

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 554**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12P 7/16	(2006.01)
C07C 59/245	(2006.01)
C07C 59/10	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/IB2011/002870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11805587 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2633038**

54 Título: **Procedimiento de producción de ácido 2,4-dihidroxitúrico**

30 Prioridad:

23.05.2011 WO PCT/IB2011/001559
28.10.2010 WO PCT/IB2010/003153

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2017

73 Titular/es:

ADISSEO FRANCE S.A.S. (100.0%)
Immeuble Antony Parc II 10, place du Général de
Gaulle
92160 Antony, FR

72 Inventor/es:

WALTHER, THOMAS;
CORDIER HÉLÈNE;
TOPHAM, CHRISTOPHER;
ANDRE, ISABELLE;
REMAUD-SIMEON, MAGALI;
HUET, ROBERT y
FRANCOIS, JEAN-MARIE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 631 554 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de ácido 2,4-dihidroxi-butírico.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de producción de ácido 2,4-dihidroxi-butírico a partir de malato mediante la puesta en práctica de una ruta sintética que comprende enzimas con actividad de malato cinasa, malato semialdehído deshidrogenasa y 2,4-dihidroxi-butirato deshidrogenasa, respectivamente.

10 Los ácidos carboxílicos mencionados en la presente solicitud se denominan igualmente bajo sus formas salina (por ejemplo 2,4-dihidroxi-butirato) o ácida (por ejemplo ácido 2,4-dihidroxi-butírico).

15 El ácido 2,4-dihidroxi-butírico (igualmente 2,4-DHB o DHB) es un compuesto de considerable interés económico. El DHB puede convertirse fácilmente en una α -hidroxi- γ -butirolactona en medios acuosos mediante el ajuste al pH apropiado. La α -hidroxi- γ -butirolactona es un precursor importante para la producción del sustituto de la metionina llamado 2-hidroxi-4-(metiltio)-butirato (HMTB) (Deck *et al.*, 2008), que presenta un gran mercado en la nutrición animal. Actualmente, la α -hidroxi- γ -butirolactona se deriva de la γ -butirolactona mediante un procedimiento multietapa que implica la halogenación de la γ -butirolactona en posición α y la posterior sustitución del átomo de halógeno por un grupo de hidroxilo en medio alcalino (Deck *et al.*, 2008).

20 La necesidad de producir DHB a partir de recursos renovables surge por el incremento de los precios del petróleo. Los microorganismos son capaces de transformar materias primas derivadas de biomasa, por ejemplo azúcares o ácidos orgánicos, en una gran diversidad de compuestos químicos diferentes (Werpy y Petersen, 2004). Debido a la creciente información bioquímica y genómica disponible resulta posible modificar los microorganismos de manera que produzcan en exceso intermediarios metabólicos naturales con un elevado rendimiento y productividad (Bailey, 1991). La optimización de los microorganismos productivos con frecuencia requiere una manipulación racionalizadora de las redes metabólicas que garantice, entre otros, la sobreexpresión de los enzimas necesarios para la biosíntesis del metabolito de interés y el alivio de la inhibición por retroalimentación del producto. Otra posibilidad es la implementación de nuevos sistemas enzimáticos que catalicen la producción del metabolito de interés.

30 Los enfoques de ingeniería metabólica y las catálisis enzimáticas requieren un conocimiento profundo de la bioquímica y la regulación de la ruta metabólica que conduce al metabolito de interés. En el caso de la producción de DHB, esta información no se encuentra disponible. Pocos estudios informan de la existencia de DBH en pacientes con deficiencia en semialdehído succínico deshidrogenasa (Shinka *et al.*, 2002), aunque sin, no obstante, identificar las reacciones enzimáticas que participan en la producción de la DHB. Por lo tanto, la producción zimótica o enzimática de DHB requiere: (i) la identificación de una ruta termodinámicamente viable que transforma un precursor accesible en DHB, (ii) la identificación o la construcción de enzimas que son capaces de catalizar etapas de reacción individuales en la ruta, e (iii) la expresión funcional de los enzimas de la ruta en un organismo de producción apropiado.

40 La presente invención presenta el objetivo de satisfacer dichas necesidades.

45 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un objeto de la presente invención es un procedimiento para producir 2,4-DHB, que comprende una primera etapa de transformación de malato en 4-fosfo-malato utilizando una malato cinasa, una segunda etapa de transformación de 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído utilizando una malato deshidrogenasa deshidrogenasa, una tercera etapa de transformación de malato-4-semialdehído en 2,4-DHB utilizando una DHB deshidrogenasa.

50 En la primera reacción (ver la figura 1(i)), el malato (1) se convierte en 4-fosfo-malato (2) mediante la acción de un enzima que presenta actividad de malato cinasa (A). En la segunda reacción (B), la 4-fosfo-malato se convierte en malato-4-semialdehído (3) mediante la acción de un enzima que presenta actividad de malato semialdehído deshidrogenasa. Más exactamente, la reacción (B) es catalizada por un enzima que incluye actividad de 4-fosfo-malato reductasa desfosforilante en el sentido biosintético de la ruta. En la tercera reacción (C), el malato-4-semialdehído es convertido en DHB (4) mediante la acción de un enzima que presenta actividad de DHB deshidrogenasa. Más exactamente, la reacción (C) es catalizada por un enzima que incluye actividad de malato-4-semialdehído reductasa en el sentido biosintético de la ruta.

60 Ninguno de los enzimas y productos intermedios anteriormente indicados hasta ahora ha sido ni descrito ni identificado en las células vivas. De esta manera, la malato cinasa, la malato semialdehído deshidrogenasa, la DHB deshidrogenasa son objetos adicionales de la invención.

65 En otro aspecto de la invención, la primera etapa del procedimiento de producción de 2,4-DHB implica una malato cinasa que se caracteriza porque transforma el malato en 4-fosfo-malato. Dicho enzima puede obtenerse mediante como mínimo una mutación en un enzima, mejorando dicha mutación o mutaciones la actividad y/o afinidad de sustrato del enzima mutado para el malato.

En la presente invención, la expresión "mejora la actividad y/o afinidad para el sustrato" se refiere a que el enzima antes de la mutación

- no puede utilizar el sustrato (malato, 4-fosfo-malato o malato-4-semialdehído) y/o
- de sintetizar el producto de la reacción (4-fosfo-malato o malato-4-semialdehído o DHB) a una tasa específica máxima por lo menos tres veces inferior y/o
- presentaba una afinidad para el malato, el 4-fosfo-malato o el malato-4-semialdehído que era por lo menos tres veces menor, y/o
- presentaba una afinidad para el sustrato natural (aspartato, 4-fosfo-aspartato, aspartato-4-semialdehído) que era por lo menos 3 veces superior.

En otro de sus aspectos, la invención se refiere a la utilización de una malato cinasa para transformar el malato en 4-fosfo-malato.

La actividad de malato cinasa puede medirse mediante el ensayo enzimático descrito en el Ejemplo 1 (ver "Ensayo enzimático").

Según otro aspecto de la invención, la malato cinasa puede obtenerse mediante mutación de una aspartato cinasa.

La figura 2 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las aspartato cinasas de diferente origen biológico. Todas las referencias a la posición de los aminoácidos se llevan a cabo basándose en la secuencia de aminoácidos de la aspartato cinasa codificada por el gen *LysC* de *E. coli* (representada por la SEC ID nº 4). Las posiciones relativas de las regiones conservadas correspondientes en las otras aspartato cinasas de diferentes organismos podrán ser fácilmente encontradas por el experto en la materia mediante simple alineación de las secuencias tal como se representa en la figura 2 con los enzimas listados a continuación:

- AKIII - aspartato cinasa III de *E. coli* (SEC ID nº 4),
- AKI (SEC ID nº 87) aspartato cinasa I de *E. coli*,
- AKII (SEC ID nº 88)- aspartato cinasa II de *E. coli*,
- MJ - *Methanococcus jannaschii* (SEC ID nº 89),
- TT - *Thermus thermophilus* (SEC ID nº 90),
- CG - *Corynebacterium glutamicum* (SEC ID nº 91),
- AT - *Arabidopsis thaliana* (SEC nº 10 nº 92),
- SC - *Saccharomyces cerevisiae*. (SEC ID nº 93).

Dicha alineación puede llevarse a cabo con el software ClustalW2. Por ejemplo, el residuo E119 de la aspartato cinasa representada por la SEC ID nº 4 corresponde al residuo E207 de la aspartato cinasa de *A. thaliana* (SEC ID nº 50) o al residuo E147 de la aspartato cinasa de *S. cerevisiae* (SEC ID nº 51).

La aspartato cinasa mutada según la invención comprende por lo menos una mutación, en comparación con el enzima de tipo salvaje, en por lo menos una de las posiciones siguientes: S39, T45, V115, E119, F184 y/o S201, en el que el aminoácido natural en dichas posiciones ha sido sustituido por cualquiera de entre los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina.

En un ejemplo no limitativo, la construcción de una malato cinasa mediante mutagénesis dirigida a sitio se muestra utilizando la aspartato cinasa *LysC* de *Escherichia coli* a modo de molde. Según un aspecto de la invención, la especificidad de sustrato de *LysC* se cambio a malato mediante la sustitución del ácido glutámico en la posición 119 por asparagina, glutamina, cisteína, prolina, serina, treonina, valina o glicina.

En un aspecto adicional de la invención, la malato cinasa está representada por la SEC ID nº 9, y más específicamente, por SEC ID nº 12, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, SEC ID nº 18, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24 o SEC ID nº 26.

Las aspartato cinasas resultan típicamente inhibidas por metionina, treonina o lisina. Por lo tanto, las malato cinasas que se construyeron mediante mutagénesis aleatoria o dirigida a sitio de las aspartato cinasas también podrían resultar inhibidas por dichos aminoácidos. En un aspecto adicional de la invención, la inhibición de la malato cinasa por la metionina, lisina o treonina resulta reducida mediante la mutagénesis de la malato cinasa.

En un aspecto específico de la invención, la *LysC* mutada mencionada anteriormente (malato cinasa) se convierte en insensible a la inhibición por lisina mediante la mutación de por lo menos uno de los aminoácidos

siguientes: E250, M318, S321, V339, S338, F324, L325, S345, E346, D340, T344 y/o T352 (ver el Ejemplo 3).

La presente invención comprende además dichos enzimas modificados y más particularmente los representados por la SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43 o SEC ID nº 45.

En un aspecto todavía adicional, la segunda etapa del procedimiento de producción de 2,4-DHB según la invención incluye una malato semialdehído deshidrogenasa caracterizada porque transforma la 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído, presentando dicho enzima una actividad de 4-fosfo-malato reductasa desfosforilante en el sentido biosintético de la ruta.

La actividad de malato semialdehído deshidrogenasa puede medirse mediante el ensayo enzimático descrito en el Ejemplo 4 (ver "Ensayo enzimático").

Dicho enzima puede obtenerse mediante por lo menos una mutación de un enzima, mejorando dicha mutación o mutaciones la actividad y/o afinidad para el sustrato del enzima mutado para el 4-fosfo-malato.

Según otro aspecto, la malato semialdehído deshidrogenasa de la invención puede obtenerse mediante mutación de un enzima que presenta actividad de semialdehído deshidrogenasa conocida, más específicamente que presenta actividad desfosforilante en el sentido reductor de la reacción, más específicamente que actúa sobre moléculas orgánicas que consisten en 3, 4 o 5 moléculas de carbonos. En un aspecto específico de la invención, dicha malato semialdehído deshidrogenasa se obtiene mediante mutación de una aspartato semialdehído deshidrogenasa.

La aspartato semialdehído deshidrogenasa, Asd de *E. coli* y Hom2 de *Saccharomyces cerevisiae* muestra naturalmente actividad de deshidrogenasa sobre el 4-fosfo-malato 2.

Según otro aspecto de la invención, la malato semialdehído deshidrogenasa puede mejorarse mediante la mutación de la aspartato semialdehído deshidrogenasa.

La figura 3 representa la alineación de secuencias de aminoácidos de las aspartato semialdehído deshidrogenasas de diferente origen biológico. Todas las referencias a aminoácidos se llevan a cabo basándose en la aspartato semialdehído deshidrogenasa codificada por el gen *Asd* de *E. coli* (representada por la SEC ID nº 20). Las posiciones relativas de las regiones conservadas correspondientes en las otras aspartato semialdehído deshidrogenasas de diferentes organismos podrán ser fácilmente encontradas por el experto en la materia mediante simple alineación de las secuencias tal como se representa en la figura 4 con los enzimas listados a continuación:

- EC - *E. coli* (SEC ID nº 49),
- MJ - *Methanococcus jannaschii* (SEC ID nº 94),
- TT - *Thermus thermophilus* (SEC ID nº 95),
- BS - *Bacillus subtilis* (SEC ID nº 96),
- CG - *Corynebacterium glutamicum* (SEC ID nº 97),
- AT - *Arabidopsis thaliana* (SEC ID nº 98),
- SC - *Saccharomyces cerevisiae*. (SEC ID nº 99)

Dicha alineación puede llevarse a cabo fácilmente utilizando el software ClustalW2.

La construcción de enzimas con actividad de malato semialdehído deshidrogenasa mejorada puede llevarse a cabo de la manera siguiente.

La malato semialdehído deshidrogenasa según la invención corresponde en un aspecto específico a una aspartato semialdehído deshidrogenasa que comprende por lo menos una mutación respecto al enzima de tipo salvaje en por lo menos una de las posiciones T136, Q162, I1230, E241 y/o H274, en el que el aminoácido natural en dichas posiciones se ha sustituido por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina.

Tal como se muestra en el Ejemplo 5, la mutagénesis dirigida a sitio de *asd* de *E. coli* puede mejorar la actividad y la afinidad para el sustrato del enzima mutado para el 4-fosfo-malato, reduciendo simultáneamente la preferencia del enzima para su sustrato natural 4-fosfo-aspartato.

Con el fin de mejorar la actividad de As sobre el 4-fosfo-malato y según un aspecto de la invención, se sustituyó E241 por un residuo de glutamina, alanina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina o metionina mediante mutagénesis dirigida a sitio (Ejemplo 5).

En un aspecto adicional de la invención, la malato semialdehído deshidrogenasa está representada por la SEC ID nº 68, y más específicamente, por SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64 o SEC ID nº 66.

5 En otro de sus aspectos, la invención se refiere a la utilización de una malato semialdehído deshidrogenasa para transformar el 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído.

10 En otro aspecto, la tercera etapa del procedimiento para producir 2,4-DHB según la invención incluye una DHB deshidrogenasa, caracterizada porque transforma el malato-4-semialdehído en 2,4-DHB, incluyendo dicho enzima actividad de malato-4-semialdehído reductasa en el sentido biosintético de la ruta.

15 Los enzimas DHB deshidrogenasa candidatos que potencialmente ya presentan actividad de DHB deshidrogenasa pueden seleccionarse de entre la clase de beta-hidroxiácido deshidrogenasas que actúan sobre los compuestos C3, C4 o C5.

20 Según un aspecto todavía adicional de la invención, dichos enzimas DHB deshidrogenasa pueden estar relacionados estructural y funcionalmente con las β -hidroxiácido deshidrogenasas, tales como las tartronato semialdehído reductasas, las succinato semialdehído reductasas, las malonato semialdehído reductasas, las metilbutiraldehído reductasas, las alcohol deshidrogenasas de tipo cinc, las L-treonina-3-deshidrogenasas o las homoserina reductasas.

25 La presente invención se refiere además a la utilización de una metilbutiraldehído reductasa o de una semialdehído succínico reductasa para transformar el malato-4-semialdehído en 2,4-DHB. En formas de realización específicas, dicha metilbutiraldehído reductasa está representada por la SEC ID nº 74 y dicha semialdehído succínico reductasa está representada por la SEC ID nº 76. La actividad de DHB deshidrogenasa puede medirse mediante el ensayo enzimático descrito en el Ejemplo 6 (ver "Ensayo enzimático").

30 La afinidad de la DBH deshidrogenasa para el malato-4-semialdehído puede incrementarse mediante por lo menos una mutación de un enzima, incrementando dicha mutación o mutaciones la actividad y/o afinidad para el sustrato del enzima mutado para el malato-4-semiladehído y/o reduciendo la actividad y/o afinidad para su sustrato natural en un factor de por lo menos 2.

35 La DHB deshidrogenasa según la invención corresponde en un aspecto específico a la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* (SEC ID nº 76), que comprende por lo menos una mutación respecto al enzima de tipo salvaje en por lo menos una de las posiciones S40, N43, H39, T49, F85, Q108, L281 y/o N305, en el que el aminoácido natural en dichas posiciones se ha sustituido por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina.

40 Tal como se demuestra en un ejemplo no limitativo, la afinidad de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* para el (L)-malato-4-semialdehído se incrementó mediante la introducción de la doble mutación H39R N43H mediante mutagénesis dirigida a sitio, tal como se representa en la SEC ID nº 81. Los mutantes simples H39R (SEC ID nº 225) y N43H (SEC ID nº 227) también se encuentran comprendidos en la presente invención (Ejemplo 7).

45 La DHB deshidrogenasa puede utilizarse para transformar el malato-4-semialdehído en 2,4-DHB, constituyendo un aspecto adicional de la invención.

50 La secuencia de ácidos nucleicos de los genes puede adaptarse al uso de los codones del organismo hospedador, incrementando de esta manera la producción de las proteínas expresadas heterogéneamente. Esto constituye un aspecto adicional de la invención.

55 La síntesis de un gen sintético codificante de la semialdehído succínico reductasa H39R N43H de *M. sedula* la secuencia de nucleótidos de la cual se optimizó para la expresión de dicho enzima en *E. coli* tal como se representa en la SEC ID nº 288 es un aspecto adicional de la invención.

60 En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere además a ácidos nucleicos, y más particularmente a secuencias de ácidos nucleicos aisladas codificantes de una malato cinasa tal como se ha mencionado anteriormente.

65 En otro aspecto, dicho ácido nucleico está representado por la SEC ID nº 13, SEC ID nº 15, SEC ID nº 17, SEC ID nº 19, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42 o SEC ID nº 44.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere además a secuencias de ácidos nucleicos

aisladas codificantes de una malato semialdehído deshidrogenasa tal como se ha indicado anteriormente.

Más específicamente, dicho ácido nucleico está representado preferentemente por SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65 o SEC ID nº 67.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere además a secuencias de ácidos nucleicos aisladas codificantes de una DHB deshidrogenasa tal como se ha indicado anteriormente.

En otro aspecto, dicho ácido nucleico está representado por SEC ID nº 73 o SEC ID nº 75, SEC ID nº 224, SEC ID nº 226 o SEC ID nº 82.

Según la presente invención, una "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena sencilla o doble, preferentemente una molécula de ADN. Un "ADN aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un ADN que no es natural o ya no se encuentra en el medio natural en el que se encontraba presente originalmente, por ejemplo una secuencia codificante de ADN asociada a otros elementos reguladores en un gen quimérico, un ADN transferido a otra célula hospedadora, o una secuencia de ADN artificial, producida sintéticamente, que presenta una secuencia de nucleótidos diferente de cualquier secuencia de ADN natural.

La presente invención se refiere además a un gen quimérico que comprende, funcionalmente unidos entre sí, por lo menos un promotor que es funcional en un organismo hospedador, un polinucleótido codificante de cualquiera de entre malato cinasa, malato semialdehído deshidrogenasa o DHB deshidrogenasa según la invención, y un elemento terminador que es funcional en el mismo organismo hospedador. Los diversos elementos que puede contener un gen quimérico son, en primer lugar, elementos que regulan la transcripción, traducción y maduración de las proteínas, tal como un promotor, una secuencia codificante de un péptido de señal o un péptido de tránsito, o un elemento terminador que constituye una señal de poliadenilación y, en segundo lugar, un polinucleótido codificante de una proteína. La expresión "funcionalmente unidos entre sí" se refiere a que dichos elementos del gen quimérico están unidos entre sí de manera que la función de uno de dichos elementos resulta afectada por la función del otro. A modo de ejemplo, un promotor está funcionalmente unido a una secuencia codificante en el caso de que sea capaz de afectar a la expresión de dicha secuencia codificante. La construcción del gen quimérico según la invención y el ensamblaje de sus diversos elementos pueden llevarse a cabo utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. La elección de los elementos reguladores que constituyen el gen quimérico depende esencialmente del organismo hospedador en el que deben funcionar, y el experto en la materia podrá seleccionar los elementos reguladores que son funcionales en un organismo hospedador dado. El término "funcional" pretende referirse a que es capaz de funcionar en un organismo hospedador dado.

Los promotores que el gen quimérico según la invención puede contener son constitutivos o inducibles. A título de ejemplo, los promotores utilizados para la expresión en bacterias pueden seleccionarse de entre los promotores indicados a continuación. Para la expresión en *Escherichia coli* se puede hacer mención de los promotores *lac*, *trp*, *lpp*, *phoA*, *recA*, *araBAD*, *prou*, *cst-I*, *tetA*, *cadA*, *nar*, *tac*, *trc*, *lpp-lac*, *Psyn*, *cspA*, *PL*, *PL-9G-50*, *PR-PL*, *T7*, *[lambda]PL-PT7*, *T3-lac*, *T5-lac*, gen 32 de T4, *nprM-lac*, *VHb* y proteína A, o alternativamente el promotor *P_{trp}* (documento WO 99/64607). Para la expresión en bacterias Gram-positivas, tales como *Corynebacteria* o *Streptomyces*, puede hacerse mención de los promotores *P_{tipA}* o *PS1* y *PS2* (documento FR91/09870) o los indicados en la solicitud EP0629699A2. Para la expresión en levaduras y hongos, puede hacerse mención de los promotores *PLAC4* de *K. lactis* o el promotor *P_{pgk}* de *K. lactis* (solicitud de patente FR 91/05294), el promotor *tef1* o *cbh1* de *Trichoderma* (documento WO 94/04673), el promotor *his*, *csl* o *apf* de *Penicillium* (documento WO 00/68401) y el promotor *gla* de *Aspergillus*.

Según la invención, el gen quimérico puede comprender además otras secuencias reguladoras, las cuales están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como los activadores de transcripción (intensificadores).

De esta manera, el gen quimérico de la invención comprende en una forma de realización específica por lo menos, en la dirección de transcripción, ligadas funcionalmente, una secuencia reguladora promotora que es funcional en el organismo hospedador, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la malato cinasa de la malato semialdehído deshidrogenasa de la invención y una secuencia reguladora finalizadora que es funcional en dicho organismo hospedador.

La presente invención se refiere además a un vector de clonación y/o expresión que comprende un gen quimérico según la invención o una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. El vector según la invención resulta de utilidad para transformar un organismo hospedador y expresar en dicho organismo cualquiera de entre malato cinasa, malato semialdehído deshidrogenasa y/o DHB deshidrogenasa. Dicho vector puede ser un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus. Preferentemente, el vector de transformación según la invención es un plásmido. Generalmente, las cualidades principales de dicho vector deberían ser la capacidad de automantenerse y se autorreplicarse en las células del organismo hospedador, en particular en virtud de la

5 presencia de un origen de replicación, y de expresar cualquiera de entre la malato cinasa, la malato semialdehído deshidrogenasa y/o la DHB deshidrogenasa en el mismo. Con el propósito de conseguir la transformación estable de un organismo hospedador, el vector también puede integrarse en el genoma. La elección de dicho vector, y también las técnicas de inserción del gen quimérico según la invención en dicho vector y son parte del conocimiento general del experto en la materia. Ventajosamente, el vector utilizado en la presente invención contiene además, además del gen quimérico según la invención, un gen quimérico codificante de un marcador seleccionable. Dicho marcador seleccionable posibilita la selección de los organismos hospedadores que resultan transformados eficazmente, es decir, los que han incorporado el vector. Según una forma de realización particular de la invención, el organismo hospedador que debe transformarse es una bacteria, una levadura o un hongo. Entre los marcadores seleccionables que pueden utilizarse, pueden mencionarse marcadores que contienen genes de resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, el gen de higromicina fosfotransferasa. Otros marcadores pueden ser genes que complementan una auxotrofia, tal como los genes *pyrA*, *pyrB*, *pyrG*, *pyr4*, *arg4*, *argB* y *trpC*, el gen de molibdopterina sintasa o el de la acetamidasa. También puede hacerse mención a genes codificantes de enzimas fácilmente identificables, tales como el enzima GUS, o genes codificantes de pigmentos o enzimas reguladores de la producción de pigmentos en las células transformadas. Dichos genes marcadores seleccionables se indican en particular en las solicitudes de patente WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 y WO 97/04103.

20 La presente invención se refiere además a organismos hospedadores transformados que contienen por lo menos un gen quimérico según la invención, integrado en su genoma o incluido en un elemento genético extracromosómico, por ejemplo un plásmido. En un aspecto más específico de la invención, el organismo hospedador transformado comprende un ácido nucleico de la invención codificante de una malato cinasa o un gen quimérico que comprende un ácido nucleico codificante de la malato cinasa y/o un ácido nucleico codificante de una malato semialdehído deshidrogenasa, o un gen quimérico que comprende un ácido nucleico codificante de una malato semialdehído deshidrogenasa o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una malato semialdehído deshidrogenasa y/o un ácido nucleico codificante de una DHB deshidrogenasa, un gen quimérico que comprende un ácido nucleico codificante de una DHB deshidrogenasa o un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una DHB deshidrogenasa.

30 En un aspecto específico de la invención, el ácido nucleico codificante de la malato cinasa está representado por la SEC ID nº 13, SEC ID nº 15, SEC ID nº 17, SEC ID nº 19, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42 o SEC ID nº 44, el ácido nucleico codificante de la malato semialdehído deshidrogenasa está representado por la SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65 o SEC ID nº 67, y el ácido nucleico codificante de la DHB deshidrogenasa está representado por la SEC ID nº 73, SEC ID nº 75, SEC ID nº 224, SEC ID nº 226 o SEC ID nº 82.

40 La expresión "organismo hospedador" pretende referirse a cualquier organismo monocelular inferior en el que puede introducirse el gen o genes quiméricos, el ácido o ácidos nucleicos o el vector o vectores según la invención con el fin de producir 2,4-DHB. Preferentemente, el organismo hospedador es un microorganismo, en particular un hongo, por ejemplo del género *Penicillium* o *Aspergillus* y más particularmente *Aspergillus flavus*, *Chrysosporium* o *Trichoderma*, una levadura, en particular del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* o *Pichia*, y más particularmente *Zygosaccharomyces rouxii*, una bacteria, por ejemplo del género *Escherichia*, en particular *E. coli*, o el género *Corynebacterium*, más particularmente *Corynebacterium glutamicum*, o del género *Streptomyces* o un baculovirus.

50 El organismo hospedador puede ser un organismo hospedador que sobreproduce naturalmente malato o succinato a partir de azúcares tales como glucosa, o un organismo hospedador que ha sido manipulado para sobreproducir malato o succinato a partir de azúcares tales como glucosa y en el que todos los potenciales transportadores membranaarios que facilitan la exportación de ácidos orgánicos, tales como malato, piruvato, succinato y fumarato, han sido eliminados. El organismo hospedador puede ser un organismo que ha sido manipulado para sobreproducir DHB y en el que la totalidad de los transportadores membranaarios que facilitan la exportación de ácidos orgánicos tales como malato, piruvato, succinato y fumarato han sido eliminados. Son ejemplos de permeasas que facilitan la exportación del malato y de otros ácidos orgánicos, Mae1 de *Schizosaccharomyces pombe* (Camarasa *et al.*, 2001; Grobler *et al.*, 1995), DctA de *Bacillus subtilis* (Groeneveld *et al.*, 2010), Dct 1-4 de *E. coli*, Jen1 de *S. cerevisiae* (Akita *et al.*, 2000). Para un experto resultará posible identificar las permeasas candidatas en otros microorganismos basándose en la homología de las secuencias. Estas construcciones sirven para mantener el malato y otros ácidos orgánicos dentro de la célula para que se encuentren disponibles para la producción de DHB.

