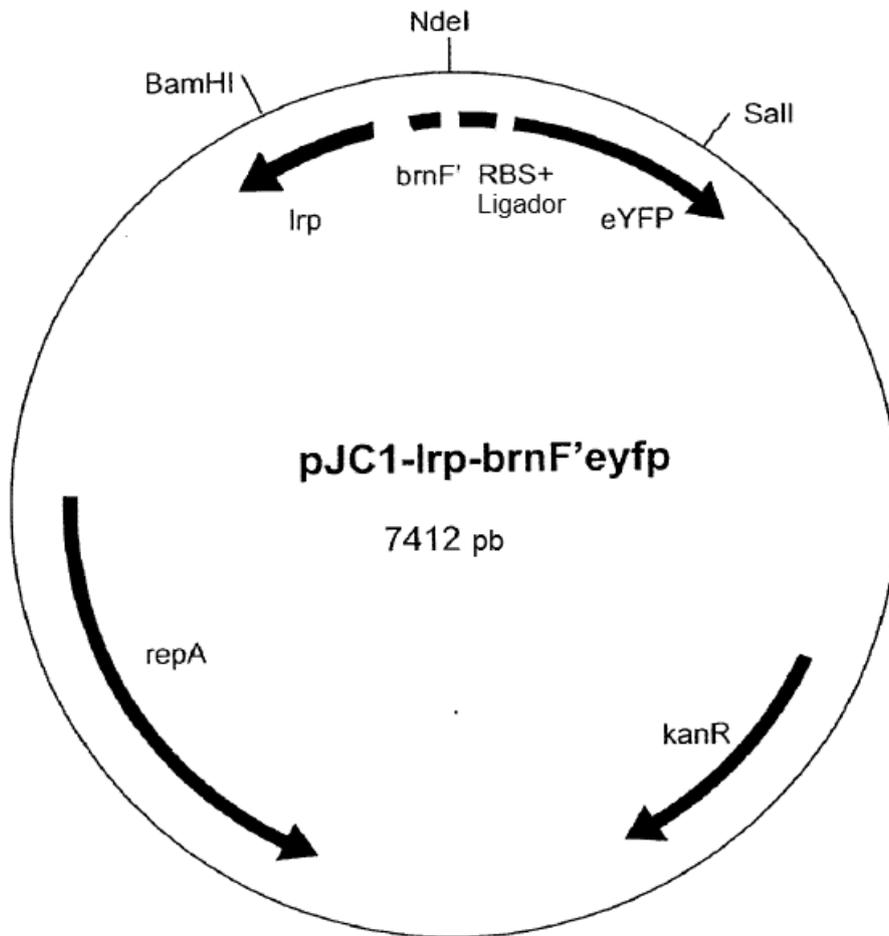


Fig. 6

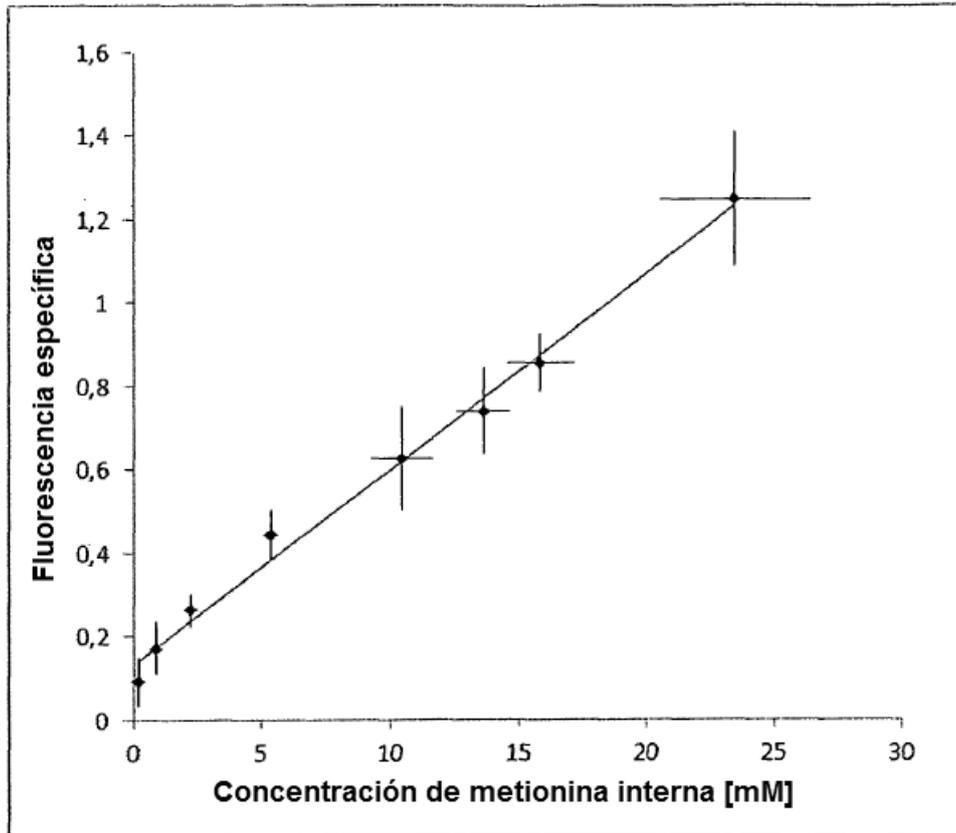


Fig. 7