60 La expresión "organismo hospedador transformado" pretende referirse a un organismo hospedador que se ha incorporado en su genoma o en un elemento genético extracromosómico, por ejemplo un plásmido, por lo menos un gen quimérico según la invención y en consecuencia produce cualquiera de entre la malato cinasa, la malato semialdehído deshidrogenasa y/o la DHB deshidrogenasa en sus tejidos, o en un medio de cultivo. Con el fin de obtener los organismos hospedadores según la invención, el experto en la materia puede utilizarse uno de entre muchos procedimientos de transformación conocidos.

Uno de dichos procedimientos consiste en poner en contacto las células de los organismos hospedadores que deben transformarse con polietilenglicol (PEG) y con los vectores según la invención. La electroporación es otro procedimiento, que consiste en someter a las células que deben transformarse y los vectores de la invención, a un campo eléctrico. Otro procedimiento consiste en inyectar directamente los vectores en las células o en los tejidos mediante microinyección. Puede utilizarse el procedimiento "biolístico". Consiste en bombardear las células o tejidos con partículas sobre las que se encuentran adsorbidos los vectores de la invención (patente US nº 4.945.050).

Se describen en la literatura varios procedimientos para la transformación de bacterias para las bacterias *Escherichia coli* y otras bacterias Gram-negativas. También puede utilizarse la conjugación. Para las bacterias Gram-positivas, puede utilizarse la electroporación y también la transformación de protoplastos, en particular para bacterias del género *Streptomyces*.

En la literatura también se describen varios procedimientos para la transformación de hongos. La transformación de protoplastos con PEG se ha descrito para *Aspergillus* en el documento nº EP 0260762y una adaptación de este procedimiento para la especie *Penicillium funiculosum* se describe en el documento nº WO 00/36120. También es conocida la transformación mediante integración mediada por enzima de restricción (REMI, por sus siglas en inglés), al igual que la transformación de protoplastos utilizando bacterias del género *Agrobacterium*. También se describen en la literatura técnicas para la transformación de levaduras.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento de producción de 2,4-DHB que comprende la etapa de cultivar un microorganismo transformado de la invención.

Para la producción de DHB pueden utilizarse diversos carbohidratos, individualmente o en forma de una mezcla, tal como glucosa, fructosa, sacarosa, melaza, maltosa, melaza negra, hidrolizado de almidón (glucosa, oligosacáridos), lactosa, maltosa, almidón e hidrolizados de almidón, celulosa, hidrolizado de celulosa, glicerol y determinados hidrocarburos, aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, así como ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico. Dichas sustancias pueden utilizarse individualmente o en forma de mezclas.

Pueden utilizarse diversas fuentes de nitrógeno, individualmente o en forma de mezclas, para la producción comercial y a escala piloto, incluyendo compuestos inorgánicos, tales como amonio gaseoso y acuoso, sales amónicas de ácidos inorgánicos u orgánicos, tales como sulfato amónico, nitrato amónico, fosfato amónico, cloruro amónico, acetato amónico y carbonato amónico. Alternativamente, también pueden utilizarse materiales orgánicos que contiene nitrógeno naturales, tales como hidrolizado de soja, hidrolizado de HCl de proteína de soja (aproximadamente 7% de nitrógeno total), harina de soja, hidrolizado, hidrolizado de torta de soja, licor de maceración del maíz, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, urea, peptonas y aminoácidos.

El procedimiento de producción puede llevarse a cabo bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas y de limitación de oxígeno. Puede llevarse a cabo en forma de procedimiento alimentado por lotes o un procedimiento discontinuo.

Dicha producción de 2,4-DHB puede llevarse a cabo mediante el cultivo del organismo hospedador en medio en el que se ha añadido malato (u otro ácido orgánico, tal como piruvato, succinato o fumarato), solo o conjuntamente con otra fuente de carbono que garantice el crecimiento. El malato (y otros ácidos orgánicos) puede añadirse directamente o mediante el diseño de un procedimiento de fermentación en dos etapas en el que el malato (u otros ácidos orgánicos) es producido en una primera etapa del procedimiento por un microorganismo sobreproductor de malato y se lleva a cabo la producción de 2,4-DHB en la etapa siguiente mediante un organismo hospedador según la invención.

La separación y purificación del producto es un factor muy importante que afecta enormemente a la eficiencia global del procedimiento y a los costes del producto. Los procedimientos de recuperación del producto comúnmente comprenden las etapas de separación celular, así como de purificación, concentración y secado del producto, respectivamente.

Separación celular

Puede utilizarse la ultrafiltración y la centrifugación para separar las células a partir del medio de fermentación. La separación de las células del medio de fermentación con frecuencia resulta complicada por la elevada viscosidad del medio. Por lo tanto, se pueden añadir aditivos, tales como ácido mineral o sales alcalinas, o mediante el calentamiento del caldo de cultivo, a fin de optimizar la separación de las células.

Recuperación del producto

Pueden ponerse en práctica diversos procedimientos cromatográficos de intercambio iónico para la separación

de DHB antes o después de la separación de la biomasa. Entre ellos se incluyen la utilización de resinas primarias de intercambio catiónico que facilitan la separación de los productos según su punto isoeléctrico. Típicamente, la resina se carga con la solución y el producto retenido se eluye separadamente tras el incremento del pH (por ejemplo mediante la adición de hidróxido amónico) del eluyente. Otra posibilidad representa la utilización de la cromatografía de intercambio iónico utilizando resinas de lecho fijo o móvil simulado. Puede resultar necesario combinar diferentes etapas cromatográficas con el fin de alcanzar una pureza adecuada del producto. Dichos procedimientos de purificación resultan más económicos que una costosa etapa de cristalización, proporcionando además ventajas adicionales y flexibilidad respecto a la forma del producto final.

10 Concentración y secado del producto

El procedimiento de purificación puede comprender además una etapa de secado que puede incluir cualesquiera medios de secado adecuados, tales como granulador de pulverización, un secador de pulverización, un secador de tambor, un secador giratorio y un secador de túnel. Pueden obtenerse soluciones de DHB concentradas mediante el calentamiento de caldos de fermentación bajo presión reducida con vapor a 130°C utilizando un concentrador multiuso o evaporador de capa fina.

Puede garantizarse la producción eficiente de DHB mediante la optimización de la redistribución del flujo de carbono en la red metabólica del organismo hospedador y garantizando el suministro suficiente de NADPH y ATP para los tres enzimas de la ruta de DHB. La canalización del flujo de carbono a una ruta metabólica deseada y el suministro de cofactor NAD(P)H se ve facilitado comúnmente mediante la eliminación o reducción de las rutas fermentativas naturales en competencia. Son ejemplos no limitativos:

- La optimización de la producción del malato en *S. cerevisiae* mediante el bloqueo de la formación del etanol (mediante eliminación de las piruvato descarboxilasas (Zelle *et al.*, 2008; Zelle *et al.*, 2010)).
- La optimización de la producción de succinato o malato en *E. coli* mediante el bloqueo de la formación de lactato (por ejemplo la eliminación de *ldhA*), la formación de acetato (por ejemplo la eliminación de *pta*, *ackA*), la formación de etanol (por ejemplo la eliminación de *adhE*), la formación de formato (por ejemplo la eliminación de *pflB*, *focA*), la oxidación de piruvato (por ejemplo la eliminación de *poxB*), la degradación de malato (delección de *maeb* y *scfA*), la formación de succinato (por ejemplo eliminación de *frdBC*), la formación de metilgloxal (delección de *mgsA*) (Jantama *et al.*, 2008a; Jantama *et al.*, 2008b; Lin *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2011).

Otra posibilidad para incrementar el flujo de carbono y el suministro de ATP para la producción de ácidos orgánicos es la manipulación del nodo de ramificación del fosfoenolpiruvato (PEP)/piruvato/oxaloacetato (revisión en Sauer y Eikmanns, 2005). Son ejemplos no limitativos de estrategias de manipulación metabólica que garantizan el incremento del flujo de carbono del fosfoenolpiruvato al oxalacetato

- la optimización de la producción del malato en *S. cerevisiae* mediante el bloqueo de la función de la piruvato cinasa y el incremento de la actividad de la PEP carboxilasa (Zelle *et al.*, 2010).
- La optimización de la producción del succinato en *E. coli* mediante el incremento de la actividad de PEP carboxilasa, PEP carboxilasa o piruvato carboxilasa natural o de expresión heteróloga (Millard *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2005b; Zhang *et al.*, 2009).

Otra posibilidad para incrementar el flujo de carbono y el suministro de ATP para la producción de ácidos orgánicos en *E. coli* y en otras bacterias utilizando el sistema de fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) consumidor de PEP para la etapa inicial de fosforilación de la glucosa es la eliminación de los componentes esenciales del sistema PTS (por ejemplo *ptsI* o *ptsG*) (Lin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Para garantizar la incorporación adicional de glucosa en mutantes portadores de mutaciones deletéreas del sistema PTS, debe garantizarse la actividad de sistemas alternativos de incorporación de la glucosa (por ejemplo GalP).

Otra posibilidad para incrementar el flujo de carbono hacia las rutas deseadas para la producción de ácidos orgánicos es la manipulación del ciclo del ácido cítrico y el glioxilato. Son ejemplos no limitativos:

- La optimización de la producción de ácido succínico en *E. coli* mediante el incremento de la actividad de la isocitrato liasa (delección del represor transcripcional *icIR*) (Lin *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005a).
- La optimización de la producción de ácido succínico mediante la eliminación de la isocitrato deshidrogenasa y/o la succinato deshidrogenasa (Lin *et al.*, 2005).

Otra posibilidad para incrementar el flujo de carbono hacia las rutas deseadas para la producción de DHB es la expresión de piruvato deshidrogenasas y citrato sintasas apropiadas en el organismo de producción. La piruvato deshidrogenasa y citrato sintasa naturales de *E. coli* resultan inhibidas por las concentraciones intracelulares elevadas de NADH, provocando que dichos enzimas sean menos activos bajo condiciones anaeróbicas. En *E.*

coli, la expresión de una piruvato deshidrogenasa mutante que es insensible a NADH resulta en la sobreproducción de acetil-CoA bajo condiciones anaeróbicas y una redistribución modificada del flujo de carbono entre los productos finales fermentativos (acetato, lactato, etanol, formato y piruvato) (Wang *et al.*, 2010). La expresión heteróloga de la citrato sintasa de *Bacillus subtilis*, que es insensible a NADH, incrementa la producción del ácido succínico en cepas manipuladas de *E. coli* (Sánchez *et al.*, 2005a). En combinación con las mutaciones anteriormente indicadas, la utilización de las piruvato deshidrogenasas y citrato sintasas apropiadas (sensibles o insensibles a NADH) permite el ajuste fino de la redistribución del flujo de carbono entre las reacciones del ciclo del glioxilato y el ácido cítrico y las rutas fermentativas bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas.

Otra posibilidad para incrementar el flujo de carbono por la ruta de DHB es la eliminación de las reacciones enzimáticas que podrían degradar los intermediarios de la ruta 4-fosfomalato y 4-malato semialdehído. Los enzimas candidatos que podrían degradar el malato semialdehído se encuentran las semialdehído succínico deshidrogenasas (*sad*, *gabD*) y otras deshidrogenasas que son capaces de oxidar las moléculas C4 con grupos aldehído terminales.

Otra posibilidad para incrementar la productividad de DHB del organismo hospedador es la eliminación de las reacciones metabólicas que degradan el DHB. El DHB es un inhibidor competitivo del enzima málico. De esta manera, presenta una afinidad comparativamente elevada para el sitio activo de dicho enzima (Rognstad y Katz, 1979). Por lo tanto, el DHB puede ser reconocido por otros enzimas y potencialmente degradado. Dichos enzimas pueden identificarse y eliminarse del organismo hospedador.

En el caso de que la producción de 2,4-DHB se base en la adición de malato u otros ácidos orgánicos, los microorganismos productores de 2,4-DHB deberían expresar funcionalmente una proteína de transporte membranario que facilite la incorporación del malato (u otros ácidos orgánicos tales como el piruvato, el succinato, etc.).

Los ejemplos siguientes ilustran la invención. Los presentes ejemplos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: (i) Esquema de reacción que describe la conversión del (L)-malato en (L)-2,4-dihidroxitbutirato (DHB), e (ii) analogía con la conversión del (L)-aspartato en (L)-homoserina.

Figura 2: Alineación de secuencias de aminoácidos de las aspartato cinasas de diferentes organismos. (Ec_AKIII - aspartato cinasa III (SEC ID nº 4), LysC, de *E. coli*, Ec_AKI (SEC ID nº 87)- aspartato cinasa I, ThrA, de *E. coli*, Ec_AKII (SEC ID nº 88- aspartato cinasa II, MetL, de *E. coli*, Mj - *Methanococcus jannaschii* (SEC ID nº 89), Tt - *Thermus thermophilus* (SEC ID nº 90), Cg - *Corynebacterium glutamicum* (SEC ID nº 91), At - *Arabidopsis thaliana* (SEC ID nº 92), Sc - *Saccharomyces cerevisiae* (SEC ID nº 93)). La figura se produjo utilizando ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

Figura 3: Alineación de secuencias de aminoácidos de las aspartato semialdehído deshidrogenasas de diferentes organismos. (Ec -*E. coli* (SEC ID nº 49), Mj - *Methanococcus jannaschii* (SEC ID nº 94), Tt - *Thermus thermophilus* (SEC ID nº 95), Bs - *Bacillus subtilis* (SEC ID nº 96), Cg - *Corynebacterium glutamicum* (SEC ID nº 97), At - *Arabidopsis thaliana* (SEC ID nº 98), Sc - *Saccharomyces cerevisiae* (SEC ID nº 99)). La figura se produjo utilizando ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

Figura 4: Cromatogramas de CG que muestran una ampliación de la región que corresponde al tiempo de retención de DHB, mostrando: (A) estándar de DHB (concentración=1 mM); (B) composición de la Reacción A, que contiene malato cinasa (MK), malato semialdehído deshidrogenasa (MSA-Dh) y malato semialdehído reductasa (MSA-Red); (C) composición de la Reacción B de control (igual que A pero sin MSA-Red); (D) composición de la Reacción C de control (igual que A pero sin MSA-Dh).

Figura 5: Actividades relativas de los mutantes purificados LysC E119G, LysC E119G E250K, LysC E119G T344M, LysC E119G S345L, LysC E119G T344M y LysC E119G T352I con respecto a la concentración de lisina en el tampón de reacción.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de las aspartato cinasas LysC y Hom3 de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, para la actividad de aspartato y malato cinasa

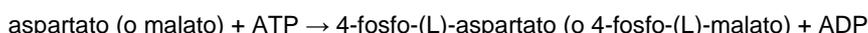
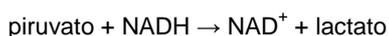
5 *Construcción de plásmidos que contienen genes de tipo salvaje de aspartato cinasa:* el plásmido pLYSCwt se construyó mediante la amplificación del gen *lysC* mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y los cebadores directos e inversos
 10 ⁵CACGAGGTACATATGTCTGAAATTGTTGTCTCC³ (SEC ID nº 1) y ⁵CTCCAGGGGATCCAGT-
 ATTTACTCAAAC³ (SEC ID nº 2) que introducen sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Como molde se utilizó ADN genómico de *E. coli* DH5α. El producto de PCR se digirió con *NdeI* y *BamHI*, se ligó en los sitios correspondientes del vector de expresión pET28a (Novagen) utilizando ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformó en células de *E. coli* DH5α. Se aisló el plásmido pAKIIIwt resultante y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía el gen *lysC* de longitud completa que presentaba la secuencia correcta (SEC ID nº 3). La proteína correspondiente está representada por la SEC ID nº 4.

20 El plásmido pHOM3wt se construyó mediante la amplificación del gen *HOM3* mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y los cebadores directos e inversos
⁵TATAATGCTAGCATGCCAATGGATTCCAACC³ (SEC ID nº 5) and ⁵TATAATGAATTCT-
 TAAATTCCAAGTCTTTTCAATTGTTCC³ (SEC ID nº 6) que introducen sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Se utilizó ADN genómico de *S. cerevisiae* BY4741 como el molde. El producto de PCR se digirió con *NdeI* y *EcoRI*, y se ligó en los sitios correspondientes del vector de expresión pET28a (Novagen) utilizando ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformó en células de *E. coli* DH5α. Se aisló el plásmido pHOM3wt resultante y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía el gen *HOM3* de longitud completa que presentaba la secuencia correcta (SEC ID nº 7). La proteína correspondiente está representada por la SEC ID nº 8.

30 *Expresión de los enzimas:* se transformaron células de *E. coli* BL21 D3 star con los plásmidos apropiados. Se expresaron los enzimas con una etiqueta hexa-His N-terminal en cultivos con 250 ml de LB que habían sido inoculados a partir de un cultivo de durante la noche con una DO₆₀₀ de 0,1 y se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 0,6 antes de inducir la expresión de las proteínas mediante la adición de β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM al medio de cultivo. Tras 3 h de expresión de proteínas, se recolectaron las células mediante centrifugación a 13.000 g durante 10 minutos y se almacenaron a -20°C hasta el análisis posterior. Se llevó a cabo el crecimiento y la expresión de las proteínas a 37°C. El medio de cultivo contenía 50 µg/l de canamicina.

40 *Purificación de enzimas:* Los pellets celulares congelados de los cultivos de expresión se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de rotura (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,5) y se rompieron mediante cuatro rondas sucesivas de sonicación (Biolock Scientific, VibraCell™ 72437) con la potencia fijada al 30%. Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación de los extractos en bruto durante 15 min. a 4°C a 13.000 g y conservando el sobrenadante clarificado. Se eliminó el ARN y el ADN de los extractos mediante la adición de estreptomina 15 mg/ml (Sigma), la centrifugación de las muestras a 13.000 g durante 10 min. a 4°C y conservando el sobrenadante. El extracto de proteínas clarificadas se incubó durante 1 h a 4°C con volúmenes de lecho de 0,75 ml de resina de afinidad Talon™ Cobalt (Clontech). La suspensión se centrifugó a 700 g en una centrífuga de laboratorio y se eliminó el sobrenadante. La resina se lavó con 10 volúmenes de lecho de tampón de lavado (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 15 mM, pH 7,5) antes de eluir las aspartato cinasas con 0,5 ml de tampón de elución (Hepes 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5). Se verificó la pureza de los enzimas eluidos mediante análisis de SDS-PAGE.

50 *Ensayo enzimático:* Se sometieron a ensayo actividades de aspartato o malato cinasa mediante el acoplamiento de la producción de ADP en las reacciones de cinasa con la oxidación del NADH en presencia de fosfoenolpiruvato, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa.

Esquema de reacción:Aspartato (o malato) cinasaPiruvato cinasaLactato deshidrogenasa

La mezcla de ensayo contenía Hepes 50 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NADH 0,24 mM, ATP 0,96 mM, PEP 0,96 mM, 9 µg/ml de lactato deshidrogenasa (Sigma, L2500), 12,4 µg/ml de piruvato cinasa (Sigma, P1506) y cantidades apropiadas de aspartato (malato) cinasa purificada. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de (L)-aspartato o (L)-malato 50 mM. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 30°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 µl. Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica del NADH a 340 nm en un lector de microplacas (BioRad 680XR).

Ensayo de hidroxamato: con el fin de verificar la fosforilación del sustrato, es decir la formación de un anhídrido de acilfosfato, por las aspartato cinasas de tipo salvaje o mutadas, se incubó el producto de la reacción de la cinasa con hidroxilamina para formar el derivado hidroxamato de aspartato o malato correspondiente. La mezcla de ensayo contenía Hepes 120 mM (pH 8), KCl 200 mM, ATP 10 mM, hidroxilamina 200 mM, aspartato o malato 10 mM y una cantidad apropiada de proteína purificada. La reacción se detuvo tras 30 minutos mediante la adición de un volumen igual de FeCl₃ al 1,7% (p/v) en ácido clorhídrico 1 M. Se verificó la formación del complejo de hidroxamato-hierro mediante la medición de su absorbancia característica a 540 nm en un lector de placas de microtitulación. Se utilizaron como blanco mezclas de ensayo que contenían todos los componentes excepto ATP.

Resultados: los enzimas purificados LysC (sin etiqueta His, SEC ID nº 4) y Hom3 (sin etiqueta His, SEC ID nº 7) mostraban actividad de aspartato cinasa pero no eran capaces de fosforilar el malato, tal como se verificó mediante el ensayo de hidroxamato (Keng y Viola, 1996). Las actividades máximas de LysC y Hom3 sobre el aspartato eran 4,5 µmoles/(min*mg_{prot}) y 1,6 µmoles/(min*mg_{prot}), respectivamente. Se estimó el valor de Km para el aspartato con el método de Eadie y Hofstee mediante la medición de las tasas de reacción iniciales (v) a diferentes concentraciones de sustrato (c) y mediante la extracción de la pendiente de la gráfica de v versus v/c. Se estimó la Km de LysC purificada y etiquetada con His en aproximadamente 0,6 mM, demostrando que la proteína etiquetada con His presenta la misma afinidad para el sustrato que el enzima purificado no etiquetado, que se ha informado que es de 0,6 mM (Marco-Marin *et al.*, 2003).

30 Ejemplo 2: mutagénesis dirigida a sitio de la aspartato cinasa LysC de *Escherichia coli* y ensayo de enzimas mutantes para actividad de malato cinasa.

La mutagénesis dirigida a sitio se llevó a cabo utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la Tabla 1 y el plásmido pLYSCwt (SEC ID nº 3) como molde. Se introdujeron mediante PCR mutaciones puntuales para modificar la secuencia de aminoácidos (Phusion 1 U, tampón HF al 20% (v/v), dNTP 2,5 mM, cebadores directos e inversos: 1 µM de cada uno, plásmido molde: 200 ng, agua) utilizando la pareja de oligonucleótidos listada en la Tabla 1. Los plásmidos creados mediante PCR contenían un nuevo sitio de restricción para *Nco1* (introducido utilizando mutaciones silenciosas) además de la mutación funcional para facilitar la identificación de los clones mutados. Los productos de PCR se digirieron mediante DpnI a 37°C durante 1 h para eliminar el ADN molde y se transformaron en células de *E. coli* 5-alfa NEB competentes (NEB). Los plásmidos mutados se identificaron mediante análisis de los sitios de restricción y se verificó que portaban las mutaciones deseadas mediante secuenciación del ADN.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para mutar la aspartato cinasa LysC de *E. coli* en posición E119.

Mutación	Secuencia 5'-3'
E119nkn	GCTGGTCAGCCATGGC>NNNCTGATGTCGACCCTGC (SEC ID nº 10) GCAGGGTCGACATCAGNNNGCCATGGCTGACCAGC (SEC ID nº 11)

La secuencia que representa una mutación en la posición 119 puede representarse con la SEC ID nº 9, en la que el residuo en la posición 119 es X, siendo X cualquiera de los 19 aminoácidos naturales (excepto glutamina).

Se expresaron, purificaron y sometieron a ensayo los enzimas mutantes para actividad de aspartato y malato cinasa tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se resumen los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2: Caracterización de enzimas mutantes para actividades de malato cinasa. Los valores corresponden a medias de por lo menos dos experimentos independientes.

Aminoácido en la posición 119 (correspondiente a la SEC ID nº)	V _{max} [µmoles/(mq*min)]	K _m [mM]
C (SEC ID nº 12)	0,97	19,7
G (SEC ID nº 14)	0,49	16,0
N (SEC ID nº 16)	0,13	27,1
P (SEC ID nº 18)	0,71	19,0
Q (SEC ID nº 20)	0,01	39,9

S (SEC ID nº 22)	0,83	15,7
T (SEC ID nº 24)	0,33	26,8
V (SEC ID nº 26)	0,29	39,7

Ninguno de los mutantes presentados en la tabla 2 presentaba actividad sobre el aspartato.

5 Los resultados demuestran que la aspartato cinasa puede transformarse en malato cinasa mediante la sustitución del glutamato conservado en la posición 119 por cisteína, glicina, asparagina, prolina, glutamina, serina, treonina o valina.

10 Las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes del enzima listado en la tabla 2 son SEC ID nº 13, SEC ID nº 15, SEC ID nº 17, SEC ID nº 19, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25 y SEC ID nº 27.

Ejemplo 3: construcción de una malato cinasa con sensibilidad fuertemente reducida a la inhibición por lisina

15 Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida a sitio utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la Tabla 3 y el plásmido pLYSC_E119G como molde. El plásmido pLYSC_119G se obtuvo tal como se indica en el Ejemplo 2, mediante la introducción de los cambios siguientes en la secuencia de ADN del gen *lysC*: (SEC ID nº 15). Se introdujeron mediante PCR mutaciones puntuales para modificar la secuencia de aminoácidos (Phusion 1U, tampón HF al 20% (v/v), dNTP 2,5 mM, cebadores directos e inversos: 1 µM de cada uno, plásmido molde: 200 ng, agua) utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la Tabla 1. En caso posible, los plásmidos
20 creados mediante PCR contenían nuevos sitios de restricción (introducidos utilizando mutaciones silenciosas) además de la mutación funcional para facilitar la identificación de los clones mutados. Los productos de PCR se digirieron mediante DpnI a 37°C durante 1 h para eliminar el ADN molde y se transformaron en células de *E. coli* 5-alfa NEB competentes (NEB). Los plásmidos mutados se identificaron mediante análisis de los sitios de restricción y se verificó que portaban las mutaciones deseadas mediante secuenciación del ADN.

25 Tabla 3: oligonucleótidos utilizados para mutar la malato cinasa *LysC_E119G* de *E. coli*.

Mutación	Secuencia 5'-3'
E250K,	GCGTTTGCCGAAGCGGCAAAGATGGCCACTTTTG (SEC ID nº 28) CAAAAGTGGCCATCTTTGCCGCTTCGGCAAACGC (SEC ID nº 29)
T344M,	GGTAGATCTAATCACCATGTCAGAAGTGAGCGTGG (SEC ID nº 30) CCACGCTCACTTCTGACATGGTGATTAGATCTACC (SEC ID nº 31)
S345L,	GGTAGATCTAATCACCACGTTAGAAGTGAGCGTGGC (SEC ID nº 32) GCCACGCTCACTTCTAACGTGGTGATTAGATCTACC (SEC ID nº 33)
T344M,	GGTAGATCTAATCACCATGTCAGAAGTGAGCGTGG (SEC ID nº 34) CCACGCTCACTTCTGACATGGTGATTAGATCTACC (SEC ID nº 35)
T352I,	GTCAGAAGTGAGCGTGGCATTAAATTCTAGATACCAC (SEC ID nº 36) GTGGTATCTAGAATTAATGCCACGCTCACTTCTGAC (SEC ID nº 37)

30 La secuencia de ácidos nucleicos de la proteína *LysC E119G* que comprende una mutación adicional correspondiente a: (i) la sustitución del ácido glutámico en la posición 250 por una lisina está representada por la SEC ID nº 38; su secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEC ID nº 39; (ii) la sustitución de la treonina en la posición 344 por metionina está representada por la SEC ID nº 40; su secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEC ID nº 41; (iii) la sustitución de la treonina en la posición 352 por isoleucina está representada por la SEC ID nº 42; su secuencia de aminoácidos
35 correspondiente está representada por la SEC ID nº 43; (iv) la sustitución de la serina en la posición 345 por leucina está representada por la SEC ID nº 44; su secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEC ID nº 45.

40 *Expresión y purificación de los enzimas:* la expresión de proteínas para los enzimas etiquetados con His *LysC E119G*, *LysC E119G E250K*, *LysC E119G T344M*, *LysC E119G S345L* y *LysC E119G T352I* se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 1.

45 *Ensayo enzimático:* las actividades de la malato cinasa se sometieron a ensayo tal como se indica en el Ejemplo 1. Se varió la concentración de lisina en el tampón de reacción.

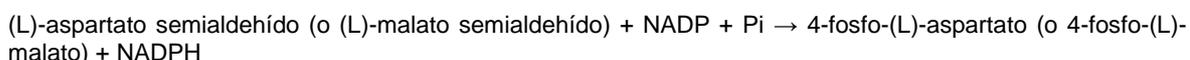
Resultados: la introducción de las mutaciones E250K, T344M o S345L en *LysC E119G* provocó que la actividad de la malato cinasa fuese en gran parte insensible a las concentraciones de lisina elevadas (ver la figura 4).

50 **Ejemplo 4: ensayo de aspartato semialdehído deshidrogenasas de *Escherichia coli* para las actividades de aspartato y malato semialdehído deshidrogenasa.**

Construcción de plásmidos que contienen genes de tipo salvaje de aspartato semialdehído deshidrogenasa: Se construyó el plásmido pASDwt mediante la amplificación del gen *asd* de *E. coli* mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y los cebadores directos e inversos 5'-TATAATGCTAGCATGAAAAATGTTGGTTTTATCGG³ (SEC ID n° 46) y 5'-TATAATGGATCCTTACGCCAGTTGACGAAGC³ (SEC ID n° 47) que introdujeron un sitio de restricción *NheI* y *BamHI* cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Se utilizó el ADN genómico de *E. coli* DH5α como molde. Se digirió el producto de PCR se digirió con *NdeI* y *BamHI*, se ligó en los sitios correspondientes del vector pET28a (Novagen) utilizando ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformó en células de *E. coli* DH5α. Se aisló el plásmido pASDwt resultante y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía el gen *asd* de longitud completa que presentaba la secuencia correcta (SEC ID n° 48). La secuencia de aminoácidos correspondiente de dicho enzima está representada por la SEC ID n° 49.

Expresión y purificación de los enzimas: la expresión de proteínas para los enzimas *Asd* etiquetados con His se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 1.

Ensayo enzimático: se sometieron a ensayo las actividades de la aspartato o malato semialdehído deshidrogenasa en la dirección biosintética inversa mediante el seguimiento de la reducción del NADP durante la oxidación del aspartato o malato semialdehído a 4-fosfo-(L)-aspartato o 4-fosfo-(L)-malato, respectivamente (Roberts *et al.*, 2003).



La mezcla de ensayo contenía Hepes 200 mM (pH 9), K₂PO₄ 50 mM y NADP 0,25 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de (L)-aspartato semialdehído o (L)-malato semialdehído. Se añadió (L)-aspartato semialdehído en forma de trifluoroacetato de hidrato de β-semialdehído de ácido L-aspartico (mantenido a pH 3 para evitar la degradación), que es un sustrato adecuado para los ensayos enzimáticos de la homoserina deshidrogenasa y la aspartato semialdehído deshidrogenasa (Roberts *et al.*, 2003). Se produjo malato semialdehído inestable nuevamente antes de los ensayos enzimáticos mediante la desprotección del derivado malato semialdehído estable 2-[(4S)-2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolán-4-il]acetaldehído (DMODA). Se obtuvo malato semialdehído mediante la incubación de DMODA en ácido clorhídrico 2 M durante 15 minutos a 25°C y la evaporación de la acetona liberada (35°C, 50 mbar). Se fijó el pH de la solución de malato semialdehído en 3 utilizando bicarbonato sódico.

Se llevaron a cabo los ensayos enzimáticos en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 µl a 30°C. Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica del NADPH a 340 nm en un lector de microplacas (BioRad 680XR).

Resultados: la aspartato semialdehído deshidrogenasa de tipo salvaje etiquetada con His, *Asd*, oxidó el (L)-aspartato semialdehído a 4-fosfo-(L)-aspartato con una actividad específica máxima de 160 µmoles/(min*mg_{prot}). Sobre el (L)-malato semialdehído el enzima presentaba una actividad de 0,01 µmoles/(min*mg_{prot}).

Ejemplo 5: mutagénesis dirigida a sitio de la aspartato semialdehído deshidrogenasa *Asd* de *Escherichia coli* y ensayo de enzimas mutantes para actividad de malato semialdehído deshidrogenasa.

Se introdujeron mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de *Asd* utilizando el plásmido pASDwt como molde y siguiendo el protocolo descrito de manera general en el Ejemplo 2. Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos listadas en la Tabla 4 para mutar el residuo glutamato en la posición 241 o el residuo treonina en la posición 136. Los plásmidos mutados se identificaron mediante análisis de los sitios de restricción y se verificó que portaban las mutaciones deseadas mediante secuenciación del ADN.

La proteína *Asd* mutada en la posición 241 puede representarse mediante la SEC ID n° 68, en la que el residuo en la posición 241 es X, siendo X cualquiera de los otros 19 aminoácidos naturales (excepto glutamina).

Tabla 4: oligonucleótidos utilizados para mutar la aspartato semialdehído deshidrogenasa *Asd* de *E. coli* en las posiciones E241 y T136.

Mutación	Secuencia 5'-3'
E241nnn,	AGCTCGATAACGGTCAGAGTCGANNNGAGTGGAAAGGGCAGG CGG (SEC ID n° 50) CCGCCTGCCCTTTCCACTCNNNTCGACTCTGACCGTTATCGAG CT (SEC ID n° 51)
T136N,	TTTTGTTGCGGGTAACTGTAACGTGTCCCTGATGTTG (SEC ID n° 52)
	CAACATCAGGGACACGTTACAGTTACGCCAACAAAA (SEC ID n° 53)

Resultados: las actividades y valores de Km de Asd mutado en la posición E241 se resumen en la Tabla 5. Los mutantes de Asd en los que el glutamato 241 se ha sustituido por alanina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, metionina o glutamina oxidaron el (L)-aspartato-4-semialdehído a 4-fosfo-(L)-aspartato con una actividad específica máxima significativamente más elevada que el enzima de tipo salvaje. El enzima Asd doble mutante E241Q T136N (SEC ID nº 231) presentaba una actividad específica máxima de 0,25 $\mu\text{moles}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}$) y una Km de 0,25 mM.

Tabla 5: Caracterización de enzimas mutantes para actividades de malato semialdehído deshidrogenasa. Los valores corresponden a medias de por lo menos dos experimentos independientes.

Aminoácido en la posición 241 (correspondiente a la SEC ID nº)	V _{max} [$\mu\text{moles}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]	Km* [mM]
A (SEC ID nº 54)	0,09	0,378
C (SEC ID nº 56)	0,18	0,5
E (=wt) (SEC ID nº 49)	0,01	
G (SEC ID nº 58)	0,09	0,18
H (SEC ID nº 60)	0,10	0,8
I (SEC ID nº 62)	0,10	0,23
M (SEC ID nº 64)	0,15	0,43
Q (SEC ID nº 66)	0,39	0,52

* Se estimaron los valores de Km únicamente para mutantes seleccionados

Los ácidos nucleicos correspondientes están representados por SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 48, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65 y SEC ID nº 67.

El enzima Asd doble mutante E241Q T136N presenta una secuencia de ácidos nucleicos representada por la SEC ID nº 230.

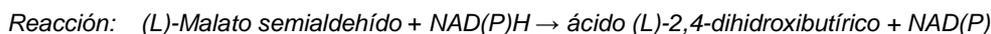
Ejemplo 6: identificación de una 2,4-DHB-deshidrogenasa

Con el fin de identificar una 2,4-DHB-deshidrogenasa adecuada, se sometieron a ensayo para su capacidad de reducir el malato semialdehído, beta-hidroxiácido deshidrogenasas de diferente origen biológico. Entre los enzimas sometidos a ensayo se encontraban la metilbutiraldehído reductasa, Ypr1 (Ford y Ellis, 2002) (SEC ID nº 73 y SEC ID nº 74), de *Saccharomyces cerevisiae*, y la semialdehído succínico reductasa, Ms-Ssr de *Metallosphaera sedula* (Kockelkorn y Fuchs, 2009) (SEC ID nº 75 y SEC ID nº 76). Los genes YPR1 y Ms-SSR se amplificaron utilizando los cebadores listados en la Tabla 6 y se clonaron en el vector pET28 (ver los enzimas de restricción en la Tabla 3), rindiendo los plásmidos pYPR1 y pMs-SSR, respectivamente. Las proteínas se expresaron y purificaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1.

Tabla 6: cebadores y enzimas de restricción utilizados para clonar las beta-hidroxiácido deshidrogenasas candidatas

Enzima	Nº de acceso	Cebador 5'-3'	Enzimas de restricción
Ms-SSR	GI:146304190	TATAATGCTAGCATGAAAGCTGCAGTACTTCA (SEC ID nº 69)	<i>NheI</i>
		TATAATGAATTCTTACGGGATTATGAGACTTC (SEC ID nº 70)	<i>EcoRI</i>
YPR1	GI:6320576	TATAATGCTAGCATGCCTGCTACGTTAAAGAA (SEC ID nº 71)	<i>NheI</i>
		TATAATGAGCTCTCATTGGAAAATTGGGAAGG (SEC ID nº 72)	<i>SacI</i>

Ensayo de la actividad de malato semialdehído reductasa:



La mezcla de ensayo contenía Hepes 200 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NADH o NADPH 0,24 mM y cantidades apropiadas del enzima purificado. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de (L)-malato semialdehído 10 mM (el malato semialdehído se preparó nuevamente para cada ensayo; ver el Ejemplo 4). Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a 30°C en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 250 μl . Se realizó un seguimiento de las reacciones a partir de la absorción característica del NAD(P)H a 340 nm en un lector de microplacas (BioRad 680XR). Se listan los resultados en la Tabla 7.

Tabla 7: actividad reductora de beta-hidroxiácido deshidrogenasas seleccionadas del malato semialdehído (los resultados son de medias de por lo menos dos experimentos independientes).

Enzima	Origen	Función conocida	Actividad sobre el malato semialdehído (cofactor NADH) [$\mu\text{moles}/(\text{mm}^3 \cdot \text{mg}_{\text{prot}})$]	Actividad sobre el malato semialdehído (cofactor NADPH) [$\mu\text{moles}/(\text{mm}^3 \cdot \text{mg}_{\text{prot}})$]
Ms-SSR (SEC ID nº 76)	<i>M. sedula</i>	Semialdehído succínico reductasa	4,9	4,9
YPR1 (SEC ID nº 74)	<i>S. cerevisiae</i>	Metilbutiraldehído reductasa	nd	0,19

5 La semialdehído succínico deshidrogenasa de *M. sedula* y la metilbutiraldehído reductasa de *S. cerevisiae* presentan actividad de malato semialdehído reductasa. La Km de Ms-SSR para el malato semialdehído era de 1,1 mM.

10 **Ejemplo 7: mutagénesis dirigida a sitio de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula***

10 La mutagénesis dirigida a sitio se llevó a cabo utilizando las parejas de oligonucleótidos listadas en la Tabla 8 y el plásmido pMs-SSR como molde. Se introdujeron mediante PCR mutaciones puntuales para modificar la secuencia de aminoácidos (Phusion 1 U, tampón HF al 20% (v/v), dNTP 2,5 mM, cebadores directos e inversos: 1 μM de cada uno, plásmido molde: 200 ng, agua). En caso posible, los plásmidos creados mediante PCR 15 contenían nuevos sitios de restricción (introducidos utilizando mutaciones silenciosas) además de la mutación funcional para facilitar la identificación de los clones mutados. Los productos de PCR se digirieron mediante *DpnI* a 37°C durante 1 h para eliminar el ADN molde y se transformaron en células de *E. coli* 5-alfa NEB competentes (NEB). Los plásmidos mutados se identificaron mediante análisis de los sitios de restricción y se verificó que 20 portaban las mutaciones deseadas mediante secuenciación del ADN. La Tabla 9 resume los parámetros cinéticos de los mutantes. Los resultados demuestran que el doble mutante Ms-SSR H39R N43H (SEC ID nº 81, SEC ID nº 82) presenta una afinidad mejorada para el malato semialdehído en comparación con el enzima de tipo salvaje.

25 **Tabla 8:** parejas de cebadores utilizados para mutar la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* (Ms-SSR).

Mutación	Cebador 5'-3'	Enzimas de restricción
H39R	gtcaaggcaaccggtctctgtcgcctccgacgtcaatg (SEC ID nº 77). cattgacgtcggagcgacagagaccggttccttgac (SEC ID nº 78).	<i>NheI</i>
N43H	ggctctgtcactccgacgtacatgtctttgaggggaaaac (SEC ID nº 79). gtttcccctcaaagacatgtacgtcggagtgacagagcc (SEC ID nº 80).	<i>NheI</i>

Tabla 9: resumen de los parámetros cinéticos de los mutantes de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* (Ms-SSR) (los resultados son de medias de por lo menos dos experimentos independientes).

Mutante	Actividad máxima [$\mu\text{moles}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{prot}})$]	Km [mmoles/l]
Tipo salvaje (SEC ID nº 76)	4,9	1,1
H39R (SEC ID nº 225)	1,7	0,5
N43H (SEC ID nº 227)	4,3	2,5
H39R N43H (SEC ID nº 81)	4,7	0,4

Las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes están representadas por la SEC ID nº 224, SEC ID nº 226 y SEC ID nº 82.

35 **Ejemplo 8: producción *in vitro* de DHB**

Los enzimas malato cinasa (LysC E119G, SEC ID nº 15), malato semialdehído deshidrogenasa (Asd E241Q, SEC ID nº 67) y malato semialdehído reductasa (Ms SsrR, SEC ID nº 76) se expresaron y se purificaron tal como se ha indicado en el Ejemplo 1. Se demostró la producción de DHB *in vitro* mediante la adición de malato 50 mM a una mezcla de reacción que contenía HEPES 50 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NADPH 1 mM, 180 $\mu\text{g/l}$ de malato cinasa (Lys E119G), 325 $\mu\text{g/ml}$ de malato semialdehído deshidrogenasa (Asd E241Q) y 130 $\mu\text{g/ml}$ de malato semialdehído reductasa (Ms_Ssr) (Reacción A). Las reacciones de control contenían todos los componentes pero no incluían malato semialdehído deshidrogenasa (Reacción B) o malato semialdehído

deshidrogenasa (Reacción (C). Tras 30 min. de incubación a 30°C, se analizó la mezcla de reacción mediante cromatografía de gases [CPG, Varian Series 430, dotado de detector FID; automuestreador CP8400, inyector splitless 1177 (230°C); columna: CP-WAX58/FFAP, 30 m x 0,3 mm, di 0,50 µm; y alineador: Prensaestopas de entrada, cuello de cisne 6,5 x 78,5 x 4 mm GWOL (Varian). El gas portador era nitrógeno, a un caudal de 25 ml/min. La ionización de llama se llevó a cabo utilizando una mezcla de aire-hidrógeno (los caudales eran 300 ml/min. y 30 ml/min., respectivamente). La temperatura del detector era 240°C. Volumen de muestra inyectado: 1 µl. En la Tabla 10 se proporciona un programa de temperaturas.

Tabla 10: programa de temperaturas para el análisis de las mezclas de reacción.

Temperatura de la columna [°C]	Tiempo de retención [min.]	Gradiente [°C/min]	Tiempo de operación
90	0	0	0
115	1,8	30	2,63
160	2	2	27,13
230	1	50	29,53

Se detectó producción de DHB en la reacción A (presencia de todos los enzimas) pero no en las reacciones de control B y C (figura 5).

Ejemplo 9: optimización de la secuencia codificante de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* para su expresión en *E. coli*.

Se optimizó la secuencia codificante de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula* que incluía las mutaciones H39R y N43H para la expresión máxima en *E. coli* utilizando el software GeneOptimizer®. El gen sintético fue producido por GeneArt® Gene Synthesis (Invitrogen Life Technologie). Se introdujeron los sitios de restricción NheI y EcoRI cadena arriba del codón de inicio y cadena abajo del codón de parada, respectivamente, permitiendo la clonación directa en pET28a+ (Novagen).

Se aisló el plásmido pSSR-H39RN43H-opt resultante y se demostró mediante secuenciación del ADN que contenía el gen *SSR H39R N43H* de longitud completa de *M. sedula* que presentaba la secuencia correcta (SEC ID nº 228).

Ejemplo 10: construcción de un plásmido que facilita la expresión simultánea de la malato cinasa (mutante del gen *lysC* de *E. coli*), la malato semialdehído deshidrogenasa (mutante del gen *asd* de *E. coli*) y la DHB deshidrogenasa (mutante del gen de la semialdehído succínico reductasa de *M. sedula*) utilizando *E. coli* como organismo hospedador.

Se utilizó el plásmido pLYSC-E119G E250K (SEC ID nº 38) como esqueleto para la construcción del operón. Se obtuvo un fragmento de ADN que contenía el sitio de unión ribosómica (rbs) de pET28 (Novagen) y se obtuvo la región codificante de ASD-E241Q mediante PCR (polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes)) utilizando pASD-E241Q (SEC ID nº 55 como molde, y los cebadores directo e inverso TATAAGGATCCGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGG^{3'} (SEC ID nº 83) y 5'TATAAGAATTCTTACGCCAGTTGACGAAG^{3'} (SEC ID nº 84) que introdujeron un sitio de restricción *Bam*HI y uno *Eco*RI cadena arriba de rbs y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Se digirieron los productos de PCR con *Bam*HI y *Eco*RI, se ligaron en los sitios correspondientes del vector pLYSC-E119G E250K utilizando la ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformaron en células de *E. coli* DH5α. El plásmido pLYSC-E119G-E250K_ASD-E241Q resultante se aisló y demostró mediante secuenciación de ADN que contenía la secuencia correcta.

Se obtuvo un fragmento de ADN que contenía el sitio de unión ribosómica (rbs) de pET28 y se obtuvo la región codificante de Ms-SSR-H39RN43H-opt de codones optimizados mediante PCR utilizando pSSR-H39RN43H-opt como molde, y los cebadores directo e inverso 5'TATAAGCGCCGCGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT^{3'} (SEC ID nº 85) y 5'TATAAACTCGAGCTTACGGAATAATCAGG^{3'} (SEC ID nº 86) que introdujeron un sitio de restricción *Not*I y uno *Psp*XI cadena arriba de rbs y cadena abajo del codón de parada, respectivamente. Se digirieron los productos de PCR con *Not*I y *Psp*XI, se ligaron en los sitios correspondientes del vector pLYSC-E119G-E250K_ASD-E241Q utilizando la ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformaron en células de *E. coli* DH5α. Se aisló el plásmido pET28-DHB resultante (SEC ID nº 229) y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía la secuencia correcta.

La región promotora cadena arriba 5' que regula simultáneamente la expresión de los tres genes (es decir, el promotor de T7 en pET28-DHB) puede sustituirse por cualquier otro promotor, inducible o constitutivo, mediante la digestión con pET28-DHB con *Sph*I y *Xba*I, y clonando otra región promotora son sitios de restricción adecuados. A título de ejemplo de la utilización de un promotor inducible, se sustituyó el promotor de T7 del esqueleto pET28-DHB por el promotor *tac*, las características del cual permiten la expresión de las proteínas en

presencia de glucosa (de Boer *et al.*, 1983). Se obtuvo el promotor *tac* a partir del plásmido pEXT20 (Dykxhoorn *et al.*, 1996) mediante la digestión del plásmido con *SphI* y *XbaI*. Se purificó el fragmento de ADN que contenía el promotor y se clonó en el plásmido pET28-DHB digerido con *SphI/XbaI*. Se aisló el plásmido pTAC-DHB resultante y se demostró mediante secuenciación de ADN que contenía la secuencia correcta.

5

Tabla 11: Lista de plásmidos construidos en el presente estudio

Plásmido	Regulación	Características
pET28-DHB	T7	<i>lysC-E119G-E250K, asd-E241Q, Ms_SSR-H39R-N43H</i> de codones optimizados
pTAC-DHB	<i>tac</i>	<i>lysC-E119G-E250K, asd-E241Q, Ms_SSR-H39R-N43H</i> de codones optimizados

Ejemplo 11: construcción de cepas de *E. coli* para optimizar la redistribución del flujo de carbono y el suministro de cofactor NADPH para la producción fermentativa de DHB

10

Se interrumpieron (“disrupted”) varios genes en *E. coli* cepa MG1655 con el fin de optimizar la redistribución del flujo de carbono y el suministro de cofactor para la producción de DHB. Se llevaron a cabo eliminaciones génicas utilizando el procedimiento de recombinasa red de fago lambda según Datsenko *et al.* (Datsenko y Wanner, 2000).

15

Se prepararon casetes de eliminación mediante PCR utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (Finnzymes) y el gen de resistencia a canamicina (*kan*) flanqueado por FRT del plásmido pKD4 a modo de molde (Datsenko y Wanner, 2000). Los cebadores de sentido contenían secuencias correspondientes al extremo 5' de cada gen diana (subrayado) seguido de 20 pb correspondientes al casete FRT-*kan*-FRT de pKD4. Los cebadores antisentido contenían secuencias correspondientes a la región de extremo 3' de cada gen diana (subrayado) seguido de 20 pb correspondientes al casete. Se indican los cebadores en la Tabla 12. Se digirieron los productos de PCR con *DpnI* y se purificaron antes de la transformación.

20

La cepa *E. coli* MG1655 se convirtió en electrocompetentes mediante el cultivo de las células hasta una DO₆₀₀ de 0,6 en medio líquido LB a 37°C, concentrando las células 100 veces y lavándolas dos veces con glicerol al 10% helado. Las células se transformaron con el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000) mediante electroporación (2,5 kV, 200 Ω, 25 μF, en cubetas de 2 mm). Se seleccionaron los transformantes a 30°C sobre medio sólido LB con ampicilina (100 μg/ml).

25

Los casetes de interrupción se transformaron en cepas de *E. coli* electrocompetentes que alojaban el plásmido pKD46 expresante de recombinasa Red de fago lambda. Se cultivaron las células a 30°C en medio SOB líquido que contenía ampicilina (100 μg/ml). Se indujo el sistema recombinasa red de lambda mediante la adición de arabinosa 10 mM al alcanzar la DO₆₀₀ de los cultivos un valor de 0,1. Las células se cultivaron adicionalmente hasta una DO₆₀₀ de 0,6 antes de recolectarlas mediante centrifugación, se lavaron dos veces con glicerol al 10% helado y se transformaron con el casete de interrupción mediante electroporación. Tras una expresión fenotípica durante la noche a 30°C en medio LB líquido, las células se sembraron en placa sobre medio LB sólido que contenía 25 μg/ml de canamicina. Se seleccionaron los transformantes tras el cultivo a 30°C.

30

Se verificó la sustitución génica mediante PCR de las colonias utilizando polimerasa Crimson Taq (NEB). Se llevó a cabo una primera reacción con los cebadores específicos de locus flanqueantes (ver las tablas 13) con el fin de verificar la pérdida simultánea del fragmento parental y la ganancia del nuevo fragmento específico de mutante. Se llevaron a cabo dos reacciones adicionales mediante la utilización de los cebadores próximos específicos de locus con el cebador de ensayo común respectivo *k1rev* o *k2for* (ver la Tabla 13) dentro del casete de resistencia a canamicina FRT (cebador de locus de sentido/*k1 rev* y *k2for*/cebador de locus inverso).

35

A continuación se extrajo el gen de resistencia (FRT-*kan*-FRT) del cromosoma utilizando el plásmido que alojaba la recombinasa FLP, pCP20 (Cherepanov y Wackernagel, 1995) dejando una región *scar* que contenía un sitio FRT. pCP20 es un plásmido ampicilina y *CmR* que muestra la replicación sensible a la temperatura y la inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP. Se transformaron mutantes resistentes a canamicina con pCP20 y los transformantes resistentes a la ampicilina se seleccionaron a 30°C. A continuación, se cultivaron los transformantes sobre medio LB sólido a 37°C y se sometieron a ensayo para la pérdida de todas las resistencias a antibióticos. La extracción del casete FRT-canamicina se analizó mediante PCR de colonias utilizando la polimerasa Crimson taq y los cebadores específicos de locus flanqueantes (Tabla 13). Se obtuvieron múltiples eliminaciones mediante la repetición de las etapas anteriormente indicadas.

40

Se convirtieron las cepas portadoras de una eliminación individual o eliminaciones múltiples en electrocompetentes tal como se ha indicado anteriormente, se transformaron con el plásmido pTAC-DHB, que permite la expresión inducible por IPTG de los enzimas de la ruta del DHB (ver el Ejemplo 10) y se seleccionaron sobre medio LB sólido que contenía 50 μg/ml de canamicina.

45

Se construyó el plásmido pACT3-*pck* que alojaba el gen *pck* codificante de la PEP carboxiquinasa de *E. coli* mediante la amplificación de la secuencia codificante *pck* utilizando el ADN genómico de *E. coli* MG1655 como

molde y los cebadores directo e inverso, respectivamente, ⁵TATAATCCCGGGATGCGCGTTAACAATGGTTTGACC³ (SEC ID n° 100) y ⁵TATAATCTAGATTACAGTTTCGGACCAGCCG³ (SEC ID n° 101). Se digirió el fragmento de ADN con *Xma*I y *Xba*I, se ligó en los sitios correspondientes del vector de expresión pACT3 (Dykhhoorn *et al.*, 1996) utilizando la ADN ligasa de T4 (Biolabs) y se transformó en células de *E. coli* DH5α. Se seleccionaron los transformantes sobre medio LB sólido que contenía cloranfenicol (25 µg/ml). Se aisló el plásmido resultante y se verificó la inserción correcta del gen *pck* mediante secuenciación. Se construyeron análogamente los plásmidos pACT3-*aceA*, pACT3-*ppc*, pACT3-*galP*, pACT3-*pykA* y pACT3-*pyc* que alojaban, respectivamente, *aceA*, *ppc*, *galP*, o *pykA* (todos de *E. coli*) o *pycA* de *Lactococcus lactis*, utilizando los cebadores listados en la Tabla 14.

Los plásmidos derivados de pACT3 anteriormente indicados y el plásmido pTAC-DHB se transformaron en *E. coli* MG1655 mutantes que portaban combinaciones de las eliminaciones presentadas en la tabla 12. Se seleccionaron los transformantes que contenían ambos plásmidos sobre medio LB sólido que contenía cloranfenicol (25 µg/ml) y canamicina (50 µg/ml). En la tabla 15 se listan ejemplos de las cepas construidas.

Tabla 12: cebadores utilizados para las disrupciones génicas. Las secuencias homólogas de los genes diana se encuentran subrayados.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>ldhA</i>	<i>Δ_ldhA_for</i>	<u>Gaaggttqcgccctactaagcatagttgtgatgagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 102)
	<i>Δ_ldhA_rev</i>	<u>Ttaaaccagttcgttcgggcaggttcgcttttcctggaattagccatggtcc</u> (SEC ID n° 103)
<i>adhE</i>	<i>Δ_adhE_for</i>	<u>Atggctgttactaatgtcgtgtaacttaacgcactcgtagagcgtgtgttaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 104)
	<i>Δ_adhE_rev</i>	<u>Ttaagcggatttttcgcttttttcagcttttagccggaggagccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 105)
<i>ackA</i>	<i>Δ_ackA_for</i>	<u>atgtcagtaagtttagtactggttctgaactcgcgtagtcttcagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 106)
	<i>Δ_ackA_rev</i>	<u>tcaggcagtcaggcggctcgcgctctcgcgcgataaccagttcttccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 107)
<i>focA-pflB</i>	<i>Δ_focA-pflB_for</i>	<u>ttactcgtatttgcataaaaaccatgcgagttacgggcctataagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 108)
	<i>Δ_focA-pflB_rev</i>	<u>atagattgagtggaaggtagcagtaataacgtcctgctgcttctcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 109)
<i>pta</i>	<i>Δ_pta_for</i>	<u>gtgtcccgtattattatgctgacccctaccggaaccagcgtcgggtgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 110)
	<i>Δ_pta_rev</i>	<u>ttactgctgctgacagactgaatcgagtcagcgcgtaggtgacatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 111)
<i>poxB</i>	<i>Δ_poxB_for</i>	<u>atgaaacaaacggttgcagcttatatcgcaaaacactcgaatcggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 112)
	<i>Δ_poxB_rev</i>	<u>ttaccttagccactttgttttcgcccagttcagatcactcatcaccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 113)
<i>sad</i>	<i>Δ_sad_for</i>	<u>atgaccattactccggcaactcatgcaatttcgataaatcctgccgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 114)
	<i>Δ_sad_rev</i>	<u>tcagatccggtctttccaccgcctggtatattacagaattcgtgcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 115)
<i>gabD</i>	<i>Δ_gabD_for</i>	<u>atgaaacttaacgacagtaacttattccgccagcagcgttgattgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 116)
	<i>Δ_gabD_rev</i>	<u>ttaaagaccgatgcacatattttgatttcaagtaattcctgcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 117)
<i>gadA</i>	<i>Δ_gadA_for</i>	<u>atgqaccagaagctgttaacggatttccgctcagaactactcagatgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 118)
	<i>Δ_gadA_rev</i>	<u>tcaggtgtgttaagctgttctgctgggcaataccctgcagtttcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 119)
<i>gadB</i>	<i>Δ_gadB_for</i>	<u>atggataagaagcaagtaacggatttaaggtcggaaactactcagatgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 120)
	<i>Δ_gadB_rev</i>	<u>tcaggtatgtttaaagctgttctgtgggcaataccctgcagtttcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 121)
<i>gadC</i>	<i>Δ_gadC_for</i>	<u>atggctacatcagtcagacaggtaaagctaaagcagctcacattagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 122)
	<i>Δ_gadC_rev</i>	<u>ttagtgttctgtcattcatcacaatatagtggtggaacgtgccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 123)
<i>sfcA</i>	<i>Δ_sfcA_for</i>	<u>atggaacccaaaaacaaaaaacagcgttcgctttatcccttactgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 124)
	<i>Δ_sfcA_rev</i>	<u>ttagatggaggtacggcggtagtcgcggtattcggcttccagaaacatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 125)
<i>maeB</i>	<i>Δ_maeB_for</i>	<u>atggatgaccagttaaacaaagtcacttgatttccatgaattgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 126)
	<i>Δ_maeB_rev</i>	<u>ttacagcgttgggtttgcgcttctaccacggcagcgcaccatcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 127)
<i>ppc</i>	<i>Δ_ppc_for</i>	<u>atgaacgaacaatattccgcttgcgtagtaattgctcagtagtctcgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 128)
	<i>Δ_ppc_rev</i>	<u>ttagccggtattacgcatacctcgcgaatccggcgaatagtgaccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 129)
<i>pykA</i>	<i>Δ_pykA_for</i>	<u>atgccagaaggtcgcgagaacaaaatcgttaccacgttaggcggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 130)
	<i>Δ_pykA_rev</i>	<u>ttactctaccgtttaaatacgcggtgattagtagaaccacggtcatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 131)
<i>pykF</i>	<i>Δ_pykF_for</i>	<u>atgaaaaagaccaaaattgtttgcaccatcggaccgaaaaccgaagtgttaggctggagctgcttc</u> (SEC ID No.132)
	<i>Δ_pykF_rev</i>	<u>ttacaggacgtgaacagatcgggtgttagtagtgcgctcggtagccatagaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 133)

<i>mgsA</i>	Δ _mgsA_for Δ _mgsA_rev	<u>atggaactgacgactcgactttacctgcgcggaacatattcggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 134) <u>ttacttcagacgggtccgcgagataacgctgataatcgggatcagcatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 135)
<i>iclR</i>	Δ _iclR_for	<u>atggctgcacccattcccgcgaaacgcggcagaaaacccqccgttggttaggctggagctgcttc</u> (SEC ID No.136)
<i>icd</i>	Δ _iclR_rev Δ _icd_for	<u>tcagcgcattccaccgtacgccagcgtcacttccttcgcccgtttcatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID No.137) <u>atggaaagtaaagtagttgttccggcacaaggcaagaagatcaccgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID No.138)
<i>sucA</i>	Δ _icd_rev Δ _sucA_for	<u>ttacatgttttcgatgatcgctcaccacaaactcgaacatttcagcatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 139) <u>atgcagaacagcgccttgaagcctggttgactcttcttaccctggttaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 140)
<i>sucB</i>	Δ _sucA_rev Δ _sucB_for	<u>ttattcgacgttcagcgcgtcatttaaccagatctgttgcgtttinatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 141)
<i>frdA</i>	Δ _sucB_rev Δ _frdA_for	<u>atgagtagcgtagatattctggtcctgacctgcctgaatccgtagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 142) <u>ctacacgtccagcagcagcgcgtcgatcttccagcaactctttcatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 143)
<i>frdB</i>	Δ _frdA_rev Δ _frdB_for	<u>gtgcaaaccttcaagccgatcttgcattgttaggcgcgggtggcgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 144) <u>tcagccattcgccttctccttcttattggctgcttccgccttatccatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 145)
<i>frdC</i>	Δ _frdB_rev Δ _frdC_for	<u>atggctgagatgaaaaactgaaaattgaggtggtgcgtataacgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 146) <u>ttagcgtggttcagggtcgcgataagaaagtcttccgaacttccatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 147)
<i>frdD</i>	Δ _frdC_rev Δ _frdD_for	<u>atgacgactaaacgtaaacctgatgtacggccaatgacgtccaccgtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 148) <u>ttaccagtacagggcaacaacaggattaccgatggtggcaaccacatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 149)
<i>ptsG</i>	Δ _frdD_rev Δ _ptsG_for	<u>atgattaatccaaatccaaagcgttctgacgaaccggtattctggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 150) <u>ttagattgtaacgacaccaatcagcgtgacaactgtcaggatagccatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 151)
<i>ptsI</i>	Δ _ptsG_rev Δ _ptsI_for	<u>atgtttaagaatgcatttgcctaacctgcaaaaggcgtgaaatcggtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 152) <u>ttagtgtaccgatgtactcatccatcctcgttttcagggttatccatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 153)
	Δ _ptsI_rev	<u>atgatttcaggcattttagcatccccgggtatcgttccggttaaagtgtaggctggagctgcttc</u> (SEC ID n° 154) <u>ttagcagattgtttttctcaatgaactgttaaccagcgtcatcatatgaatatcctccttag</u> (SEC ID n° 155)

Tabla 13: parejas de cebadores utilizados para la verificación de las disrupciones génicas.

Gen eliminado	Secuencia (5' - 3')	
	Cebador directo	Cebador inverso
<i>K2 for / k1 rev</i>	cggtgccctgaaatgaactgc (SEC ID n° 156)	cagtcgatagccgaatagcct (SEC ID n° 157)
<i>ldhA</i>	atacgtgtcccagcggtag (SEC ID n° 158)	tacacatcccgccatcagca (SEC ID n° 159)
<i>adhE</i>	gaagtaaacgggaaatcaa (SEC ID n° 160)	agaagtggcataagaaaacg (SEC ID n° 161)
<i>ackA</i>	ccattggctgaaaattacgc (SEC ID n° 162)	gttcattgcacggatcacg (SEC ID n° 163)
<i>facA_pflB</i>	atgccgtagaagccgccagt (SEC ID n° 164)	ttgttggtgcgcagctcgaag (SEC ID n° 165)
<i>pta</i>	gcaaatctggttcatcaac (SEC ID n° 166)	tccctgcaaaaacaaagt (SEC ID n° 167)
<i>poxB</i>	ggattggttctgcataat (SEC ID n° 168)	agcattaacggtagggtcgt (SEC ID n° 169)
<i>sad</i>	gctgattctcgcgaataaac (SEC ID n° 170)	aaaaacgttcttgcgcgtct (SEC ID n° 171)
<i>gabD</i>	tctggtgtcaccacccgc (SEC ID n° 172)	aagccagcacctggaagcag (SEC ID n° 173)
<i>gadA</i>	aagagctgccgagaggat (SEC ID n° 174)	gccgcctctaagtcaaat (SEC ID n° 175)
<i>gadB</i>	ggatttagcaatattcgt (SEC ID n° 176)	cctaatagcaggaagaagac (SEC ID n° 177)
<i>gadC</i>	gctgaactgttgctggaaga (SEC ID n° 178)	ggcgtgctttacaactaca (SEC ID n° 179)
<i>sfcA</i>	tagtaaataaccaaccggc (SEC ID n° 180)	tcagtgagcgcaggtttta (SEC ID n° 181)
<i>maeB</i>	attaatggtgagagtttga (SEC ID n° 182)	tgcttttttattattcgc (SEC ID n° 183)
<i>ppc</i>	gctttataaaagacgacgaa (SEC ID n° 184)	gtaacgacaattcctaagg (SEC ID n° 185)
<i>pykA</i>	tttatatgccatggttct (SEC ID n° 186)	atctgttagagcggatgat (SEC ID n° 187)
<i>pykF</i>	ctggaacgttaaatcttga (SEC ID n° 188)	ccagtttagtagctttcatt (SEC ID n° 189)
<i>iclR</i>	gattgttcaacattaactcatcg (SEC ID n° 190)	tcgattaacagacaccctt (SEC ID n° 191)
<i>mgsA</i>	tctcaggtgctcacagaaca (SEC ID n° 192)	tatggaagagggcgtactgc (SEC ID n° 193)
<i>icd</i>	cgacctgtgcataaacacc (SEC ID n° 194)	tgaacgctaaggtgattgca (SEC ID n° 195)
<i>sucA</i>	acgtagacaagagctcga (SEC ID n° 196)	catcacgtacgactgcgtcg (SEC ID n° 197)
<i>sucB</i>	tgcaactttgtgctgagcaa (SEC ID n° 198)	tatcgttcccggcattgtc (SEC ID n° 199)
<i>frdA</i>	aaatcgatctgcaaatcagac (SEC ID n° 200)	aggaaccacaaatcgccata (SEC ID n° 201)
<i>frdB</i>	gacgtgaagattactacgt (SEC ID n° 202)	agttcaatgtgaaccacac (SEC ID n° 203)
<i>frdC</i>	tagccgaccacggtaagaaggag (SEC ID n° 204)	cagcgcacacccggaaaca (SEC ID n° 205)
<i>frdD</i>	atcgtgatcattaacctgat (SEC ID n° 206)	ttaccctgataaattaccgc (SEC ID n° 207)

<i>ptsG</i>	ccatccggtgaatgagtttt (SEC ID nº 208)	tggtgtaactggcaaaatc (SEC ID nº 209)
<i>ptsI</i>	gtgactccaacggcaaaag (SEC ID nº 210)	ccgttggttgatagcaata (SEC ID nº 211)

Tabla 14: cebadores utilizados para la sobreexpresión de genes. Los sitios de restricción utilizados para la clonación en pACT3 se encuentran subrayados.

Gen	Cebador	Conector	Secuencia
<i>Ec_pck</i>	<i>Ec_pck_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgcgcgtaacaatggttgacc (SEC ID nº 212)
	<i>Ec_pck_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattacagtttcggaccagccg (SEC ID nº 213)
<i>Ec_ppc</i>	<i>Ec_ppc_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgaacgaacaatattcc (SEC ID nº 214)
	<i>Ec_ppc_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattagccgttattacgcat
<i>Ec_pykA</i>	<i>Ec_pykA_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgccagaaggcttcgcagaaca (SEC ID nº 216)
	<i>Ec_pykA_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattactctaccgttaaatac (SEC ID nº 217)
<i>Ec_aceA</i>	<i>Ec_aceA_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgaaaaccggtacacaacaatt (SEC ID nº 218)
	<i>Ec_aceA_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattagaactgctgattcttcag (SEC ID nº 219)
<i>Ll_pycA</i>	<i>Ll_pycA_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgaaaaactactcgtcgccaat (SEC No.220)
	<i>Ll_pycA_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattaattaatttcgattaaca (SEC ID nº 221)
<i>Ec_galP</i>	<i>Ec_galP_clon_for</i>	<i>XmaI</i>	tataatcccgggatgctgacgctaaaaacagggcggt (SEC ID nº 222)
	<i>Ec_galP_clon_rev</i>	<i>XbaI</i>	tataattctagattaatcgtgagcgcctatttc (SEC ID nº 223)

5

Tabla 15: ejemplos de cepas construidas para la producción de DHB

Cepa	Genotipo relevante
MG1655	Tipo salvaje
ECE1	pTAC-DHB
ECE5	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack pTAC-DHB
ECE6	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack pTAC-DHB pACT3-pck
ECE7	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack pTAC-DHB pACT3-ppc
ECE8	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack pTAC-DHB pACT3-pyc
ECE10	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB pTAC-DHB
ECE11	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB pTAC-DHB pACT3-pck
ECE12	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB pTAC-DHB pACT3-ppc
ECE13	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB pTAC-DHB pACT3-pyc
ECE16	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA pTAC-DHB pACT3-pck
ECE17	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA pTAC-DHB pACT3-ppc
ECE18	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA pTAC-DHB pACT3-pyc
ECE21	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC pTAC-DHB pACT3-pck
ECE22	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC pTAC-DHB pACT3-ppc
ECE23	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC pTAC-DHB pACT3-pyc
ECE30	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC Δ ptsG pTAC-DHB pACT3-pck
ECE31	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC Δ ptsG pTAC-DHB pACT3-ppc
ECE32	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ mae1 Δ sfcA Δ frdBC Δ ptsG pTAC-DHB pACT3-pyc

Ejemplo 12: producción de ácido 2,4-dihidroxi-butírico mediante fermentación de la glucosa

10

Cepas y condiciones de cultivo: se llevaron a cabo experimentos con la cepa E. coli ECE1 coexpresante de malato cinasa, malato semialdehído deshidrogenasa y DHB deshidrogenasa a partir del plásmido pTAC-DHB (ver el Ejemplo 11) y una cepa de control isogénica que contenía únicamente el plásmido vacío (es decir, el esqueleto de pTAC sin las secuencias codificantes de los enzimas anteriormente indicados). 1 litro de medio de cultivo contenía 20 g de glucosa, 18 g de Na₂HPO₄ * 12 H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 2 g de NH₄Cl, 0,5 g de MgSO₄ * 7 H₂O, 0,015 g de CaCl₂ * 2 H₂O, 1 ml de 0,06 moles/l de solución madre de FeCl₃ preparada en solución de HCl concentrado diluido 100 veces, 2 ml de solución madre de HCl de tiamina 10 mM, 20 g de MOPS, 50 µg de sulfato de canamicina y 1 ml de solución de elementos traza (que contenían por cada litro: 0,04 g de Na₂EDTA * 2H₂O, 0,18 g de CoCl₂ * 6 H₂O, ZnSO₄ * 7 H₂O, 0,04 g de Na₂MoO₄ * 2 H₂O, 0,01 g de H₃BO₃, 0,12 g de MnSO₄ * H₂O, 0,12 g de CuCl₂ * H₂O). El pH se ajustó a 7 y el medio se filtró a esterilidad. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37°C en un agitador giratorio Infors operando a 170 rpm. Los cultivos de durante la noche (3 ml de medio en probeta) se inocularon a partir de cultivos en reserva en glicerol y se utilizaron para ajustar la DO₆₀₀ inicial a 0,05 en cultivos de 100 ml cultivados en matraces de agitación de 500 ml. Se añadió IPTG a una concentración de 1 mmol/l al alcanzar la DO₆₀₀ en los cultivos un valor de 0,2.

25

Estimación de la concentración de DHB mediante análisis de CL-EM/EM:

Se separó el medio de cultivo de las células mediante centrifugación (Beckmann-Coulter Allegra 21R, Rotor Beckmann S4180, 10 min., 4.800 rpm). El sobrenadante clarificado se almacenó a -20°C hasta los análisis

posteriores. Se cuantificó el contenido de DHB utilizando una HPLC (Waters) dotada de una columna ACQUITY UPLC BEH (C18, 1,7 µm, 100x2,1 mm, Waters) acoplada a un detector sensible a la masa (TQ, Waters, modo IEP, voltaje capilar: 2,5 kV, voltaje del cono: 25 V, voltaje del extractor: 3V, temperatura de la fuente: 150°C, temperatura de solvatación: 450°C, flujo de gas del cono: 50 l/h, flujo de gas de solvatación: 750 L/h). Se mantuvo la temperatura de la columna a 30°C. La fase móvil era una mezcla de 88% de una solución al 0,08% de hidróxido de tetra-n-butil-amonio y acetonitrilo al 12%. Se fijó el caudal a 0,4 ml/min. El volumen de inyección de las muestras era de 5 µl.

Resultados:

Se estimó el contenido de DHB del medio de cultivo de la cepa *E. coli* ECE1 y de la cepa de control a las 8 y a las 24 h tras inducir la expresión de malato cinasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa y DHB deshidrogenasa mediante la adición de IPTG. Tal como puede observarse en la Tabla 16, la cepa ECE1, que expresaba los enzimas de la ruta de DHB, produjo cantidades significativamente más elevadas de DBH que la cepa de control, demostrando la posibilidad de la producción zimófica de DHB mediante la ruta metabólica mostrada en la figura 1 (i).

Tabla 16: concentración de DHB en el medio de cultivo de *E. coli* ECE1 y de la cepa de control.

Tiempo [h]	Concentración de DHB [mg/l]	
	ECE1	Control
8	0,80	0
24	2,53	0,24

Referencias

Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T. & Iefuji, H. (2000). Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 980-984.

Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675.

Camarasa, C., Bidard, F., Bony, M., Barre, P. & Dequin, S. (2001). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4144-4151.

Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.

Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.

Deck, P., Exner, K. & Buschhaus, B. (2008). Method for the production of D,L-hydroxy-4-alkylthio butyric acid. Edited by B. AG.

Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. & Linn, T. (1996). A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene* 177, 133-136.

Ford, G. & Ellis, E. M. (2002). Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast* 19, 1087-1096.

Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E. & Van Vuuren, H. J. (1995). The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast* 11, 1485-1491.

Groeneveld, M., Weme, R. G., Duurkens, R. H. & Slotboom, D. J. (2010). Biochemical characterization of the C4-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192, 2900-2907.

James, C. L. & Viola, R. E. (2002). Production and characterization of bifunctional enzymes. Domain swapping to produce new bifunctional enzymes in the aspartate pathway. *Biochemistry* 41, 3720-3725.

Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2008a). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng* 99, 1140-1153.

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A. & Ingram, L. O. (2008b). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng* 101, 881-893.

- Keng, Y. F. & Viola, R. E. (1996). Specificity of aspartokinase III from *Escherichia coli* and an examination of important catalytic residues. *Arch Biochem Biophys* 335, 73-81.
- 5 Kockelkorn, D. & Fuchs, G. (2009). Malonic semialdehyde reductase, succinic semialdehyde reductase, and succinyl-coenzyme A reductase from *Metallosphaera sedula*: enzymes of the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in Sulfolobales. *J Bacteriol* 191, 6352-6362.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. & other authors (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- 10 Lin, H., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2005). Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng* 7, 116-127.
- 15 Marco-Marin, C., Ramon-Maiques, S., Tavarez, S. & Rubio, V. (2003). Site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* acetylglutamate kinase and aspartokinase III probes the catalytic and substrate-binding mechanisms of these amino acid kinase family enzymes and allows three-dimensional modelling of aspartokinase. *J Mol Biol* 334, 459-476.
- 20 Millard, C. S., Chao, Y. P., Liao, J. C. & Donnelly, M. I. (1996). Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62, 1808-1810.
- Roberts, S. J., Morris, J. C., Dobson, R. C. & Gerrard, J. A. (2003). The preparation of (S)-aspartate semi-aldehyde appropriate for use in biochemical studies. *Bioorg Med Chem Lett* 13, 265-267.
- 25 Rognstad, R. & Katz, J. (1979). Effects of 2,4-dihydroxybutyrate on lipogenesis in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254, 11969-11972.
- Sanchez, A. M., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2005a). Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng* 7, 229-239.
- 30 Sanchez, A. M., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2005b). Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol Prog* 21, 358-365.
- 35 Sauer, U. & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 765-794.
- Shinka, T., Inoue, Y., Ohse, M., Ito, A., Ohfu, M., Hirose, S. & Kuhara, T. (2002). Rapid and sensitive detection of urinary 4-hydroxybutyric acid and its related compounds by gas chromatography-mass spectrometry in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 776, 57-63.
- 40 Wang, Q., Ou, M. S., Kim, Y., Ingram, L. O. & Shanmugam, K. T. (2010). Metabolic flux control at the pyruvate node in an anaerobic *Escherichia coli* strain with an active pyruvate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 76, 2107-2114.
- Werpy, T. & Petersen, G. (2004). Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Washington, DC: <http://dx.doi.org/10.2172/15008859>.
- 50 Zelle, R. M., de Hulster, E., van Winden, W. A. & other authors (2008). Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl Environ Microbiol* 74, 2766-2777.
- 55 Zelle, R. M., Trueheart, J., Harrison, J. C., Pronk, J. T. & van Maris, A. J. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 76, 5383-5389.
- Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2009). Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20180-20185.
- 60 Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2011). L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 77, 427-434.
- 65

ES 2 631 554 T3

Listado de secuencias

<110> ADISSEO France SAS

5 <120> Un procedimiento de producción de ácido 2,4-dihidroxitúrico

<130> BR073152

<150> PCT/IB2010/003153

10 <151> 2010-10-28

<150> PCT/IB2011/001559

<151> 2011-05-23

15 <160> 231

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador para la amplificación

<400> 1

cacgaggtac atatgtctga aattgtgtc tcc 33

<210> 2

30 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador para la amplificación

<400> 2

40 ctccagggg atccagtatt tactcaaac 29

<210> 3

<211> 1350

<212> ADN

<213> Escherichia coli

45 <400> 3

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60

aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120

tctgctggta tcaactatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180

ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240

ccgaacgta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300

gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg 360

atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaaacgc atgttcaggc acagtggttt 420

gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480

gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540

acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600

ES 2 631 554 T3

agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgctgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttgga aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttggtat 1260
ggcgcaccca gccataacct gtgcttctcg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 4
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 4

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

10

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

5 <210> 5
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 5
 tataatgcta gcatgccaat ggattccaa cc 32

15 <210> 6
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 6
 tataatgaat tcttaaattc caagtctttt caattgttc 39

25 <210> 7
 <211> 1584
 <212> ADN
 <213> Saccharomyces cerevisiae

30 <400> 7

atgccaatgg atttccaacc tacatcaagt cattcgaact gggtcgtgca aaagttcggt 60
 ggtacatctg tccggtaaatt tcccgtccaa atagtggatg acattgtgaa gcaactattct 120
 aaacctgacg gcccaaaca taatgtcgct gtcgtttggt ccgcccgttc ttcatacacc 180
 aaggctgaag gtaccacttc tcgtcttttg aaatgttgtg atttggcttc gcaagaatct 240
 gaatttcaag acattatcga agttatcaga caagaccata tcgataatgc cgaccgcttc 300
 attctcaatc ctgccttgca agccaagtta gtggatgata ccaataaaga acttgaactg 360
 gtcaagaaat atttaaattc tcaaaagtt ttgggtgaag tgagttcacg tacagtagat 420
 ctggtgatgt catgtggtga gaagttgagt tgtttgttca tgactgcttt atgtaatgac 480
 cgtggctgta aggccaaata tgtggatttg agccacattg ttcctctga tttcagtgcc 540
 agcgctttgg ataacagttt ctacactttc ctggttcaag cattgaaaga aaaattggcc 600
 ccctttgtaa gtgctaaaga gcgtatcgtt ccagtcttta cagggttttt tggtttagtt 660
 ccaactggtc ttctgaatgg tgttggctgt ggctataccg atttatgtgc cgctttgata 720

ES 2 631 554 T3

gcagttgctg taaatgctga tgaactacaa gtttgggaagg aagttgatgg tatatttact 780
 gctgatcctc gtaagggtcc tgaagcacgt ttgctagaca gtgttactcc agaagaagct 840
 tctgaattaa catattatgg ttccgaagtt atacatcctt ttacgatgga acaagttatt 900
 agggctaaga ttctattag aatcaagaat gttcaaaatc cattaggtaa cggtagcatt 960
 atctaccag ataatgtagc aaagaagggt gaatctactc caccacatcc tcctgagaac 1020
 ttatcctcat ctttctatga aaagagaaag agaggtgcca ctgctatcac caccaaaaat 1080
 gacattttcg tcatcaacat tcattccaat aagaaaacc tatcccatgg tttcctagct 1140
 caaatattta ccatcctgga taagtacaag ttagtcgtag atttaatatc tactttctgaa 1200
 gttcatgttt cgatggcttt gccattcca gatgcagact cattaaaatc tctgagacaa 1260
 gctgaggaaa aattgagaat ttaggttct gttgatatca caaagaagtt gtctattgtt 1320
 tcattagttg gtaaacadat gaaacaatac atcggcattg ctggtacat gtttactact 1380
 cttgctgaag aaggcatcaa cattgaaatg atttctcaag gggcaaatga aataaacata 1440
 tcctgcgta tcaatgaatc tgactccata aaagcgctac aatgtattca tgccaagtta 1500
 ctaagtgagc ggacaaatac ttcaaaccaa tttgaacatg ccattgatga acgtttagaa 1560
 caattgaaaa gacttggaaat ttaa 1584

<210> 8

<211> 527

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

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

10

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Val His Val Ser Met Ala Leu Pro Ile Pro Asp Ala Asp Ser Leu Lys
 405 410 415

Ser Leu Arg Gln Ala Glu Glu Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ser Val Asp
 420 425 430

Ile Thr Lys Lys Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Gly Lys His Met Lys
 435 440 445

Gln Tyr Ile Gly Ile Ala Gly Thr Met Phe Thr Thr Leu Ala Glu Glu
 450 455 460

Gly Ile Asn Ile Glu Met Ile Ser Gln Gly Ala Asn Glu Ile Asn Ile
 465 470 475 480

Ser Cys Val Ile Asn Glu Ser Asp Ser Ile Lys Ala Leu Gln Cys Ile
 485 490 495

His Ala Lys Leu Leu Ser Glu Arg Thr Asn Thr Ser Asn Gln Phe Glu
 500 505 510

His Ala Ile Asp Glu Arg Leu Glu Gln Leu Lys Arg Leu Gly Ile
 515 520 525

<210> 9
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (119)..(119)
 <223> X es cualquier aminoácido excepto E

<400> 9

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30

Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45

Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60

Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80

15 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr

ES 2 631 554 T3

					85						90						95			
Val	Leu	Ala	Glu 100	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala 105	Thr	Ser	Pro	Ala	Leu 110	Thr	Asp					
Glu	Leu	Val 115	Ser	His	Gly	Xaa	Leu 120	Met	Ser	Thr	Leu	Leu 125	Phe	Val	Glu					
Ile	Leu 130	Arg	Glu	Arg	Asp	Val 135	Gln	Ala	Gln	Trp	Phe 140	Asp	Val	Arg	Lys					
Val 145	Met	Arg	Thr	Asn	Asp 150	Arg	Phe	Gly	Arg	Ala 155	Glu	Pro	Asp	Ile	Ala 160					
Ala	Leu	Ala	Glu	Leu 165	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu 170	Leu	Pro	Arg	Leu	Asn 175	Glu					
Gly	Leu	Val	Ile 180	Thr	Gln	Gly	Phe	Ile 185	Gly	Ser	Glu	Asn	Lys 190	Gly	Arg					
Thr	Thr	Thr 195	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly 200	Ser	Asp	Tyr	Thr	Ala 205	Ala	Leu	Leu					
Ala	Glu 210	Ala	Leu	His	Ala	Ser 215	Arg	Val	Asp	Ile	Trp 220	Thr	Asp	Val	Pro					
Gly 225	Ile	Tyr	Thr	Thr	Asp 230	Pro	Arg	Val	Val	Ser 235	Ala	Ala	Lys	Arg	Ile 240					
Asp	Glu	Ile	Ala	Phe 245	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu 250	Met	Ala	Thr	Phe	Gly 255	Ala					
Lys	Val	Leu	His 260	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu 265	Pro	Ala	Val	Arg	Ser 270	Asp	Ile					
Pro	Val	Phe 275	Val	Gly	Ser	Ser	Lys 280	Asp	Pro	Arg	Ala	Gly 285	Gly	Thr	Leu					
Val	Cys 290	Asn	Lys	Thr	Glu	Asn 295	Pro	Pro	Leu	Phe	Arg 300	Ala	Leu	Ala	Leu					
Arg 305	Arg	Asn	Gln	Thr	Leu 310	Leu	Thr	Leu	His	Ser 315	Leu	Asn	Met	Leu	His 320					
Ser	Arg	Gly	Phe	Leu 325	Ala	Glu	Val	Phe	Gly 330	Ile	Leu	Ala	Arg	His 335	Asn					
Ile	Ser	Val	Asp 340	Leu	Ile	Thr	Thr	Ser 345	Glu	Val	Ser	Val	Ala 350	Leu	Thr					
Leu	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Thr	Gln					

ES 2 631 554 T3

355	360	365													
Ser	Leu	Leu	Met	Glu	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Arg	Val	Glu	Val	Glu	Glu
	370					375					380				
Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Gly	Asn	Asp	Leu	Ser	Lys	Ala	Cys
385					390					395					400
Gly	Val	Gly	Lys	Glu	Val	Phe	Gly	Val	Leu	Glu	Pro	Phe	Asn	Ile	Arg
				405					410					415	
Met	Ile	Cys	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	His	Asn	Leu	Cys	Phe	Leu	Val	Pro
			420					425					430		
Gly	Glu	Asp	Ala	Glu	Gln	Val	Val	Gln	Lys	Leu	His	Ser	Asn	Leu	Phe
		435					440					445			

Glu

- <210> 10
- <211> 35
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Cebador para la amplificación

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (17)..(19)
- 15 <223> nnn codificante de cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural ,
excepto glutamina

- <400> 10
- gctggtcagc catgcnnc tgatgtgcac cctgc 35

- 20 <210> 11
- <211> 35
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 25 <220>
- <223> Cebador para la amplificación

- <220>
- <221> misc_feature
- 30 <222> (17)..(19)
- <223> nnn codificante de cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural ,
excepto glutamina

- <400> 11
- 35 gcagggtcga catcagnng ccatggctga ccagc 35

- <210> 12
- <211> 449
- <212> PRT
- 40 <213> Escherichia coli

- <400> 12

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 13
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 13

atgtctgaaa ttgttgctc caaatTTggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcaactaatct gctggctgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300

5

10

ES 2 631 554 T3

gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca tggctgtctg 360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
accagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcgcgggt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
ggcgatcca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 14
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 14

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
1 5 10 15
Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
20 25 30
Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
35 40 45
Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
50 55 60
Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
65 70 75 80
10 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
85 90 95

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

- <210> 15
- <211> 1350
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

5

<400> 15

```

atgtctgaaa ttgttgcttc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg      60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct      120
tctgctggta tcaactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga      180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac      240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa      300
gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcggcctg      360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaaacgc atgttcaggc acagtggttt      420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc      480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc      540
accaggggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc      600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg      660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt      720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat      780
ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa      840
gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaaactg aaaatccgcc gctgttccgc      900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcactttgc acagcctgaa tatgctgcat      960
tctcgcgggt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac     1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc     1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg     1140
    
```

10

ES 2 631 554 T3

gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttggca aagaggtatt cggcgactctg gaaccgttca acattcgcac gatttggtat 1260
 ggcgcatcca gccataacct gtgcttcctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 16
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 16

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110
 Glu Leu Val Ser His Gly Asn Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140
 Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190
 Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205

10

ES 2 631 554 T3

Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220

Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
 225 230 235 240

Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
 245 250 255

Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 17
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 17

ES 2 631 554 T3

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatTTggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
tctgctggta tctaatactt gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
gCGGCGGCGC tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcaatctg 360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgCGAACCGG atgttcaggc acagtggttt 420
gatgtacgta aagtgatgCG taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatataGCC 480
gCGctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
accCAGGGAT ttatcggtag cGAAAATAAA ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
ccggcaacgt tgctaccCGC agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccCAGCGC caggTggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcggggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcaact gtgtcgggtg 1140
gaggTggaag aaggTctggc gctggtcgCG ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttgGca aagaggTatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcatt gatttgttat 1260
ggcgcattcca gccataacct gtgcttctcgt gtgcccggcg aagatgccga gcaggTggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 18
5 <211> 449
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 18

10 Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
1 5 10 15
Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
20 25 30
Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
35 40 45

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

- <210> 19
- <211> 1350
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

<400> 19

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcccgcgtg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgccaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
 acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780

ES 2 631 554 T3

ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
ggcgcaccca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 20
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 20

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

10

ES 2 631 554 T3

Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
165 170 175

Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
180 185 190

Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
195 200 205

Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
210 215 220

Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
225 230 235 240

Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
245 250 255

Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
260 265 270

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
420 425 430

ES 2 631 554 T3

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

5 <210> 21
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 21

```

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg      60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct      120
tctgctggta tcaactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga      180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac      240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa      300
gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggccagctg      360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtggttt      420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc      480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc      540
accaggggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc      600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg      660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt      720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaa agtactgcat      780
ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa      840
gaccacgcg caggtgttac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgc gctgttccgc      900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcactttgc acagcctgaa tatgctgcat      960
tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac     1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc     1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgact gtgtcgggtg     1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc     1200
ggcgttgga aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcat gatttgttat     1260
ggcgcacca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg     1320
10 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa      1350
    
```

15 <210> 22
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 22

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 23
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 23

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcactaatct gctggtcgc ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggctcgcctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420

5

10

ES 2 631 554 T3

gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccacgcg cagtggttac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgtcгаа tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcaact gtgtcgggtg 1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
ggcgcaccca gccataacct gtgcttcctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 24
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 24

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

10

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 25
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 25

5
 10
 atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcactctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
 acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
 tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
 ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcatt gatttgttat 1260

ES 2 631 554 T3

ggcgcaccca gccataacct gtgcttcctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 26
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 26

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30

Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45

Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60

Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80

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

Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110

Glu Leu Val Ser His Gly Val Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125

Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140

Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175

Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190

Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205

Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220

10

Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
225 230 235 240

Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
245 250 255

Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
260 265 270

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
435 440 445

Glu

<210> 27

<211> 1350

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 27

ES 2 631 554 T3

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
tctgctggta tctaatact gctggctgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
gCGGCGGCGC tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca tggcgtgctg 360
atgtcgacc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
accagggat ttatcggtag cgaataaaa ggtcgtaca cgacgcttg ccgtggaggc 600
agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaa agtactgcat 780
ccggcaacgt tgctaccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcaacttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
tctcggggtt tcctcgcgga agtttccggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
ggcgttgga aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcat gatttgttat 1260
ggcgcattca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

5 <210> 28
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador para la amplificación

<400> 28
gcgttgccc aagcggcaaa gatggccact ttg 34

15 <210> 29
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador para la amplificación

<400> 29
caaaagtggc catctttgcc gcttcggcaa acgc 34

25 <210> 30
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación
 5 <400> 30
 ggtagatcta atccatgt cagaagtgg cgtgg 35
 <210> 31
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 15 <400> 31
 ccacgctcac ttctgacatg gtgattgat ctacc 35
 <210> 32
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 32
 ggtagatcta atcaccacgt tagaagtgg cgtggc 36
 30 <210> 33
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 33
 gccacgctca ctctaactg ggtgattaga tctacc 36
 40 <210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 34
 50 ggtagatcta atccatgt cagaagtgg cgtgg 35
 <210> 35
 <211> 35
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 60 <400> 35
 ccacgctcac ttctgacatg gtgattgat ctacc 35
 <210> 36
 <211> 36
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 631 554 T3

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

5 <400> 36
 gtcagaagtg agcgtggcat taattctaga taccac 36

<210> 37
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

15 <400> 37
 gtggatctca gaattaatgc cagctcact tctgac 36

<210> 38
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

20 <400> 38

25 atgtctgaaa ttgtttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcaactaatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcgggcg tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcggcctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cggaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
 acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcaaag atggccactt ttggtgcaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
 tctcggggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020

ES 2 631 554 T3

ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggctctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttgca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcatt gatttggat 1260
 ggcgcatcca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 39
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 39

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110
 Glu Leu Val Ser His Gly Gly Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140
 Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190

10

ES 2 631 554 T3

Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205
 Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220
 Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
 225 230 235 240
 Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Lys Met Ala Thr Phe Gly Ala
 245 250 255
 Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270
 Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285
 Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300
 Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

ES 2 631 554 T3

<210> 40
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 40

```

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg      60
aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct      120
tctgctggta tcaactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga      180
ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac      240
ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa      300
gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca tggcggcctg      360
atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaacgcg atgttcaggc acagtggttt      420
gatgtacgta aagtgatgcy taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc      480
gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc      540
accaggggat ttatcggtag cgaaaataaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc      600
agcattataa cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg      660
accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt      720
gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat      780
ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa      840
gaccacgcg caggtggtac gctgggtgtc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc      900
gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcaacttgc acagcctgaa tatgctgcat      960
tctcgcgggt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagat     1020
ctaatcacca tgtcagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc     1080
actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg     1140
gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcy ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc     1200
ggcgttgcca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat     1260
ggcgcattca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtggtg     1320
caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa                                     1350
    
```

10 <210> 41
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15 <400> 41

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Met Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

<210> 42
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 42

atgtctgaaa ttgttgtctc caaatgtggc ggtaccagcg tagctgattt tgacccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcaactaatct gctggctgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgtg acagatgagc tggtcagcca tggcggcctg 360
 atgtcgacc tgctgtttgt tgagatcctg cgcaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
 acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660

10

ES 2 631 554 T3

accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg cagggtgtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcga tccagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
 tctcgcgggt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
 ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaattctag ataccaccgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttgga aagaggatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
 ggcgcatcca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcagggtgtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 43
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 43

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

10

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

5 <210> 44
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 44

atgtctgaaa ttgttgctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcactaatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcggcgc tggcaacgtc tccggcgcctg acagatgagc tggtcagcca tggcggcctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcgaaacgc atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgatc 540
 acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgtgcat 960
 tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcgtagat 1020
 ctaatcacca cgttagaagt gagcgtggca ttaacccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttggca aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
 ggcgcattca gccataacct gtgcttctg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtgggtg 1320
 10 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

15 <210> 45
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 45

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270

Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285

Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300

Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320

Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335

Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Leu Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350

Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365

Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380

Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400

Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415

Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430

Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445

Glu

5 <210> 46
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 46
 tataatgcta gcatgaaaaa tgttggttt atcgg 35

15 <210> 47
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 631 554 T3

<223> Cebador para la amplificación

<400> 47

tataatggat ccttacgccca gttgacgaag c 31

5

<210> 48

<211> 1104

<212> ADN

<213> Escherichia coli

10

<400> 48

```

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc      60
atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt      120
ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg      180
gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa      240
atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct      300
ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc      360
gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg      420
ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc      480
taccaggccg cttccggcgg tggtgcgaga catatgctgt agttattaac ccagatgggc      540
catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccgt cctctgctat tctcgatatc      600
gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cggtggataa ctttggcgtg      660
ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagccgc      720
gaagagtgga aagggcaggc ggaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg      780
gtagatggtt tatgtgtgcy tgctggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt      840
aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg      900
tgggcgaaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc      960
gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag     1020
ttcctgtcag cttttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt     1080
cggatgcttc gtcaactggc gtaa                                             1104

```

15

<210> 49

<211> 367

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 49

```

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
1           5           10           15

Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
          20           25           30

```

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
355 360 365

- 5 <210> 50
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Cebador para la amplificación
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(26)
<223> nnn codificante de cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural ,
excepto glutamina
- 20 <400> 50
agctcgataa cggtcagagt cgannngagt ggaaagggca ggcgg 45
- 25 <210> 51
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Cebador para la amplificación
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(22)
<223> nnn codificante de cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural ,
excepto glutamina
- 40 <400> 51
cgcctgccc ttccactcn nntcgactct gaccgttatc gagct 45
- 45 <210> 52
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Cebador para la amplificación
- 55 <400> 52
tttggtggc ggtaactgta acgtgtccct gatgttg 37
- 60 <210> 53
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

ES 2 631 554 T3

<223> Cebador para la amplificación

<400> 53

caacatcagg gacacgttac agttaccgcc aacaaaa 37

5

<210> 54

<211> 367

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400> 54

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
20 25 30

Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
35 40 45

Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu
65 70 75 80

Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp
85 90 95

Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp
100 105 110

Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg
115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu
130 135 140

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
195 200 205

ES 2 631 554 T3

Arg Ser Gly Glu Leu Pro Val Asp Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240
 Ala Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
 245 250 255
 Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
 260 265 270
 Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
 275 280 285
 Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300
 Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335
 Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350
 Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 55
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 55

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatcaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgacccc tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgcaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg ctccggcgg tggcgcgca catatgctg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccgt cctctgctat tctcgatatc 600

10

ES 2 631 554 T3

gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cggtggataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 gctgagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgctggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag ctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 56
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 56

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

10

ES 2 631 554 T3

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
 180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
 195 200 205

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

Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240

Cys Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
 245 250 255

Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
 260 265 270

Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
 275 280 285

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 57
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 57

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggctg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgcctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc cttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatcaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360

5

10

ES 2 631 554 T3

gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatccttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tgggtgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccggt cctctgctat tctcgatatc 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccctgtagc ggtgagctgc cgggtgataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 tgtgagtgga aagggcaggc gaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag ctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 58
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 58

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

10

ES 2 631 554 T3

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
195 200 205

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

Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
225 230 235 240

Gly Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
245 250 255

ser val ile pro val asp gly leu cys val arg val gly ala leu arg
260 265 270

cys his ser gln ala phe thr ile lys leu lys lys asp val ser ile
275 280 285

pro thr val glu glu leu leu ala ala his asn pro trp ala lys val
290 295 300

val pro asn asp arg glu ile thr met arg glu leu thr pro ala ala
305 310 315 320

val thr gly thr leu thr thr pro val gly arg leu arg lys leu asn
325 330 335

met gly pro glu phe leu ser ala phe thr val gly asp gln leu leu
340 345 350

trp gly ala ala glu pro leu arg arg met leu arg gln leu ala
355 360 365

- <210> 59
- <211> 1104
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

<400> 59

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60

10 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120

ES 2 631 554 T3

ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
gagggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccc tcaatcagga cgtcattacc 360
gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttggtg attgggtgtc cgttgcaacc 480
taccaggccg cttccggcgg tgggtgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccc cctctgctat tctcgatatc 600
gaacgcaaag tcacaacctt aaccctagc ggtgagctgc cgggtggataa ctttggcgtg 660
ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
ggggagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
ttcctgtcag cctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 60
<211> 367
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 60

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

10

ES 2 631 554 T3

Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg
 115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu
 130 135 140

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
 145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
 165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
 180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
 195 200 205

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

Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240

His Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
 245 250 255

Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
 260 265 270

Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
 275 280 285

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 61
 <211> 1104

ES 2 631 554 T3

<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 61

5 atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggtg actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tggcgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccg cctctgctat tctcgatatc 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cgggtgataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 catgagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag cttttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 62
<211> 367
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 62

10 Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
 1 5 10 15
 Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
 20 25 30
 Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
 35 40 45
 Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys
 50 55 60
 15 Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu
 65 70 75 80

ES 2 631 554 T3

Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp
85 90 95

Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp
100 105 110

Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg
115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu
130 135 140

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
195 200 205

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

Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
225 230 235 240

Ile Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
245 250 255

Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
260 265 270

Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
275 280 285

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
290 295 300

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
340 345 350

ES 2 631 554 T3

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 63
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 63

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tggcgcgga catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccgt cctctgctat tctcgatattc 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cgggtggataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 attgagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccgtaggc cgcctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag cttttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 10 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 64
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15

<400> 64

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
 1 5 10 15
 Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
 20 25 30
 Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
 35 40 45

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 65
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 65

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggctg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgCGcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggtg actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tgggtgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccg cctctgctat tctcgatatc 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccCGtagc ggtgagctgc cggTggataa cttTggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 atggagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgctggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag ctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgCGga gccgctgcgt 1080
 10 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 66
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15

<400> 66

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
 1 5 10 15

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 67
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 67

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcgggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccc tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgcaat gatcttgttg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tggcgcgca catatgctg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccc cctctgctat tctcgatatc 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccgtagc ggtgagctgc cggaggataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcga 720
 caggagtgga aagggcaggc ggaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgctgctgc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac ccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgcctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag ctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 10 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 68
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

15

<220>

ES 2 631 554 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (241)..(241)

<223> x es cualquier otro aminoácido excepto glutamina

5 <400> 68

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
20 25 30

Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
35 40 45

Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu
65 70 75 80

Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp
85 90 95

Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp
100 105 110

Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg
115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu
130 135 140

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
195 200 205

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

ES 2 631 554 T3

Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
225 230 235 240

Xaa Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
245 250 255

Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
260 265 270

Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
275 280 285

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
290 295 300

Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
305 310 315 320

Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
325 330 335

Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
340 345 350

Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
355 360 365

<210> 69
<211> 32
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cebador para la amplificación

<400> 69
tataatgcta gcatgaaagc tgcagtactt ca 32

<210> 70
15 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Cebador para la amplificación

<400> 70
tataatgaat tcttacggga ttatgagact tc 32

<210> 71
25 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Cebador para la amplificación

<400> 71
tataatgcta gcatgcctgc tacgttaaag aa 32

ES 2 631 554 T3

<210> 72
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

10 <400> 72
 tataatgagc tctcattgga aaattgggaa gg 32

<210> 73
 <211> 939
 15 <212> ADN
 <213> saccharomyces cerevisiae

<400> 73

atgcctgcta	cgtaaagaa	ttcttctgct	acattaaaac	taaatactgg	tgctccatt	60
ccagtgttgg	gtttcggcac	ttggcgttcc	gttgacaata	acggttacca	ttctgtaatt	120
gcagctttga	aagctggata	cagacacatt	gatgctgcyg	ctatctattt	gaatgaagaa	180
gaagttggca	gggctattaa	agattccgga	gtccctcgtg	aggaaatfff	tattactact	240
aagctttggg	gtacggaaca	acgtgatccg	gaagctgctc	taaacaagtc	tttgaaaaga	300
ctaggcttgg	attatgltga	cctatatctg	atgcattggc	cagtgccttt	gaaaaccgac	360
agagttactg	atggtaacgt	tctgtgcatt	ccaacattag	aagatggcac	tgttgacatc	420
gatactaagg	aatggaattt	tatcaagacg	tgggagttga	tgcaagagtt	gccaaagacg	480
ggcaaaacta	aagccgttgg	tgtctctaata	ttttctatta	acaacattaa	agaattatta	540
gaatctcaa	ataacaaggt	ggtaccagct	actaatcaaa	ttgaaattca	tccattgcta	600
ccacaagacg	aattgattgc	cttttgtaag	gaaaagggta	ttgttggtga	agcctactca	660
ccatttgggga	gtgctaattc	tcctttacta	aaagagcaag	caattattga	tatggctaaa	720
aagcacggcg	ttgagccagc	acagcttatt	atcagttgga	gtattcaaag	aggctacggt	780
gttctggcca	aatcggttaa	tctgaaaga	attgtatcca	attttaagat	tttactctg	840
cctgaggatg	atttcaagac	tattagtaac	ctatccaaag	tgcatggtac	aaagagagtc	900
20 gttgatatga	agtggggatc	cttccaatt	ttccaatga			939

<210> 74
 <211> 312
 <212> PRT
 25 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 74

Met	Pro	Ala	Thr	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Ala	Thr	Leu	Lys	Leu	Asn	Thr
1				5					10					15	
Gly	Ala	Ser	Ile	Pro	Val	Leu	Gly	Phe	Gly	Thr	Trp	Arg	Ser	Val	Asp
			20					25					30		

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

<210> 75
 <211> 1083
 <212> ADN
 5 <213> Metallosphaera sedula

<400> 75

```

atgaaagctg cagtacttca tacgtataag gaaccgctgt ccattgagga cgtgaatatc      60
tcccaacctg aggctgggga agtcaagatc aaggtaagg caaccgggct ctgtcactcc      120
gacgtcaatg tctttgaggg gaaaacccca gttcctcccc cagtgggtgc tggacacgaa      180
atatcagggg ttgtggagga agtgggacct ggggtgacca gggttaaacc aggtgatagg      240
gtgatttcag cgtttattca cccctgtggt aaatgcggta actgcgttgc aggaaaggag      300
aatctgtgtg agaccttctc ccaggtcaga ctcaaggagg taatgccaga tggaacgtca      360
aggctgtcaa aggacggaaa ggagataagg actttccttg gaggcggttt cgcggagtac      420
gccattgtgg gagagaacgc gctaaccagg gttccagagg acatggacct agagaaggta      480
gctgtcctag gttgtgctgg gttaacaggg tacggtgcca tatcatcatc caagattgag      540
cctggagaca ctgtggccgt gataggcgtg ggaggagtgg gtttgtccac aatacaactc      600
ctaagggcct cgggtgccgg gaggataatc gccgtgggaa cgaaaaagtg gaaacttgac      660
agggccatgg agctaggtgc aactgacgtg gtaaactcga aggagataga tcccgtaaaa      720
gcaataaagg agatcacggg tggagggcca cagggtggtg tagaggctgg aggaaatgag      780
gatacgattc atatggcgct ggattcagtt agaattggag gaaagggtgt tctggtaggg      840
ttacctccag caacggccat gataccatc agggtagcgt caatagttag gggaggcata      900
gaggttgtgg ggaattacgg aggaagacct agggttgata tgccaagct tctcgagcta      960
gtgaggcagg gaagatacga tccgtctagg cttgtgacgg gtagattcag gttggaggaa    1020
ataaatgagg cagtcaaaat gcttgaggaa ggagaggcca taagaagtct cataatcccc    1080
taa                                                                           1083
    
```

10
 <210> 76
 <211> 360
 <212> PRT
 15 <213> Metallosphaera sedula

<400> 76

```

Met Lys Ala Ala Val Leu His Thr Tyr Lys Glu Pro Leu Ser Ile Glu
1           5           10           15
Asp Val Asn Ile Ser Gln Pro Lys Ala Gly Glu Val Lys Ile Lys Val
20           25           30
Lys Ala Thr Gly Leu Cys His Ser Asp Val Asn Val Phe Glu Gly Lys
35           40           45
    
```

ES 2 631 554 T3

Thr Pro Val Pro Pro Pro Val Val Ala Gly His Glu Ile Ser Gly Ile
 50 55 60

Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr Arg Val Lys Pro Gly Asp Arg
 65 70 75 80

Val Ile Ser Ala Phe Ile His Pro Cys Gly Lys Cys Gly Asn Cys Val
 85 90 95

Ala Gly Lys Glu Asn Leu Cys Glu Thr Phe Ser Gln Val Arg Leu Lys
 100 105 110

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

Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Gly Phe Ala Glu Tyr Ala Ile Val Gly
 130 135 140

Glu Asn Ala Leu Thr Arg Val Pro Glu Asp Met Asp Leu Glu Lys Val
 145 150 155 160

Ala Val Leu Gly Cys Ala Gly Leu Thr Gly Tyr Gly Ala Ile Ser Ser
 165 170 175

Ser Lys Ile Glu Pro Gly Asp Thr Val Ala Val Ile Gly Val Gly Gly
 180 185 190

Val Gly Leu Ser Thr Ile Gln Leu Leu Arg Ala Ser Gly Ala Gly Arg
 195 200 205

Ile Ile Ala Val Gly Thr Lys Lys Trp Lys Leu Asp Arg Ala Met Glu
 210 215 220

Leu Gly Ala Thr Asp Val Val Asn Ser Lys Glu Ile Asp Pro Val Lys
 225 230 235 240

Ala Ile Lys Glu Ile Thr Gly Gly Gly Pro Gln Val Val Ile Glu Ala
 245 250 255

Gly Gly Asn Glu Asp Thr Ile His Met Ala Leu Asp Ser Val Arg Ile
 260 265 270

Gly Gly Lys Val Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Met Ile
 275 280 285

Pro Ile Arg Val Ala Ser Ile Val Arg Gly Gly Ile Glu Val Val Gly
 290 295 300

Asn Tyr Gly Gly Arg Pro Arg Val Asp Met Pro Lys Leu Leu Glu Leu
 305 310 315 320

ES 2 631 554 T3

Val Arg Gln Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Arg Leu Val Thr Gly Arg Phe
 325 330 335

Arg Leu Glu Glu Ile Asn Glu Ala Val Lys Met Leu Glu Glu Gly Glu
 340 345 350

Ala Ile Arg Ser Leu Ile Ile Pro
 355 360

- 5 <210> 77
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 77
 gtcaaggcaa ccggtctctg tcgctccgac gtcaatg 37
- 15 <210> 78
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 78
 cattgacgtc ggagcgacag agaccggtg ccttgac 37
- 25 <210> 79
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 79
 ggctctgtca ctccgacgta catgtctttg aggggaaaac 40
- 35 <210> 80
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 80
 gtttcccct caaagacatg tacgtcggag tgacagagcc 40
- 45 <210> 81
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Metallosphaera sedula
- 50 <400> 81

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Gly Gly Lys Val Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Met Ile
 275 280 285

Pro Ile Arg Val Ala Ser Ile Val Arg Gly Gly Ile Glu Val Val Gly
 290 295 300

Asn Tyr Gly Gly Arg Pro Arg Val Asp Met Pro Lys Leu Leu Glu Leu
 305 310 315 320

Val Arg Gln Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Arg Leu Val Thr Gly Arg Phe
 325 330 335

Arg Leu Glu Glu Ile Asn Glu Ala Val Lys Met Leu Glu Glu Gly Glu
 340 345 350

Ala Ile Arg Ser Leu Ile Ile Pro
 355 360

<210> 82
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Metallosphaera sedula

5

<400> 82

atgaaagcag cagttctgca tacctataaa gaaccgctga gcattgaaga tgtgaatatt 60
 tcacagccga aagccggtga agtgaaaatc aaagttaaag caaccggtct gtgtcgtagt 120
 gatgttcattg tttttgaagg taaaacaccg gttccgcctc cggttggtgc aggtcatgaa 180
 attagcggta ttgttgaaga ggttggtccg ggtgttaccg gtgttaaacc gggatgatcgt 240
 gttattagcg catttattca tccgtgtggt aaatgcggta attgtgttgc cggtaaagaa 300
 aatctgtgtg aaaccttag ccaggttcgt ctgaaagggtg ttatgccgga tggcaccagc 360
 cgtctgagca aagatggcaa agaaattcgt accttctggt gtggtggttt tgcagaatat 420
 gcaattgttg gtgaaaatgc actgaccggt gttccggaag atatggatct ggaaaaagtt 480
 gcagttctgg gttgtgccgg tctgaccggt tatggtgcaa ttagcagcag caaaattgaa 540
 cctggtgata ccggtgcagt tattggtggt ggtggtgtgg gtctgagcac cattcagctg 600
 ctgctgcaa gcggtgcagg tcgtattatt gcagttggca ccaaaaaatg gaaactggat 660
 cgtgcaatgg aactgggtgc aaccgatggt gtaaacagta aagaaattga tccggtgaaa 720
 gccatcaaag aaatcaccgg tgggtggtccg caggttgta ttgaagccgg tggtaatgaa 780
 gataccattc acatggcact ggatagcgtt cgtattggtg gtaaagttgt tctggttggg 840
 ctgcctccgg caaccgcaat gattccgatt cgtgttgcaa gcattgttcg tgggtgtatt 900
 gaagttgttg gtaattatgg tggtcgtccg cgtgttgata tgccgaaact gctggaactg 960
 gttcgtcagg gtcgttatga tccgagccgt ctggttaccg gtcgttttcg tctggaagaa 1020
 attaatgaag ccgtcaaaat gctggaagaa ggtgaagcaa ttcgtagcct gattattccg 1080
 taa 1083

10

<210> 83
 <211> 42

ES 2 631 554 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Cebador para la amplificación

<400> 83
 tataaggatc cgtttaactt taagaaggag atataccatg gg 42

10 <210> 84
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 84
 tataagaatt cttacgccag ttgacgaag 29

20 <210> 85
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 85
 30 tataagcggc cgcgtttaac ttaagaagg agatat 36

<210> 86
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 86
 40 tataaactcg agcttacgga ataactcagg 29

<210> 87
 <211> 841
 45 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 87

Met Lys Asn Leu Arg Leu Cys Arg Arg Ile Phe Ile Ser Thr Lys Gly
 1 5 10 15

Asn Glu Val Thr Thr Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val
 20 25 30

Ala Asn Ala Glu Arg Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn
 35 40 45

50

ES 2 631 554 T3

Ala Arg Gln Gly Gln Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile
50 55 60

Thr Asn His Leu Val Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp
65 70 75 80

Ala Leu Pro Asn Ile Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu
85 90 95

Thr Gly Leu Ala Ala Ala Gln Pro Gly Phe Pro Leu Ala Gln Leu Lys
100 105 110

Thr Phe Val Asp Gln Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly
115 120 125

Ile Ser Leu Leu Gly Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile
130 135 140

Cys Arg Gly Glu Lys Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu
145 150 155 160

Ala Arg Gly His Asn Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu
165 170 175

Ala Val Gly His Tyr Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr
180 185 190

Arg Arg Ile Ala Ala Ser Arg Ile Pro Ala Asp His Met Val Leu Met
195 200 205

Ala Gly Phe Thr Ala Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly
210 215 220

Arg Asn Gly Ser Asp Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg
225 230 235 240

Ala Asp Cys Cys Glu Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Cys
245 250 255

Asp Pro Arg Gln Val Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr
260 265 270

Gln Glu Ala Met Glu Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro
275 280 285

Arg Thr Ile Thr Pro Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys
290 295 300

Asn Thr Gly Asn Pro Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ile Gly Ala Ser Arg
305 310 315 320

ES 2 631 554 T3

Asp Glu Asp Glu Leu Pro Val Lys Gly Ile Ser Asn Leu Asn Asn Met
 325 330 335
 Ala Met Phe Ser Val Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met
 340 345 350
 Ala Ala Arg Val Phe Ala Ala Met Ser Arg Ala Arg Ile Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Ile Thr Gln Ser Ser Ser Glu Tyr Ser Ile Ser Phe Cys Val Pro
 370 375 380
 Gln Ser Asp Cys Val Arg Ala Glu Arg Ala Met Gln Glu Glu Phe Tyr
 385 390 395
 Leu Glu Leu Lys Glu Gly Leu Leu Glu Pro Leu Ala Val Thr Glu Arg
 405 410 415
 Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Gly Asp Gly Met Arg Thr Leu Arg Gly
 420 425 430
 Ile Ser Ala Lys Phe Phe Ala Ala Leu Ala Arg Ala Asn Ile Asn Ile
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Gln Gly Ser Ser Glu Arg Ser Ile Ser Val Val Val
 450 455 460
 Asn Asn Asp Asp Ala Thr Thr Gly Val Arg Val Thr His Gln Met Leu
 465 470 475 480
 Phe Asn Thr Asp Gln Val Ile Glu Val Phe Val Ile Gly Val Gly Gly
 485 490 495
 Val Gly Gly Ala Leu Leu Glu Gln Leu Lys Arg Gln Gln Ser Trp Leu
 500 505 510
 Lys Asn Lys His Ile Asp Leu Arg Val Cys Gly Val Ala Asn Ser Lys
 515 520 525
 Ala Leu Leu Thr Asn Val His Gly Leu Asn Leu Glu Asn Trp Gln Glu
 530 535 540
 Glu Leu Ala Gln Ala Lys Glu Pro Phe Asn Leu Gly Arg Leu Ile Arg
 545 550 555 560
 Leu Val Lys Glu Tyr His Leu Leu Asn Pro Val Ile Val Asp Cys Thr
 565 570 575
 Ser Ser Gln Ala Val Ala Asp Gln Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Glu Gly
 580 585 590

ES 2 631 554 T3

Phe His Val Val Thr Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asp
 595 600 605

Tyr Tyr His Gln Leu Arg Tyr Ala Ala Glu Lys Ser Arg Arg Lys Phe
 610 615 620

Leu Tyr Asp Thr Asn Val Gly Ala Gly Leu Pro Val Ile Glu Asn Leu
 625 630 635 640

Gln Asn Leu Leu Asn Ala Gly Asp Glu Leu Met Lys Phe Ser Gly Ile
 645 650 655

Leu Ser Gly Ser Leu Ser Tyr Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Met
 660 665 670

Ser Phe Ser Glu Ala Thr Thr Leu Ala Arg Glu Met Gly Tyr Thr Glu
 675 680 685

Pro Asp Pro Arg Asp Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu
 690 695 700

Leu Ile Leu Ala Arg Glu Thr Gly Arg Glu Leu Glu Leu Ala Asp Ile
 705 710 715 720

Glu Ile Glu Pro Val Leu Pro Ala Glu Phe Asn Ala Glu Gly Asp Val
 725 730 735

Ala Ala Phe Met Ala Asn Leu Ser Gln Leu Asp Asn Leu Phe Ala Ala
 740 745 750

Arg Val Ala Lys Ala Arg Asp Glu Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly
 755 760 765

Asn Ile Asp Glu Asp Gly Val Cys Arg Val Lys Ile Ala Glu Val Asp
 770 775 780

Ser Asn Asp Pro Leu Phe Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala
 785 790 795 800

Phe Tyr Ser His Tyr Tyr Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr
 805 810 815

Gly Ala Gly Asn Asp Val Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu
 820 825 830

Arg Thr Leu Ser Trp Lys Leu Gly Val
 835 840

<210> 88
 <211> 810
 <212> PRT

ES 2 631 554 T3

<213> Escherichia coli

<400> 88

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

5

ES 2 631 554 T3

Ala Ser Glu Leu Ala Arg Leu Ala Ala Pro Val Leu His Ala Arg Thr
 260 265 270

Leu Gln Pro Val Ser Gly Ser Glu Ile Asp Leu Gln Leu Arg Cys Ser
 275 280 285

Tyr Thr Pro Asp Gln Gly Ser Thr Arg Ile Glu Arg Val Leu Ala Ser
 290 295 300

Gly Thr Gly Ala Arg Ile Val Thr Ser His Asp Asp Val Cys Leu Ile
 305 310 315 320

Glu Phe Gln Val Pro Ala Ser Gln Asp Phe Lys Leu Ala His Lys Glu
 325 330 335

Ile Asp Gln Ile Leu Lys Arg Ala Gln Val Arg Pro Leu Ala Val Gly
 340 345 350

Val His Asn Asp Arg Gln Leu Leu Gln Phe Cys Tyr Thr Ser Glu Val
 355 360 365

Ala Asp Ser Ala Leu Lys Ile Leu Asp Glu Ala Gly Leu Pro Gly Glu
 370 375 380

Leu Arg Leu Arg Gln Gly Leu Ala Leu Val Ala Met Val Gly Ala Gly
 385 390 395 400

Val Thr Arg Asn Pro Leu His Cys His Arg Phe Trp Gln Gln Leu Lys
 405 410 415

Gly Gln Pro Val Glu Phe Thr Trp Gln Ser Asp Asp Gly Ile Ser Leu
 420 425 430

Val Ala Val Leu Arg Thr Gly Pro Thr Glu Ser Leu Ile Gln Gly Leu
 435 440 445

His Gln Ser Val Phe Arg Ala Glu Lys Arg Ile Gly Leu Val Leu Phe
 450 455 460

Gly Lys Gly Asn Ile Gly Ser Arg Trp Leu Glu Leu Phe Ala Arg Glu
 465 470 475 480

Gln Ser Thr Leu Ser Ala Arg Thr Gly Phe Glu Phe Val Leu Ala Gly
 485 490 495

Val Val Asp Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Asp Ala
 500 505 510

Ser Arg Ala Leu Ala Phe Phe Asn Asp Glu Ala Val Glu Gln Asp Glu
 515 520 525

ES 2 631 554 T3

Glu Ser Leu Phe Leu Trp Met Arg Ala His Pro Tyr Asp Asp Leu Val
 530 535 540

Val Leu Asp Val Thr Ala Ser Gln Gln Leu Ala Asp Gln Tyr Leu Asp
 545 550 555 560 565

Phe Ala Ser His Gly Phe His Val Ile Ser Ala Asn Lys Leu Ala Gly
 565 570 575

Ala Ser Asp Ser Asn Lys Tyr Arg Gln Ile His Asp Ala Phe Glu Lys
 580 585 590

Thr Gly Arg His Trp Leu Tyr Asn Ala Thr Val Gly Ala Gly Leu Pro
 595 600 605

Ile Asn His Thr Val Arg Asp Leu Ile Asp Ser Gly Asp Thr Ile Leu
 610 615 620

Ser Ile Ser Gly Ile Phe Ser Gly Thr Leu Ser Trp Leu Phe Leu Gln
 625 630 635 640

Phe Asp Gly Ser Val Pro Phe Thr Glu Leu Val Asp Gln Ala Trp Gln
 645 650 655

Gln Gly Leu Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp Asp Leu Ser Gly Lys Asp
 660 665 670

Val Met Arg Lys Leu Val Ile Leu Ala Arg Glu Ala Gly Tyr Asn Ile
 675 680 685

Glu Pro Asp Gln Val Arg Val Glu Ser Leu Val Pro Ala His Cys Glu
 690 695 700

Gly Gly Ser Ile Asp His Phe Phe Glu Asn Gly Asp Glu Leu Asn Glu
 705 710 715 720

Gln Met Val Gln Arg Leu Glu Ala Ala Arg Glu Met Gly Leu Val Leu
 725 730 735

Arg Tyr Val Ala Arg Phe Asp Ala Asn Gly Lys Ala Arg Val Gly Val
 740 745 750

Glu Ala Val Arg Glu Asp His Pro Leu Ala Ser Leu Leu Pro Cys Asp
 755 760 765

Asn Val Phe Ala Ile Glu Ser Arg Trp Tyr Arg Asp Asn Pro Leu Val
 770 775 780

Ile Arg Gly Pro Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Ala Gly Ala Ile Gln
 785 790 795 800

Ser Asp Ile Asn Arg Leu Ala Gln Leu Leu
 805 810

<210> 89

<211> 473

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 89

Met Thr Thr Val Met Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Gly Ser Gly Glu
 1 5 10 15

Arg Ile Arg His Val Ala Lys Ile Val Thr Lys Arg Lys Lys Glu Asp
 20 25 30

Asp Asp Val Val Val Val Val Ser Ala Met Ser Glu Val Thr Asn Ala
 35 40 45

Leu Val Glu Ile Ser Gln Gln Ala Leu Asp Val Arg Asp Ile Ala Lys
 50 55 60

Val Gly Asp Phe Ile Lys Phe Ile Arg Glu Lys His Tyr Lys Ala Ile
 65 70 75 80

Glu Glu Ala Ile Lys Ser Glu Glu Ile Lys Glu Glu Val Lys Lys Ile
 85 90 95

Ile Asp Ser Arg Ile Glu Glu Leu Glu Lys Val Leu Ile Gly Val Ala
 100 105 110

Tyr Leu Gly Glu Leu Thr Pro Lys Ser Arg Asp Tyr Ile Leu Ser Phe
 115 120 125

Gly Glu Arg Leu Ser Ser Pro Ile Leu Ser Gly Ala Ile Arg Asp Leu
 130 135 140

Gly Glu Lys Ser Ile Ala Leu Glu Gly Gly Glu Ala Gly Ile Ile Thr
 145 150 155 160

Asp Asn Asn Phe Gly Ser Ala Arg Val Lys Arg Leu Glu Val Lys Glu
 165 170 175

Arg Leu Leu Pro Leu Leu Lys Glu Gly Ile Ile Pro Val Val Thr Gly
 180 185 190

Phe Ile Gly Thr Thr Glu Glu Gly Tyr Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly
 195 200 205

Gly Ser Asp Tyr Ser Ala Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Leu Asp Ala Asp
 210 215 220

Ile Ile Glu Ile Trp Thr Asp Val Ser Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro

5

10

ES 2 631 554 T3

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

ES 2 631 554 T3

Gly Ile Ala Ala Lys Val Phe Gln Ala Leu Ala Glu Arg Gly Ile Ala
275 280 285

Val Asp Met Ile Ile Gln Gly Val Pro Gly His Asp Pro Ser Arg Gln
290 295 300

Gln Met Ala Phe Thr Val Lys Lys Asp Phe Ala Gln Glu Ala Leu Glu
305 310 315 320

Ala Leu Glu Pro Val Leu Ala Glu Ile Gly Gly Glu Ala Ile Leu Arg
325 330 335

Pro Asp Ile Ala Lys Val Ser Ile Val Gly Val Gly Leu Ala Ser Thr
340 345 350

Pro Glu Val Pro Ala Lys Met Phe Gln Ala Val Ala Ser Thr Gly Ala
355 360 365

Asn Ile Glu Met Ile Ala Thr Ser Glu Val Arg Ile Ser Val Ile Ile
370 375 380

Pro Ala Glu Tyr Ala Glu Ala Ala Leu Arg Ala Val His Gln Ala Phe
385 390 395 400

Glu Leu Asp Lys Ala
405

<210> 91

<211> 420

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 91

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95

10

ES 2 631 554 T3

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
355 360 365

ES 2 631 554 T3

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380

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

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415

Ala Gly Thr Gly
 420

<210> 92
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

5

<400> 92

Met Ala Ala Thr Arg Val Arg Cys Cys His Ser Asn Ala Ala Phe Thr
 1 5 10 15

Arg Leu Pro Leu Thr Arg His Arg Asn Ser Pro Thr Leu Pro Ile Ser
 20 25 30

Leu Asn Arg Val Asp Phe Pro Thr Leu Lys Lys Leu Ser Leu Pro Ile
 35 40 45

Gly Asp Gly Ser Ser Ile Arg Lys Val Ser Gly Ser Gly Ser Arg Asn
 50 55 60

Ile Val Arg Ala Val Leu Glu Glu Lys Lys Thr Glu Ala Ile Thr Glu
 65 70 75 80

Val Asp Glu Lys Gly Ile Thr Cys Val Met Lys Phe Gly Gly Ser Ser
 85 90 95

Val Ala Ser Ala Glu Arg Met Lys Glu Val Ala Asp Leu Ile Leu Thr
 100 105 110

Phe Pro Glu Glu Ser Pro Val Ile Val Leu Ser Ala Met Gly Lys Thr
 115 120 125

Thr Asn Asn Leu Leu Leu Ala Gly Glu Lys Ala Val Ser Cys Gly Val
 130 135 140

Ser Asn Ala Ser Glu Ile Glu Glu Leu Ser Ile Ile Lys Glu Leu His
 145 150 155 160

Ile Arg Thr Val Lys Glu Leu Asn Ile Asp Pro Ser Val Ile Leu Thr
 165 170 175

10

ES 2 631 554 T3

Tyr Leu Glu Glu Leu Glu Gln Leu Leu Lys Gly Ile Ala Met Met Lys
 180 185 190
 Glu Leu Thr Leu Arg Thr Arg Asp Tyr Leu Val Ser Phe Gly Glu Cys
 195 200 205
 Leu Ser Thr Arg Ile Phe Ala Ala Tyr Leu Asn Thr Ile Gly Val Lys
 210 215 220
 Ala Arg Gln Tyr Asp Ala Phe Glu Ile Gly Phe Ile Thr Thr Asp Asp
 225 230 235 240
 Phe Thr Asn Gly Asp Ile Leu Glu Ala Thr Tyr Pro Ala Val Ala Lys
 245 250 255
 Arg Leu Tyr Asp Asp Trp Met His Asp Pro Ala Val Pro Ile Val Thr
 260 265 270
 Gly Phe Leu Gly Lys Gly Trp Lys Thr Gly Ala Val Thr Thr Leu Gly
 275 280 285
 Arg Gly Gly Ser Asp Leu Thr Ala Thr Thr Ile Gly Lys Ala Leu Gly
 290 295 300
 Leu Lys Glu Ile Gln Val Trp Lys Asp Val Asp Gly Val Leu Thr Cys
 305 310 315 320
 Asp Pro Thr Ile Tyr Lys Arg Ala Thr Pro Val Pro Tyr Leu Thr Phe
 325 330 335
 Asp Glu Ala Ala Glu Leu Ala Tyr Phe Gly Ala Gln Val Leu His Pro
 340 345 350
 Gln Ser Met Arg Pro Ala Arg Glu Gly Glu Ile Pro Val Arg Val Lys
 355 360 365
 Asn Ser Tyr Asn Pro Lys Ala Pro Gly Thr Ile Ile Thr Lys Thr Arg
 370 375 380
 Asp Met Thr Lys Ser Ile Leu Thr Ser Ile Val Leu Lys Arg Asn Val
 385 390 395 400
 Thr Met Leu Asp Ile Ala Ser Thr Arg Met Leu Gly Gln Val Gly Phe
 405 410 415
 Leu Ala Lys Val Phe Ser Ile Phe Glu Glu Leu Gly Ile Ser Val Asp
 420 425 430
 Val Val Ala Thr Ser Glu Val Ser Ile Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ser
 435 440 445

ES 2 631 554 T3

Lys Leu Trp Ser Arg Glu Leu Ile Gln Gln Glu Leu Asp His Val Val
450 455 460

Glu Glu Leu Glu Lys Ile Ala Val Val Asn Leu Leu Lys Gly Arg Ala
465 470 475 480

Ile Ile Ser Leu Ile Gly Asn Val Gln His Ser Ser Leu Ile Leu Glu
485 490 495

Arg Ala Phe His Val Leu Tyr Thr Lys Gly Val Asn Val Gln Met Ile
500 505 510

Ser Gln Gly Ala Ser Lys Val Asn Ile Ser Phe Ile Val Asn Glu Ala
515 520 525

Glu Ala Glu Gly Cys Val Gln Ala Leu His Lys Ser Phe Phe Glu Ser
530 535 540

Gly Asp Leu Ser Glu Leu Leu Ile Gln Pro Arg Leu Gly Asn Gly Ser
545 550 555 560

Pro Val Arg Thr Leu Gln Val Glu Asn
565

<210> 93

<211> 527

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 93

Met Pro Met Asp Phe Gln Pro Thr Ser Ser His Ser Asn Trp Val Val
1 5 10 15

Gln Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Gly Lys Phe Pro Val Gln Ile Val
20 25 30

Asp Asp Ile Val Lys His Tyr Ser Lys Pro Asp Gly Pro Asn Asn Asn
35 40 45

Val Ala Val Val Cys Ser Ala Arg Ser Ser Tyr Thr Lys Ala Glu Gly
50 55 60

Thr Thr Ser Arg Leu Leu Lys Cys Cys Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ser
65 70 75 80

Glu Phe Gln Asp Ile Ile Glu Val Ile Arg Gln Asp His Ile Asp Asn
85 90 95

Ala Asp Arg Phe Ile Leu Asn Pro Ala Leu Gln Ala Lys Leu Val Asp
100 105 110

10 Asp Thr Asn Lys Glu Leu Glu Leu Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ala Ser

ES 2 631 554 T3

Asn Ala Ser Ala Tyr Arg Met Glu Glu Asp Val Pro Leu Val Ile Pro
 115 120 125

Glu Val Asn Ala Asp His Leu Glu Leu Ile Glu Ile Gln Arg Glu Lys
 130 135 140

Arg Gly Trp Asp Gly Ala Ile Ile Thr Asn Pro Asn Cys Ser Thr Ile
 145 150 155 160

Cys Ala Val Ile Thr Leu Lys Pro Ile Met Asp Lys Phe Gly Leu Glu
 165 170 175

Ala Val Phe Ile Ala Thr Met Gln Ala Val Ser Gly Ala Gly Tyr Asn
 180 185 190

Gly Val Pro Ser Met Ala Ile Leu Asp Asn Leu Ile Pro Phe Ile Lys
 195 200 205

Asn Glu Glu Glu Lys Met Gln Thr Glu Ser Leu Lys Leu Leu Gly Thr
 210 215 220

Leu Lys Asp Gly Lys Val Glu Leu Ala Asn Phe Lys Ile Ser Ala Ser
 225 230 235 240

Cys Asn Arg Val Ala Val Ile Asp Gly His Thr Glu Ser Ile Phe Val
 245 250 255

Lys Thr Lys Glu Gly Ala Glu Pro Glu Glu Ile Lys Glu Val Met Asp
 260 265 270

Lys Phe Asp Pro Leu Lys Asp Leu Asn Leu Pro Thr Tyr Ala Lys Pro
 275 280 285

Ile Val Ile Arg Glu Glu Ile Asp Arg Pro Gln Pro Arg Leu Asp Arg
 290 295 300

Asn Glu Gly Asn Gly Met Ser Ile Val Val Gly Arg Ile Arg Lys Asp
 305 310 315 320

Pro Ile Phe Asp Val Lys Tyr Thr Ala Leu Glu His Asn Thr Ile Arg
 325 330 335

Gly Ala Ala Gly Ala Ser Val Leu Asn Ala Glu Tyr Phe Val Lys Lys
 340 345 350

Tyr Ile

<210> 95

<211> 331

5 <212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 95

ES 2 631 554 T3

Met Arg Val Ala Val Val Gly Ala Thr Gly Ala Val Gly Arg Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Val Leu Glu Ala Arg Asp Phe Pro Leu Ser Asp Leu Arg Leu
20 25 30

Tyr Ala Ser Pro Arg Ser Ala Gly Val Arg Leu Ala Phe Arg Gly Glu
35 40 45

Glu Ile Pro Val Glu Pro Leu Pro Glu Gly Pro Leu Pro Val Asp Leu
50 55 60

Val Leu Ala Ser Ala Gly Gly Gly Ile Ser Lys Ala Lys Ala Leu Val
65 70 75 80

Trp Ala Glu Gly Gly Ala Leu Val Val Asp Asn Ser Ser Ala Trp Arg
85 90 95

Tyr Glu Pro Trp Val Pro Leu Val Val Pro Glu Val Asn Arg Glu Lys
100 105 110

Ile Phe Gln His Arg Gly Ile Ile Ala Asn Pro Asn Cys Thr Thr Ala
115 120 125

Ile Leu Ala Met Ala Leu Trp Pro Leu His Arg Ala Phe Gln Ala Lys
130 135 140

Arg Val Ile Val Ala Thr Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Ala Gly Ala Lys
145 150 155 160

Ala Met Glu Glu Leu Leu Thr Glu Thr His Arg Phe Leu His Gly Glu
165 170 175

Ala Pro Lys Ala Glu Ala Phe Ala His Pro Leu Pro Phe Asn Val Ile
180 185 190

Pro His Ile Asp Ala Phe Gln Glu Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Glu Met
195 200 205

Lys Val Val Trp Glu Thr His Lys Ile Phe Gly Asp Asp Thr Ile Arg
210 215 220

Ile Ser Ala Thr Ala Val Arg Val Pro Thr Leu Arg Ala His Ala Glu
225 230 235 240

Ala Val Ser Val Glu Phe Ala Arg Pro Val Thr Pro Glu Ala Ala Arg
245 250 255

ES 2 631 554 T3

Glu Val Leu Lys Glu Ala Pro Gly Val Glu Val Val Asp Glu Pro Glu
 260 265 270

Ala Lys Arg Tyr Pro Met Pro Leu Thr Ala Ser Gly Lys Trp Asp Val
 275 280 285

Glu Val Gly Arg Ile Arg Lys Ser Leu Ala Phe Glu Asn Gly Leu Asp
 290 295 300

Phe Phe Val Val Gly Asp Gln Leu Leu Lys Gly Ala Ala Leu Asn Ala
 305 310 315 320

Val Gln Ile Ala Glu Glu Trp Leu Lys Gly Ala
 325 330

<210> 96
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 96

Met Gly Arg Gly Leu His Val Ala Val Val Gly Ala Thr Gly Ala Val
 1 5 10 15

Gly Gln Gln Met Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Asn Phe Glu Met Asp
 20 25 30

Thr Leu Thr Leu Leu Ser Ser Lys Arg Ser Ala Gly Thr Lys Val Thr
 35 40 45

Phe Lys Gly Gln Glu Leu Thr Val Gln Glu Ala Ser Pro Glu Ser Phe
 50 55 60

Glu Gly Val Asn Ile Ala Leu Phe Ser Ala Gly Gly Ser Val Ser Gln
 65 70 75 80

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

Thr Ser Ala Phe Arg Met Asp Glu Asn Thr Pro Leu Val Val Pro Glu
 100 105 110

Val Asn Glu Ala Asp Leu His Glu His Asn Gly Ile Ile Ala Asn Pro
 115 120 125

Asn Cys Ser Thr Ile Gln Met Val Ala Ala Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 130 135 140

Ala Tyr Gly Leu Asn Lys Val Ile Val Ser Thr Tyr Gln Ala Val Ser
 145 150 155 160

10

ES 2 631 554 T3

Gly Ala Gly Asn Glu Ala Val Lys Glu Leu Tyr Ser Gln Thr Gln Ala
 165 170 175

Ile Leu Asn Lys Glu Glu Ile Glu Pro Glu Ile Met Pro Val Lys Gly
 180 185 190

Asp Lys Lys His Tyr Gln Ile Ala Phe Asn Ala Ile Pro Gln Ile Asp
 195 200 205

Lys Phe Gln Asp Asn Gly Tyr Thr Phe Glu Glu Met Lys Met Ile Asn
 210 215 220

Glu Thr Lys Lys Ile Met His Met Pro Asp Leu Gln Val Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Cys Val Arg Leu Pro Ile Gln Thr Gly His Ser Glu Ser Val Tyr Ile
 245 250 255

Glu Ile Asp Arg Asp Asp Ala Thr Val Glu Asp Ile Lys Asn Leu Leu
 260 265 270

Lys Glu Ala Pro Gly Val Thr Leu Gln Asp Asp Pro Ser Gln Gln Leu
 275 280 285

Tyr Pro Met Pro Ala Asp Ala Val Gly Lys Asn Asp Val Phe Val Gly
 290 295 300

Arg Ile Arg Lys Asp Leu Asp Arg Ala Asn Gly Phe His Leu Trp Val
 305 310 315 320

Val Ser Asp Asn Leu Leu Lys Gly Ala Ala Trp Asn Ser Val Gln Ile
 325 330 335

Ala Glu Ser Leu Lys Lys Leu Asn Leu Val
 340 345

<210> 97

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 97

Met Thr Thr Ile Ala Val Val Gly Ala Thr Gly Gln Val Gly Gln Val
 1 5 10 15

Met Arg Thr Leu Leu Glu Glu Arg Asn Phe Pro Ala Asp Thr Val Arg
 20 25 30

Phe Phe Ala Ser Pro Arg Ser Ala Gly Arg Lys Ile Glu Phe Arg Gly
 35 40 45

10 Thr Glu Ile Glu Val Glu Asp Ile Thr Gln Ala Thr Glu Glu Ser Leu

ES 2 631 554 T3

325

330

335

Gln Ile Ala Glu Leu Leu Val Lys
340

<210> 98

<211> 340

5 <212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 98

Glu Ser Ala Pro Ser Leu Ala Val Val Gly Val Thr Gly Ala Val Gly
1 5 10 15

Gln Glu Phe Leu Ser Val Leu Ser Asp Arg Asp Phe Pro Tyr Ser Ser
20 25 30

Ile Lys Met Leu Ala Ser Lys Arg Ser Ala Gly Lys Arg Val Ala Phe
35 40 45

Asp Gly His Glu Tyr Thr Val Glu Glu Leu Thr Ala Asp Ser Phe Asn
50 55 60

Gly Val Asp Ile Ala Leu Phe Ser Ala Gly Gly Ser Ile Ser Lys Glu
65 70 75 80

Phe Gly Pro Leu Ala Ala Glu Lys Gly Thr Ile Val Val Asp Asn Ser
85 90 95

Ser Ala Phe Arg Met Val Asp Gly Val Pro Leu Val Ile Pro Glu Val
100 105 110

Asn Pro Glu Ala Met Lys Gly Ile Lys Val Gly Met Gly Lys Gly Ala
115 120 125

Leu Ile Ala Asn Pro Asn Cys Ser Thr Ile Ile Cys Leu Met Ala Val
130 135 140

Thr Pro Leu His His His Ala Lys Val Lys Arg Met Val Val Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Ala Gly Ala Ala Ala Met Glu Glu Leu Val
165 170 175

Gln Gln Thr Arg Glu Val Leu Glu Gly Lys Pro Pro Thr Cys Asn Ile
180 185 190

Phe Gly Gln Gln Tyr Ala Phe Asn Leu Phe Ser His Asn Ala Pro Ile
195 200 205

Leu Asp Asn Gly Tyr Asn Glu Glu Glu Met Lys Leu Val Lys Glu Thr
210 215 220

10

ES 2 631 554 T3

Arg Lys Ile Trp Asn Asp Thr Glu Val Lys Val Thr Ala Thr Cys Ile
225 230 235 240

Arg Val Pro Val Met Arg Ala His Ala Glu Ser Val Asn Leu Gln Phe
245 250 255

Glu Asn Pro Leu Asp Glu Asn Thr Ala Arg Glu Ile Leu Lys Lys Ala
260 265 270

Pro Gly Val Tyr Ile Ile Asp Asp Arg Ala Ser Asn Thr Phe Pro Thr
275 280 285

Pro Leu Asp Val Ser Asn Lys Asp Asp Val Ala Val Gly Arg Ile Arg
290 295 300

Arg Asp Val Ser Gln Asp Gly Asn Phe Gly Leu Asp Ile Phe Val Cys
305 310 315 320

Gly Asp Gln Ile Arg Lys Gly Ala Ala Leu Asn Ala Val Gln Ile Ala
325 330 335

Glu Met Leu Leu
340

<210> 99

<211> 365

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 99

Met Ala Gly Lys Lys Ile Ala Gly Val Leu Gly Ala Thr Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Gln Arg Phe Ile Leu Leu Leu Ala Asn His Pro His Phe Glu Leu
20 25 30

Lys Val Leu Gly Ala Ser Ser Arg Ser Ala Gly Lys Lys Tyr Val Asp
35 40 45

Ala Val Asn Trp Lys Gln Thr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Ala Thr Asp
50 55 60

Ile Ile Val Ser Glu Cys Lys Ser Glu Phe Phe Lys Glu Cys Asp Ile
65 70 75 80

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

Phe Met Glu Ala Gly Ile Ala Ile Val Ser Asn Ala Lys Asn Tyr Arg
100 105 110

10

ES 2 631 554 T3

Arg Glu Gln Asp Val Pro Leu Ile Val Pro Val Val Asn Pro Glu His
 115 120 125
 Leu Asp Ile Val Ala Gln Lys Leu Asp Thr Ala Lys Ala Gln Gly Lys
 130 135 140
 Pro Arg Pro Gly Phe Ile Ile Cys Ile Ser Asn Cys Ser Thr Ala Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Leu Lys Pro Leu Ile Glu Lys Phe Gly Pro Ile Asp
 165 170 175
 Ala Leu Thr Thr Thr Thr Leu Gln Ala Ile Ser Gly Ala Gly Phe Ser
 180 185 190
 Pro Gly Val Pro Gly Ile Asp Ile Leu Asp Asn Ile Ile Pro Tyr Ile
 195 200 205
 Gly Gly Glu Glu Asp Lys Met Glu Trp Glu Thr Lys Lys Ile Leu Ala
 210 215 220
 Pro Leu Ala Glu Asp Lys Thr His Val Lys Leu Leu Thr Pro Glu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Val Ser Ala Gln Cys Asn Arg Val Ala Val Ser Asp Gly His
 245 250 255
 Thr Glu Cys Ile Ser Leu Arg Phe Lys Asn Arg Pro Ala Pro Ser Val
 260 265 270
 Glu Gln Val Lys Thr Cys Leu Lys Glu Tyr Val Cys Asp Ala Tyr Lys
 275 280 285
 Leu Gly Cys His Ser Ala Pro Lys Gln Thr Ile His Val Leu Glu Gln
 290 295 300
 Pro Asp Arg Pro Gln Pro Arg Leu Asp Arg Asn Arg Asp Ser Gly Tyr
 305 310 315 320
 Gly Val Ser Val Gly Arg Ile Arg Glu Asp Pro Leu Leu Asp Phe Lys
 325 330 335
 Met Val Val Leu Ser His Asn Thr Ile Ile Gly Ala Ala Gly Ser Gly
 340 345 350
 Val Leu Ile Ala Glu Ile Leu Leu Ala Arg Asn Leu Ile
 355 360 365

<210> 100
 <211> 36
 <212> ADN

ES 2 631 554 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación

5 <400> 100
tataatcccg ggatgcgcggt taacaatggt ttgacc 36

10 <210> 101
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador para la amplificación

<400> 101
tataattcta gattacagtt tcggaccagc cg 32

20 <210> 102
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador para la amplificación

<400> 102
gaagggtgcg cctacactaa gcatagttgt tgatgagtgt aggctggagc tgcttc 56

30 <210> 103
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador para la amplificación

<400> 103
ttaaaccagt tcgttcgggc aggttcgcc ttttcatgg gaattagcca tggctc 56

40 <210> 104
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Cebador para la amplificación

50 <400> 104
atggctgta ctaatgctgc tgaactaac gcactcgtag agcgtgtgta ggctggagct 60
gcttc 65

55 <210> 105
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Cebador para la amplificación

<400> 105
ttaagcggat ttttctgctt ttttctcagc tttagccgga gcagccatat gaatattctc 60
cttag 65

ES 2 631 554 T3

<210> 106
 <211> 65
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 10 <400> 106

atgtcgagta agttagtact ggttctgaac tgcgtagtt cttcagtga ggctggagct 60
gcttc 65

 <210> 107
 15 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 107

tcaggcagtc agggcgctcg cgtcttgccg gataaccagt tcttccatat gaatatactc 60
cttag 65

 25 <210> 108
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 108
 35
ttactccgta tttgcataaa aaccatgcga gttacgggcc tataagtga ggctggagct 60
gcttc 65

 <210> 109
 40 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 45
 <400> 109

atagattgag tgaaggtacg agtaataacg tcttctgct gttctcatat gaatatactc 60
cttag 65

 50 <210> 110
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 110

ES 2 631 554 T3

	gtgtcccgta ttattatgct gatccctacc ggaaccagcg tcggtgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
5	<210> 111 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para la amplificación	
	<400> 111	
	ttactgctgc tgtgcagact gaatcgcagt cagcgcgatg gtgtacatat gaatadcctc	60
15	cttag	65
20	<210> 112 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador para la amplificación	
	<400> 112	
	atgaaacaaa cggttgcagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcgggtgta ggctggagct	60
30	gcttc	65
35	<210> 113 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para la amplificación	
	<400> 113	
	ttaccttagc cagtttgttt tcgccagttc gatcacttca tcacccatat gaatadcctc	60
40	cttag	65
45	<210> 114 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para la amplificación	
	<400> 114	
	atgaccatta ctccggcaac tcatgcaatt tcgataaatc ctgccgtgta ggctggagct	60
50	gcttc	65
55	<210> 115 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 631 554 T3

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 115
 5 **tcagatccgg tctttccaca ccgctctggat attacagaat tcgtgcatat gaatcctc** 60
 cttag 65

 <210> 116
 <211> 65
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 15 <400> 116

 atgaaactta acgacagtaa cttattccgc cagcaggcgt tgattgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

 20 <210> 117
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 117

 ttaaagaccg atgcacatat atttgatttc taagtaatct tcgatcatat gaatcctc 60
 30 **cttag** 65

 <210> 118
 <211> 65
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 40 <400> 118

 atggaccaga agctgttaac ggatttccgc tcagaactac tcgatgtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

 <210> 119
 <211> 65
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 50 <400> 119

 tcaggtgtgt ttaaagctgt tctgctgggc aataccctgc agtttcatat gaatcctc 60
 cttag 65
 55 <210> 120

ES 2 631 554 T3

<211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 120

atggataaga agcaagtaac ggatttaagg tcggaactac tcgatgtgta ggctggagct 60

10 **gcttc** 65

<210> 121
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

20 <400> 121

tcaggtatgt ttaaagctgt tctgttgggc aataccctgc agtttcatat gaatadcctc 60

cttag 65

<210> 122
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

30 <400> 122

atggctacat cagtacagac aggtaaagct aagcagctca cattagtgta ggctggagct 60

gcttc 65

35 <210> 123
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 123

45 **ttagtgtttc ttgtcattca tcacaatata gtgtggtgaa cgtgccatat gaatadcctc** 60

cttag 65

<210> 124
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

55 <400> 124

ES 2 631 554 T3

	atggaaccaa aaacaaaaaa acagcgttcg ctttatatcc cttacgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
5	<210> 125 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 125	
	ttagatggag gtacggcggg agtcgcggtta ttcggcttgc cagaacatat gaatattcctc	60
	cttag	65
15	<210> 126 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 126	
25	atggatgacc agttaaaca aagtcgactt gatttccatg aatttgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
30	<210> 127 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 127	
	ttacagcggg tgggtttgcg cttctaccac ggccagcggc accatcatat gaatattcctc	60
	cttag	65
40	<210> 128 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 128	
50	atgaacgaac aatattccgc attgcgtagt aatgtagta tgctcgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
55	<210> 129 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para la amplificación	

ES 2 631 554 T3

	<400> 129		
	ttagccggta ttacgcatac ctgccgcaat cccggcaata gtagccatat gaatatacctc	60	
5	cttag	65	
	<210> 130		
	<211> 65		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 130		
15	atgtccagaa ggcttcgcag aacaaaaatc gttaccacgt taggcgtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
	<210> 131		
	<211> 65		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
25	<400> 131		
	ttactctacc gttaaaatac gcgtggtatt agtagaaccc acggtcatat gaatatacctc	60	
	cttag	65	
30	<210> 132		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 132		
	atgaaaaaga ccaaaattgt ttgcaccatc ggaccgaaaa ccgaagtgta ggctggagct	60	
40	gcttc	65	
	<210> 133		
	<211> 65		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
50	<400> 133		
	ttacaggacg tgaacagatg cgggttagt agtgccgctc ggtaccatat gaatatacctc	60	
	cttag	65	
	<210> 134		
55	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 631 554 T3

	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
5	<400> 134		
	atggaactga cgactcgcac ttacctgcg cggaaacata ttgcggtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
10	<210> 135		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 135		
	ttacttcaga cgggccgga gataacgctg ataatcgggg atcagcatat gaatcctc	60	
20	cttag	65	
	<210> 136		
	<211> 65		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
30	<400> 136		
	atggtcgcac ccattcccgc gaaacgcggc agaaaaccg ccgttgtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
	<210> 137		
35	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
40	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 137		
	tcagcgcatt ccaccgtacg ccagcgtcac ttccttcgcc gcttcatat gaatcctc	60	
45	cttag	65	
	<210> 138		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 138		
55	atggaagta aagtagttgt tccggcaca ggcaagaaga tcaccgtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	

ES 2 631 554 T3

<210> 139
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 <400> 139
 10 **ttacatgttt tcgatgatcg cgtcaccaaa ctctgaacat ttcagcatat gaatcctc** **60**
 cttag **65**
 <210> 140
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 20
 <400> 140
 atgcagaaca gcgctttgaa agcctggttg gactcttctt acctcgtgta ggctggagct **60**
 gcttc **65**
 <210> 141
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 30
 <400> 141
 ttattcgacg ttcagcgcgt cattaaccag atcttgttgc tgtttcatat gaatcctc **60**
 35 **cttag** **65**
 <210> 142
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 45
 <400> 142
 atgagtagcg tagatattct ggtccctgac ctgcctgaat ccgtagtgta ggctggagct **60**
 gcttc **65**
 <210> 143
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 55
 <400> 143

ES 2 631 554 T3

	ctacacgtcc agcagcagac gcgtcggatc ttccagcaac tctttcatat gaatadcctc	60
	cttag	65
5	<210> 144 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 144	
	gtgcaaacct ttcaagccga tcttgccatt gtaggcgccg gtggcgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
15	<210> 145 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 145	
	tcagccattc gccttctcct tcttattggc tgcttccgcc ttatccatat gaatadcctc	60
25	cttag	65
30	<210> 146 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 146	
	atggctgaga tgaaaaacct gaaaattgag gtggcgcgct ataacgtgta ggctggagct	60
	gcttc	65
40	<210> 147 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador para la amplificación <400> 147	
	ttagcgtggt ttcagggctc cgataagaaa gtctttcgaa cttccatat gaatadcctc	60
50	cttag	65
55	<210> 148 <211> 65 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para la amplificación	

ES 2 631 554 T3

	<400> 148		
	atgacgacta aacgtaaacc gtatgtacgg ccaatgacgt ccaccgtgta ggctggagct	60	
5	gcttc	65	
	<210> 149		
	<211> 65		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 149		
15	ttaccagtac agggcaacaa acaggattac gatggtggca accaccatat gaatatactc	60	
	cttag	65	
	<210> 150		
	<211> 65		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 150		
	atgattaatc caaatcaaaa gcgttctgac gaaccggtat tctgggtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
30	<210> 151		
	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
	<400> 151		
	ttagattgta acgacaccaa tcagcgtgac aactgtcagg atagccatat gaatatactc	60	
40	cttag	65	
	<210> 152		
	<211> 65		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador para la amplificación		
50	<400> 152		
	atgtttaaga atgcatttgc taacctgcaa aaggctcggtgta aatcggtgta ggctggagct	60	
	gcttc	65	
	<210> 153		
55	<211> 65		
	<212> ADN		

ES 2 631 554 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para la amplificación

5 <400> 153

ttagtgggta cggatgtact catccatctc ggttttcagg ttatccatat gaatcctc 60

cttag 65

10 <210> 154
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador para la amplificación

<400> 154

atgatttcag gcatttttagc atccccgggt atcgctttcg gtaaagtga ggctggagct 60

20 **gcttc 65**

<210> 155
<211> 65
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para la amplificación

30 <400> 155

ttagcagatt gttttttctt caatgaactt gttaaccagc gtcacatata gaatcctc 60

cttag 65

<210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador para la amplificación

<400> 156
cggcgcctg aatgaactgc 20

45 <210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador para la amplificación

<400> 157
cagtcatagc cgaatagcct 20

55 <210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 158
 5 atacgtgtcc cgagcggtag 20

 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 159
 15 tacacatccc gccatcagca 20

 <210> 160
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 160
 gaagtaaacg ggaaaatcaa 20

 <210> 161
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 161
 agaagtggca taagaaaacg 20

 <210> 162
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 162
 50 ccattggctg aaaattacgc 20

 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 163
 60 gttccattgc acggatcacg 20

 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 164
 5 atgccgtaga agccgccagt 20

 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 165
 15 tgttggtgcg cagctcgaag 20

 <210> 166
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 166
 gcaaactctgg ttcatcaac 20

 <210> 167
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 167
 tcccttgcac aaaacaaagt 20

 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 168
 50 ggatttggtt ctcgcataat 20

 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 169
 60 agcattaacg gtagggtcgt 20

 <210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 170
 5 gctgattctc gcgaataaac 20

 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 171
 15 aaaaacgttc ttgcgcgtct 20

 <210> 172
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 172
 tctgtttgtc accacccgc 20

 <210> 173
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 35
 <400> 173
 aagccagcac ctggaagcag 20

 <210> 174
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 174
 50 aagagctgcc gcaggaggat 20

 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 175
 60 gccgccctct taagtcaat 20

 <210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 176
 5 ggatttagc aatattcgct 20

 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 177
 15 cctaatagca ggaagaagac 20

 <210> 178
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 178
 gctgaactgt tgctgaaga 20

 <210> 179
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 35
 <400> 179
 ggcgtgcttt tacaactaca 20

 <210> 180
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 45
 <400> 180
 tagtaaataa cccaaccggc 20
 50
 <210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 181
 60 tcagtgagcg cagtgttta 20

 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 182
 5 attaatggtg agagtttga 20

 <210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 183
 15 tgctttttt tattattcgc 20

 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 184
 25 gctttataaa agacgacgaa 20

 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 185
 35 gtaacgacaa ttccttaagg 20

 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 186
 45 tttatatgcc catggttct 20

 <210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 187
 55 atctgttaga ggcggatgat 20

 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 188
 5 ctggaacgtt aaatcttga 20

 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 189
 15 ccagtttagt agcttcatt 20

 <210> 190
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 190
 gatttgtca acattaactc atcgg 25

 <210> 191
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 191
 tgcgattaac agacaccctt 20

 <210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 192
 50 ttcaggtgc tcacagaaca 20

 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 193
 60 tatggaagag gcgctactgc 20

 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

5 <400> 194
 cgacctgctg cataaacacc 20

<210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

15 <400> 195
 tgaacgctaa ggtgattgca 20

<210> 196
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

25 <400> 196
 acgtagacaa gagctcgcaa 20

<210> 197
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

35 <400> 197
 catcacgtac gactgcgtcg 20

<210> 198
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 198
 45 tgcaacttg tgctgagca 19

50 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

<400> 199
 55 tatcgctcc ggcattgctc 20

<210> 200
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 200
 5 aaatcgatct cgtcaaattt cagac 25

 <210> 201
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 201
 15 aggaaccaca aatcgccata 20

 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 202
 gacgtgaaga ttactagct 20

 <210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 35
 <400> 203
 agttcaatgc tgaaccacac 20

 <210> 204
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 45
 <400> 204
 tagccgcgac cacgtaaga aggag 25
 50
 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 205
 60 cagcgcatca cccgaaaca 20

 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 206
 5 atcgtgatca ttaacctgat 20

 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 207
 15 ttacctgat aaattaccgc 20

 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 208
 25 ccatccgttg aatgagttt 20

 <210> 209
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 209
 35 tgggtgtaac tggcaaatc 20

 <210> 210
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 210
 45 gtgactcca acggcaaaag 20

 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 211
 55 ccggtggttt gatagcaata 20

 <210> 212
 <211> 36
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 65

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 212
 5 tataatcccg ggatgcgctg taacaatggt ttgacc 36

 <210> 213
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 213
 15 tataattcta gattacagtt tcggaccagc cg 32

 <210> 214
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 25
 <400> 214
 tataatcccg ggatgaacga acaatattcc 30

 <210> 215
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación
 35
 <400> 215
 tataattcta gattagccgg tattacgcat 30

 <210> 216
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 216
 50 tataatcccg ggatgtccag aaggcttcgc agaaca 36

 <210> 217
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 217
 60 tataattcta gattactcta ccgtaaataat ac 32

 <210> 218
 <211> 36
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 218
 5 tataatccc ggatgaaaac ccgtacacaa caaatt 36

 <210> 219
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 219
 15 tataattcta gattagaact gcgattcttc ag 32

 <210> 220
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 220
 25 tataatccc ggatgaaaaa actactcgtc gccaat 36

 <210> 221
 <211> 32
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 221
 35 tataattcta gattaattaa ttctgattaa ca 32

 <210> 222
 <211> 40
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 222
 45 tataatccc ggatgcctga cgctaaaaa caggggcggt 40

 <210> 223
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para la amplificación

 <400> 223
 55 tataattcta gattaatcgt gagcgctat ttc 33

 <210> 224
 <211> 1083
 <212> ADN
 65 <213> Metallosphaera sedula

ES 2 631 554 T3

<400> 224

atgaaagctg	cagtacttca	tacgtataag	gaaccgctgt	ccattgagga	cgtgaatatac	60
tcccaaccta	aggctgggga	agtcaagatc	aagggtcaagg	caaccggtct	ctgtcgcctcc	120
gacgtcaatg	tctttgaggg	gaaaacccca	gttcctcccc	cagtggttgc	tggacacgaa	180
atatcagggga	ttgtggagga	agtgggacct	ggggtgacca	gggttaaacc	aggatgatagg	240
gtgatttcag	cgtttattca	cccctgtggt	aaatgcggtg	actgctgttc	aggaaaggag	300
aatctgtgtg	agaccttctc	ccaggtcaga	ctcaaggag	taatgccaga	tggaacgtca	360
aggctgtcaa	aggacggaaa	ggagataagg	actttccttg	gaggcggttt	cgcgaggtac	420
gccattgtgg	gagagaacgc	gctaaccagg	gttcagaggg	acatggacct	agagaaggta	480
gctgtcctag	gttgtgctgg	gttaacaggg	tacggtgcca	tatcatcatc	caagattgag	540
cctggagaca	ctgtggccgt	gataggcgta	ggaggagtgg	gtttgtccac	aatacaactc	600
ctaagggcct	cgggtgccgg	gaggataatc	gccgtgggaa	cgaaaaagtg	gaaacttgac	660
agggccatgg	agctaggtgc	aactgacgtg	gtaaactcga	aggagataga	tcccgtcaaa	720
gcaataaagg	agatcacggg	tggagggcca	cagggtggtga	tagaggctgg	aggaaatgag	780
gatacgattc	atatggcgct	ggattcagtt	agaattggag	gaaaggtggt	tctggtaggg	840
ttacctccag	caacggccat	gataccatc	agggtagcgt	caatagttag	gggaggcata	900
gaggttgtgg	ggaattacgg	aggaagacct	agggttgata	tgcccaagct	tctcgagcta	960
gtgaggcagg	gaagatacga	tccgtctagg	cttgtgacgg	gtagattcag	gttggaggaa	1020
ataaatgagg	cagtcaaaaat	gcttgaggaa	ggagaggcca	taagaagtct	cataatcccg	1080
taa						1083

- 5 <210> 225
- <211> 360
- <212> PRT
- <213> Metallosphaera sedula

10 <400> 225

ES 2 631 554 T3

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

Ala Ile Lys Glu Ile Thr Gly Gly Gly Pro Gln Val Val Ile Glu Ala
 245 250 255

Gly Gly Asn Glu Asp Thr Ile His Met Ala Leu Asp Ser Val Arg Ile
 260 265 270

Gly Gly Lys Val Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Met Ile
 275 280 285

Pro Ile Arg Val Ala Ser Ile Val Arg Gly Gly Ile Glu Val Val Gly
 290 295 300

Asn Tyr Gly Gly Arg Pro Arg Val Asp Met Pro Lys Leu Leu Glu Leu
 305 310 315 320

Val Arg Gln Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Arg Leu Val Thr Gly Arg Phe
 325 330 335

Arg Leu Glu Glu Ile Asn Glu Ala Val Lys Met Leu Glu Glu Gly Glu
 340 345 350

Ala Ile Arg Ser Leu Ile Ile Pro
 355 360

<210> 226
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Metallosphaera sedula

<400> 226

atgaaagctg cagtacttca tacgtataag gaaccgctgt ccattgagga cgtgaatadc 60
 tcccaacctg aggctgggga agtcaagatc aagggtcaagg caaccgggct ctgtcactcc 120
 gacgtacatg tctttgaggg gaaaacccca gttcctcccc cagtggttgc tggacacgaa 180
 atatcagggg ttgtggagga agtgggacct ggggtgacca ggggttaaacc aggtgatagg 240
 gtgatttcag cgtttattca cccctgtggt aatgctggtg actgctgtgc aggaaaggag 300
 aatctgtgtg agaccttctc ccaggtcaga ctcaaggagg taatgccaga tggaacgtca 360
 aggctgtcaa aggacggaaa ggagataagg actttccttg gaggcggttt cgcgaggtac 420
 gccattgtgg gagagaacgc gctaaccagg gttccagagg acatggacct agagaaggta 480
 gctgtcctag gttgtgctgg gttaacaggg tacggtgcca tatcatcatc caagattgag 540
 cctggagaca ctgtggccgt gataggcgta ggaggagtgg gtttgtccac aatacaactc 600
 ctaaggcctc cgggtgccgg gaggataatc gccgtgggaa cgaaaaagtg gaaacttgac 660
 agggccatgg agctaggtgc aactgacgtg gtaaacctga aggagataga tcccgtcaaa 720
 gcaataaagg agatcacggg tggagggcca cagggtggtg tagaggctgg aggaaatgag 780
 gatacgattc atatggcgct ggattcagtt agaattggag gaaagggtgt tctggtaggg 840
 ttacctccag caacggccat gataccatc agggtagcgt caatagttag gggaggcata 900

10

ES 2 631 554 T3

gaggttgagg ggaattacgg aggaagacct aggggtgata tgcccaagct tctcgagcta 960
 gtgaggcagg gaagatacga tccgtctagg cttgtgacgg gtagattcag gttggaggaa 1020
 ataaatgagg cagtcaaat gcttgaggaa ggagaggcca taagaagtct cataatcccg 1080
 taa 1083

<210> 227
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Metallosphaera sedula
 <400> 227

5

Met Lys Ala Ala Val Leu His Thr Tyr Lys Glu Pro Leu Ser Ile Glu
 1 5 10 15

Asp Val Asn Ile Ser Gln Pro Lys Ala Gly Glu Val Lys Ile Lys Val
 20 25 30

Lys Ala Thr Gly Leu Cys His Ser Asp Val His Val Phe Glu Gly Lys
 35 40 45

Thr Pro Val Pro Pro Pro Val Val Ala Gly His Glu Ile Ser Gly Ile
 50 55 60

Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr Arg Val Lys Pro Gly Asp Arg
 65 70 75 80

Val Ile Ser Ala Phe Ile His Pro Cys Gly Lys Cys Gly Asn Cys Val
 85 90 95

Ala Gly Lys Glu Asn Leu Cys Glu Thr Phe Ser Gln Val Arg Leu Lys
 100 105 110

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

Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Gly Phe Ala Glu Tyr Ala Ile Val Gly
 130 135 140

Glu Asn Ala Leu Thr Arg Val Pro Glu Asp Met Asp Leu Glu Lys Val
 145 150 155 160

Ala Val Leu Gly Cys Ala Gly Leu Thr Gly Tyr Gly Ala Ile Ser Ser
 165 170 175

Ser Lys Ile Glu Pro Gly Asp Thr Val Ala Val Ile Gly Val Gly Gly
 180 185 190

Val Gly Leu Ser Thr Ile Gln Leu Leu Arg Ala Ser Gly Ala Gly Arg
 195 200 205

10

ES 2 631 554 T3

Ile Ile Ala Val Gly Thr Lys Lys Trp Lys Leu Asp Arg Ala Met Glu
 210 215 220
 Leu Gly Ala Thr Asp Val Val Asn Ser Lys Glu Ile Asp Pro Val Lys
 225 230 235 240
 Ala Ile Lys Glu Ile Thr Gly Gly Gly Pro Gln Val Val Ile Glu Ala
 245 250 255
 Gly Gly Asn Glu Asp Thr Ile His Met Ala Leu Asp Ser Val Arg Ile
 260 265 270
 Gly Gly Lys Val Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Ala Thr Ala Met Ile
 275 280 285
 Pro Ile Arg Val Ala Ser Ile Val Arg Gly Gly Ile Glu Val Val Gly
 290 295 300
 Asn Tyr Gly Gly Arg Pro Arg Val Asp Met Pro Lys Leu Leu Glu Leu
 305 310 315 320
 Val Arg Gln Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Arg Leu Val Thr Gly Arg Phe
 325 330 335
 Arg Leu Glu Glu Ile Asn Glu Ala Val Lys Met Leu Glu Glu Gly Glu
 340 345 350
 Ala Ile Arg Ser Leu Ile Ile Pro
 355 360

<210> 228
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de codones optimizados de M. sedula

<400> 228

atgaaagcag cagttctgca tacctataaa gaaccgctga gcattgaaga tgtgaatatt	60
tcacagccga aagccggtga agtgaaaatc aaagttaaag caaccggtct gtgtcgtagt	120
gatgttcattg tttttgaagg taaaacaccg gttccgcctc cggttggtgc aggtcatgaa	180
attagcggta ttgttgaaga ggttggtccg ggtgttaccg gtgttaaacc gggatgatcgt	240
gttattagcg catttattca tccgtgtggt aaatgcggta attgtgttgc cggtaaagaa	300
aatctgtgtg aaacctttag ccaggttcgt ctgaaaggtg ttatgccgga tggcaccagc	360
cgtctgagca aagatggcaa agaaattcgt acctttctgg gtggtggttt tgcagaatat	420
gcaattgttg gtgaaaatgc actgaccctg gttccggaag atatggatct ggaaaaagtt	480
gcagttctgg gttgtgccgg tctgaccggt tatggtgcaa ttagcagcag caaaattgaa	540

ES 2 631 554 T3

cctggtgata ccgttgcagt tattggtggt ggtggtgtgg gtctgagcac cattcagctg 600
 ctgctgcaaa gcggtgcagg tcgtattatt gcagttggca ccaaaaaatg gaaactggat 660
 cgtgcaatgg aactgggtgc aaccgatggt gttaacagta aagaaattga tccggtgaaa 720
 gccatcaaag aaatcaccgg tgggtggtccg caggttggtta ttgaagccgg tggtaatgaa 780
 gataccattc acatggcact ggatagcgtt cgtattggtg gtaaagttgt tctggttgggt 840
 ctgcctccgg caaccgcaat gattccgatt cgtgttgcaa gcattgttcg tgggtggtatt 900
 gaagttgttg gtaattatgg tggtcgtccg cgtgttgata tgccgaaact gctggaactg 960
 gttcgtcagg gtcgttatga tccgagccgt ctggttaccg gtcgttttcg tctggaagaa 1020
 attaatgaag ccgtcaaaat gctggaagaa ggtgaagcaa ttcgtagcct gattattccg 1080
 taa 1083

<210> 229

<211> 4107

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> gen quimérico para la expresión de malato cinasa, malato semialdehído deshidrogenasa y DHB deshidrogenasa

<400> 229

ttgacaatta atcatcggct cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 60
 caggaaacag aattcgagct cggtaaccgg ggatcctcta gaaataattt tgtttaactt 120
 taagaaggag atataccatg ggcagcagcc atcatcatca tcatcacagc agcggcctgg 180
 tgccgcgcgg cagccatatg tctgaaattg ttgtctcaa atttggcgggt accagcgtag 240
 ctgattttga cgccatgaac cgcagcgtg atattgtgct ttctgatgcc aacgtgcgtt 300
 tagttgtcct ctcggcttct gctggtatca ctaatctgct ggtcgcttta gctgaaggac 360
 tggaacctgg cgagcgattc gaaaaactcg acgctatccg caacatccag tttgccattc 420
 tggaacgtct gcgttaccgg aacgttatcc gtgaagagat tgaacgtctg ctggagaaca 480
 ttactgttct ggcagaagcg gcggcgtgg caacgtctcc ggcgctgaca gatgagctgg 540
 tcagccatgg cggcctgatg tcgaccctgc tgtttgttga gatcctgcgc gaacgcgatg 600
 ttcaggcaca gtggtttgat gtacgtaaag tgatgcgtac caacgaccga tttggtcgtg 660
 cagagccaga tatagccgcg ctggcggaac tggccgcgct gcagctgctc ccacgtctca 720
 atgaaggctt agtgatcacc cagggattta tcggtagcga aaataaaggc cgtacaacga 780
 cgcttgccg tggaggcagc gattatacgg cagccttgct ggcggaggct ttacacgcat 840
 ctcgtgttga tatctggacc gacgtcccgg gcatctacac caccgatcca cgcgtagttt 900
 ccgcagcaaa acgcattgat gaaatcgcgt ttgccgaagc ggcaaagat gccacttttg 960
 gtgcaaaagt actgcatccg gcaacgttgc taccgcagc acgcagcgt atcccggctt 1020
 ttgtcggctc cagcaaagac ccacgcgcag gtggtacgct ggtgtgcaat aaaactgaaa 1080
 atccgccgct gttccgcgct ctggcgttc gtcgcaatca gactctgctc actttgcaca 1140

ES 2 631 554 T3

gcctgaatat gctgcattct cgcggtttcc tcgcggaagt ttcggcatc ctcgcgcggc 1200
 ataatatttc ggtagactta atcaccacgt cagaagtgag cgtggcatta acccttgata 1260
 ccaccggttc aacctccact ggcgatacgt tgctgacgca atctctgctg atggagcttt 1320
 ccgcactgtg tcgggtggag gtggaagaag gtctggcgtt ggtcgcgctt attggcaatg 1380
 acctgtcaaa agcctgcggc gttggcaaag aggtattcgg cgtactggaa ccgttcaaca 1440
 ttcgcatgat ttgttatggc gcatccagcc ataacctgtg cttcctggtg cccggcgaag 1500
 atgccgagca ggtggtgcaa aaactgcata gtaatttgtt tgagtaaata ctggatccgt 1560
 ttaactttaa gaaggagata taccatgggc agcagccatc atcatcatca tcacagcagc 1620
 ggcttgggtc cgcgcggcag ccatatggct agcatgaaaa atgttggttt tatcggctgg 1680
 cgcggtatgg tcggctccgt tctcatgcaa cgcattggtt aagagcgcga cttcgacgcc 1740
 attcgccttg tcttcttttc tacttctcag cttggccagg ctgcgccgtc ttttggcggg 1800
 accactggca cacttcagga tgctttgat ctggaggcgc taaaggccct cgatatcatt 1860
 gtgacctgtc agggcggcga ttataccaac gaaatctatc caaagcttcg tgaaagcggg 1920
 tggcaagggt actggattga cgcagcatcg tctctgcgca tgaaagatga cgccatcatc 1980
 attcttgacc ccgtcaatca ggacgtcatt accgacggat taaataatgg catcaggact 2040
 tttgttggcg gtaactgtac cgtaagcctg atgttgatgt cgttgggtgg tttattcgcc 2100
 aatgatcttg ttgattgggt gtccgttgcg acctaccagg ccgcttccgg cgggtgtgcg 2160
 cgacatatgc gtgagttatt aaccagatg ggccatctgt atggccatgt ggcagatgaa 2220
 ctcgcgacct cgtcctctgc tattctcgat atcgaacgca aagtcacaac cttaacccgt 2280
 agcggtgagc tgccggtgga taactttggc gtgccgctgg cgggtagcct gattccgtgg 2340
 atcgacaac agctcgataa cggtcagagt cgacaggagt ggaaagggca ggcggaaacc 2400
 aacaagatcc tcaacacatc ttccgtaatt ccggtagatg gtttatgtgt gcgtgtcggg 2460
 gcattgcgct gccacagcca ggcattcact attaaattga aaaaagatgt gtctattccg 2520
 accgtggaag aactgctggc tgcgcacaat ccgtggcga aagtcgttcc gaacgatcgg 2580
 gaaatcacta tgcgtgagct aacccagct gccgttaccg gcacgctgac cacgccggtg 2640
 ggccgcctgc gtaagctgaa tatgggacca gagttcctgt cagcctttac cgtgggcgac 2700
 cagctgctgt ggggggcccgc ggagccgctg cgtcggatgc ttcgtcaact ggcgtaagaa 2760
 ttcgagctcc gtcgacaagc ttgcggcccgc gtttaacttt aagaaggaga tataccatgg 2820
 gcagcagcca tcatcatcat catcacagca gcggcctggt gccgcgcggc agccatatgg 2880
 ctagcatgaa agcagcagtt ctgcatacct ataaagaacc gctgagcatt gaagatgtga 2940
 atatttcaca gccgaaagcc ggtgaagtga aatcaaagt taaagcaacc ggtctgtgtc 3000
 gtagtgatgt tcatgttttt gaaggtaaaa caccggttcc gcctccggtt gttgcaggtc 3060
 atgaaattag cggatttgtt gaagaggttg gtccgggtgt taccctgtgt aaaccgggtg 3120
 atcgtgttat tagcgcattt attcatccgt gtggtaaatg cggtaattgt gttgccggta 3180

ES 2 631 554 T3

aagaaaatct gtgtgaaacc tttagccagg ttcgtctgaa aggtgttatg ccggatggca 3240
 ccagccgtct gagcaaagat ggcaaagaaa ttcgtacctt tctgggtggt ggTTTTgcag 3300
 aatatgcaat tgttggtgaa aatgcaactga cccgtgttcc ggaagatatg gatctggaaa 3360
 aagttgcagt tctgggttgt gccggtctga ccggttatgg tgcaattagc agcagcaaaa 3420
 ttgaacctgg tgataccggt gcagttattg gtgttggtgg tgtgggtctg agcaccattc 3480
 agctgctgcg tgcaagcggg gcaggtcgta ttattgcagt tggcaccaaa aaatggaaac 3540
 tggatcgtgc aatggaactg ggtgcaaccg atgttgtaa cagtaaagaa attgatccgg 3600
 tgaaagccat caaagaaatc accggtgggt gtccgcaggt tgttattgaa gccggtggta 3660
 atgaagatac cattcacatg gcaactggata gcgttcgtat tggtggtaaa gttgttctgg 3720
 ttggtctgcc tccggcaacc gcaatgattc cgattcgtgt tgcaagcatt gttcgtgggtg 3780
 gtattgaagt tgttggtaat tatggtggtc gtccgcgtgt tgatatgccg aaactgctgg 3840
 aactggttcg tcagggctgt tatgatccga gccgtctggt taccggctgt tttcgtctgg 3900
 aagaaattaa tgaagccgtc aaaatgctgg aagaaggta agcaattcgt agcctgatta 3960
 ttccgtaagc tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga 4020
 aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc cttgggggcc 4080
 tctaaacggg tcttgagggg ttttttg 4107

<210> 230
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<400> 230

atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggctg cgccgtcttt tggcggaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgcgcatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggtg actgtaacgt gtccctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttggtg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tggcgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc gcgaccccgt cctctgctat tctcgatata 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aacccttagc ggtgagctgc cggtgataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtacgctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagtcca 720
 caggagtgga aagggcaggc ggaaaccaac aagatcctca acacatcttc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgtcggggca ttgcgctgcc acagccaggc attcactatt 840

10

ES 2 631 554 T3

aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccggtaggc cgcttgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag cctttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

<210> 231
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 231

Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
 1 5 10 15

Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
 20 25 30

Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
 35 40 45

Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys
 50 55 60

Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu
 65 70 75 80

Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp
 85 90 95

Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp
 100 105 110

Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg
 115 120 125

Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Asn Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu
 130 135 140

Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr
 145 150 155 160

Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu
 165 170 175

Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr
 180 185 190

Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr
 195 200 205

10

ES 2 631 554 T3

Arg Ser Gly Glu Leu Pro Val Asp Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg
 225 230 235 240
 Gln Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser
 245 250 255
 Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg
 260 265 270
 Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile
 275 280 285
 Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300
 Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335
 Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350
 Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción del ácido 2,4-dihidroxi-butírico (2,4-DHB), que comprende:

- 5 - una primera etapa de transformar el malato en 4-fosfo-malato utilizando una malato cinasa, en el que la malato cinasa se obtiene mediante por lo menos una mutación de una aspartato cinasa, mejorando dicha(s) mutación(ones) la actividad y/o la afinidad por el sustrato del polipéptido mutado por el malato cuando se compara con los enzimas de tipo salvaje, la aspartato cinasa mutada comprende por lo menos una mutación cuando se compara con el enzima de tipo salvaje, en una de las posiciones siguientes: S39, T45, V115, E119, F184 y/o S201, refiriéndose dichas posiciones a la SEC ID nº 4, en el que el aminoácido natural en dicha(s) posición(ones) es sustituido por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, y preferentemente, la aspartato cinasa mutada comprende adicionalmente por lo menos una mutación en los aminoácidos siguientes: E250, M318, S321, V339, S338, F324, L325, S345, E346, D340, T344 y/o T352, refiriéndose dichas posiciones a la SEC ID nº 4 y en el que cada uno de dichos aminoácidos es sustituido por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, todavía más preferentemente la malato cinasa consiste en la SEC ID nº 9, SEC ID nº 12, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, SEC ID nº 18, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24, SEC ID nº 26, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43 o SEC ID nº 45.
- 10
- 15
- 20
- 25 - una segunda etapa de transformar 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído utilizando una malato semialdehído deshidrogenasa, en el que la malato semialdehído deshidrogenasa se obtiene mediante por lo menos una mutación de una aspartato semialdehído deshidrogenasa, mejorando dicha(s) mutación(ones) la actividad y/o la afinidad por el sustrato del polipéptido mutado por el 4-fosfo-malato cuando se compara con los enzimas de tipo salvaje, la aspartato semialdehído deshidrogenasa mutada comprende por lo menos una mutación cuando se compara con el enzima de tipo salvaje, en una de las posiciones siguientes: T136, Q162, I230, E241 y/o H274, refiriéndose dichas posiciones a la SEC ID nº 20, en el que el aminoácido natural en dichas posiciones se sustituye por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, y más preferentemente la aspartato semialdehído deshidrogenasa mutada consiste en SEC ID nº 68, y más específicamente SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64 o SEC ID nº 66 o SEC ID nº 231
- 30
- 35
- 40 - una tercera etapa de transformar malato-4-semialdehído en 2,4-DHB utilizando una DHB deshidrogenasa seleccionada de entre semialdehído succínico reductasa que comprende por lo menos una mutación cuando se compara con el enzima de tipo salvaje, mejorando dicha(s) mutación(ones) la actividad y/o la afinidad por el sustrato del enzima mutado por el malato-4-semialdehído cuando se compara con los enzimas de tipo salvaje, en una de las posiciones siguientes: S40, N43, H39, T49, F85, Q108, L281 y/o N305, refiriéndose las posiciones a la SEC ID nº 76, en el que el aminoácido natural en dichas posiciones se ha sustituido por cualquiera de los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, todavía más particularmente dicho enzima consiste en SEC ID nº 74, SEC ID nº 76 o SEC ID nº 81, SEC ID nº 225 o SEC ID nº 227.
- 45
- 50
2. Malato cinasa caracterizada por que transforma el malato en 4-fosfo-malato y consiste en SEC ID nº 12, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, SEC ID nº 18, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24 o SEC ID nº 26.
3. Malato cinasa según la reivindicación 2 insensible a la inhibición por lisina que comprende además por lo menos una mutación en los aminoácidos siguientes: E250, M318, S321, V339, S338, F324, L325, S345, E346, D340, T344 y/o T352, refiriéndose dichas posiciones a la SEC ID nº 4 y en la que cada uno de dichos aminoácidos se ha sustituido por cualquiera de entre los otros 19 aminoácidos proteinógenos que existen de manera natural, es decir, por alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, más preferentemente la malato cinasa está representada por SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43 o SEC ID nº 45.
- 55
- 60
4. Malato semialdehído deshidrogenasa caracterizada por que transforma el 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído y consiste en SEC ID nº 68, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66 o SEC ID nº 231.
- 65
5. DHB deshidrogenasa caracterizada por que transforma el malato-4-semialdehído en 2,4-DHB y consiste en

SEC ID nº 81, SEC ID nº 225 o SEC ID nº 227.

- 5 6. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una malato cinasa según la reivindicación 2 o 3, que consiste en SEC ID nº 13, SEC ID nº 15, SEC ID nº 17, SEC ID nº 19, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42 o SEC ID nº 44.
- 10 7. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una malato semialdehído deshidrogenasa según la reivindicación 4, que consiste en SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67 o SEC ID nº 230.
- 15 8. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una DHB deshidrogenasa según la reivindicación 5, que consiste en SEC ID nº 82, SEC ID nº 224, SEC ID nº 226 o SEC ID nº 228.
- 20 9. Gen quimérico que comprende por lo menos, en el sentido de la transcripción, ligada funcionalmente, una secuencia reguladora de promotor que es funcional en un organismo hospedador, por lo menos una de las secuencias de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 y una secuencia reguladora de finalizador que es funcional en dicho organismo hospedador representada preferentemente por la SEC ID nº 229.
- 25 10. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o un gen quimérico según la reivindicación 9.
- 30 11. Microorganismo hospedador que expresa una malato cinasa y/o una malato semialdehído deshidrogenasa y/o una DHB deshidrogenasa según las reivindicaciones 2 a 5, siendo preferentemente dicho organismo hospedador una bacteria, una levadura o un hongo, y más preferentemente seleccionado de entre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Zygosaccharomyces rouxii* o *Aspergillus flavus*.
- 35 12. Microorganismo hospedador según la reivindicación 11 transformado con por lo menos uno de los ácidos nucleicos según las reivindicaciones 6 a 8, con por lo menos un gen quimérico según la reivindicación 9 o un vector de expresión según la reivindicación 10.
- 40 13. Organismo hospedador según la reivindicación 11 o 12 que es *Escherichia coli* que comprende además una interrupción en por lo menos uno de los genes presentados en la tabla 12 y/o que sobreexpresa por lo menos uno de los genes presentados en la tabla 14.
- 45 14. Proceso de producción de 2,4-DHB que comprende la etapa de cultivar un microorganismo hospedador según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que expresa una malato cinasa, una malato semialdehído deshidrogenasa y una DHB deshidrogenasa, preferentemente el organismo hospedador se cultiva en un medio en el que se añade malato u otro ácido orgánico, tal como piruvato, succinato o fumarato, y más preferentemente el medio de cultivo comprende además otra fuente de carbono.
- 50 15. Procedimiento de producción de 2,4-DHB según la reivindicación 1, que comprende una primera etapa de producción de malato u otro ácido orgánico mediante un microorganismo sobreproductor de malato.
16. Utilización de una metilbutiraldehído reductasa o de una semialdehído succínico reductasa para transformar el malato-4-semialdehído en 2,4-DHB, consistiendo la metilbutiraldehído reductasa en SEC ID nº 74, consistiendo la semialdehído succínico reductasa en SEC ID nº 76, SEC ID nº 81 o SEC ID nº 225 o SEC ID nº 227.
17. Utilización de una malato cinasa según la reivindicación 2 o 3 para transformar el malato en 4-fosfo-malato.
18. Utilización de la malato semialdehído deshidrogenasa según la reivindicación 4 para transformar el 4-fosfo-malato en malato-4-semialdehído.

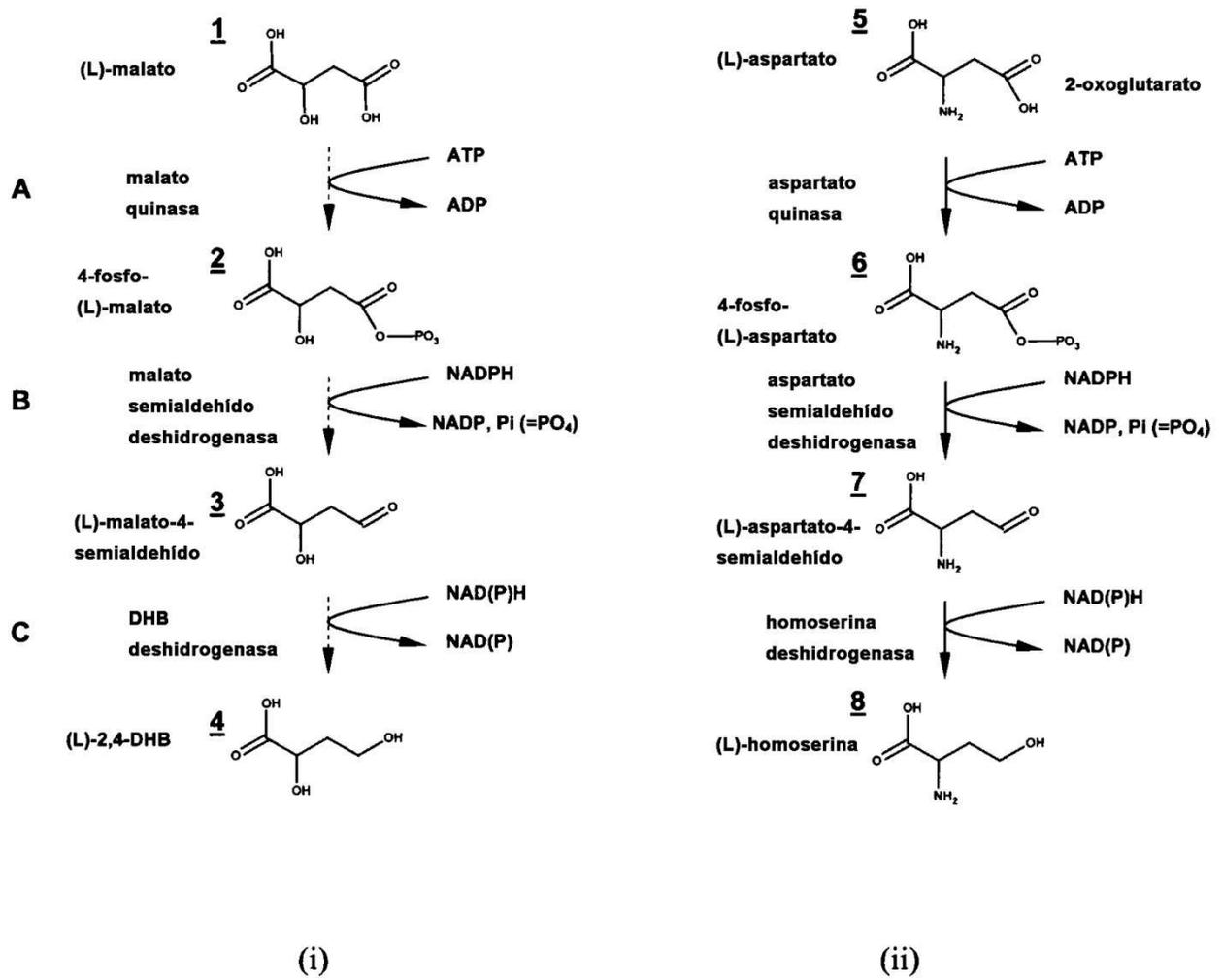


Figura 1:

ES 2 631 554 T3

```

Ec_AKIII -----
Ec_AKI -----
Ec_AKII -----
Mj -----
Tt -----
Cg -----
At MAATRVRCCHSNAAFTRLPLTRHRNSPTLPISLNRVDFPTLKKLSLPIGDGSSIRKVS GS 60
Sc -----

Ec_AKIII -----MSEIVVSKFGGTSVADF-----DAMNRSADIVLSDA 31
Ec_AKI -----MKNLRLCRRIFISTKGNVETMRVLKFGGTSVANA-----ERFLRVADILESNA 49
Ec_AKII -----MSVIAQAGAKGRQLHKFGGSSLADV-----KCYLRVAGIMAEYS 39
Mj -----MTTVMKFGGTSVSGS--ERIRHVAKIVTKRKKEDD 33
Tt -----MALVVQKYGGTSVGD--ERIHKVAQRIAHYREKGH 34
Cg -----MALVVQKYGGSSLESA--ERIRNVAERIVATKKAGN 34
At GSRNIVRAVLEEKKTEAITEVDEKGITCVMKFGGSSVASA-----ERMKEVADLILTFP 114
Sc -----MPMDFQPTSSHSNWVVQKFGGTSVKGFPVQIVDDIVKHYSKPDGPN 47
: *:*:*:*: .

Ec_AKIII NVRLVVLSSASAGITN--LLVALAEGLEPGER-FEKLDAIRNIQFAILERLRYPNVIR--- 85
Ec_AKI ROQOVATVLSAPAKITNHLVAMIEKTSIGQDALPNISDAERIFAEELLTGLAAAQPGFP-L 108
Ec_AKII QPDDMMVVSAAAGSTTNQLINWLKLSQTDRLSAHQVQOTLRRYQCCLISGLLPAEEADS-- 97
Mj DVVVVVSAMSEVTNALVEISQQALDVRDIKVG---DFIKFIREKHYKAIIEEAIKSEEIK 90
Tt RLAVVVSAMGHTTDELIALAKRVNPR----- 60
Cg DVVVVCSAMGDTTDELLELAAAVNPV----- 60
At EESPVIVLSAMGKTTNLLLAGEKAVSCGVSNAIEELSIIKELHIRTVKELNIDP--- 171
Sc NVAVVCSARSSYTKAEGTTSRLKCCDLASQSEFQDIEVIRQDHIDNADRFILNPALQ 107
:

Ec_AKIII ----EEIERLLENITVLAEEAALATSPALT--DELVSHGELMSTLLFVEILRERDVQAQW 139
Ec_AKI AQLKTFVDQEFQAIKHLVHGISLLGQCPDSINAALICRGEKMSIAIMAGVLEARGHNVTV 168
Ec_AKII -----LISAFVSDLERLAAALDGSINDAVYAEVVGHGEVWSARLMSAVLNQQGLPAAW 150
Mj EEVKKIIDSRIEELEKVLIGVAYLGELTPKSRDYILSFGERLSSPILSGAIRDLGKESIA 150
Tt -----PPFRELDLLTTTGEQVSVALLSMQLWAMGIPAKG 94
Cg -----PPAREMDMLLTAGERISNALVAMAIESLGAEAAQS 94
At ----SVILTYLEELEQLLKGIAMMKELTLRTRDYLVSFGECLSTRIFAAYLNTIGVKARQ 227
Sc AKLVDDTNKELELVKLYLNASKVLGEVSSRTVDLVMSCGEKLSCLFMTALCNDRGCKAKY 167
: ** * :.

Ec_AKIII FDVRKV--MRTNDRFGRAEPDIAALAEALQLLPRLN-EGLVITQGFIGS-ENKGRRT 194
Ec_AKI IDPVEKL-----LAVGHYLESTVDIAESTRRIAASRI PADHMVLMAGFTAG-NEKGLV 221
Ec_AKII LDAREFLR-----AERAAQPQVDEGLSYPLQLLQVHPGKRLVVTGFISR-NNAGETV 203
Mj LGGEAG-----IITDNNFGSARVKERLPLLEKGIIPVVTGFIGT-TEEGYIT 203
Tt FVQHQIG-----ITTDGRYGDARILEVNPARIREALDQGFVAVIAGFMGTTPEG-EIT 146
Cg FTGSQAG-----VLTTERHGNAIVDVTGRVREALDEGKICIVAGFQGVNKETRDVT 147
At YDAFEIG--FITDDFTNGDILEATYPAVAKRLYDDWMHDPVPIVTFGLGKGWKTGAVT 285
Sc VDLSHIVPSDFSASALDNSFYTFLVQALKEKLAFPVSAKERIVPVFTGFFGL-VPTGLLN 226
: ** .

Ec_AKIII TLGRGGS DYTAALLAEALHASRVDIWTDPVPGIYTTDPRVVSAAKRIDEIAFAEAAEMATF 254
Ec_AKI VLGRRGSDYSAAVLAACL RADCEIWTDVDGVYTC DPRQVPDARLLKMSYQEAMELSYF 281
Ec_AKII LLGRNGSDYSATQIGALAGVSRVTIWSDVAGVYSADPRKVKDA CLLEPLLRLDEASELARL 263
Mj TLGRGGS DYSAALIGYGLDADIETIWTDVSGVYTTDPRLVPTARRIPKLSYIEAMELAYF 263
Tt TLGRGGS DTTAVAIAAALGAK ECEIYTDTEGVYTTDPHLIP EARKLSVIGYDQMLEMAAL 206
Cg TLGRGGS DTTAVAAAAALNADVCEIYSDVDGVYTTADPRIVPNAQKLEKLSFEEMLELAAV 207
At TLGRGGS DLTATTIGKALGLKEIQVWKDVGVLTC DPTIYKRATPVPLYTFDEAAELAYF 345
Sc GVGRGYTDLCAALIAVAVNADELQVWKEVDGIFTADPRKVPPEARLLDSVTPPEASELTY 286
:*** :* * . :. : : : * : : ** * : : * : :

Ec_AKIII GAKVLHPATLLPAVRSDIPV FVGSSKDP RAGGTLVCN-----K 292
Ec_AKI GAKVLHPRTITPIAQFQIPCLIKNTGNPQAPGTLIGAS-----R 320
Ec_AKII AAPVLHARTLQPVSGSEIDLQLRCSYTPDQGSTRIERV----- 301
Mj GAKVLHPRTIEPAMEKGIPI LVKNTFEPESEGT LITND-----M 302
Tt GARVLHPRAVYYAKRYGVVLHVRSSFS-YNPGTLVKEV-----AM 245
Cg GSKILVLRVVEYARAFNVPLRVRSSYS-NDPGTLIAGS-----ME 246
At GAQVLHPQSMRPARERGEIPVRVKNSYNPKAPGTIITKT-----R 384
Sc GSEVIHPFTMEQVIRAKIPIRIKNVQNPLNGTIIYDPNVAKKGESTPPHPENLSSSFY 346
.: : : : : : * :

```

Figure 2

ES 2 631 554 T3

Ec_AKIII	TENPPLFRALARRNQTLTLLHSLNMLHSRGFLAEVFGILARHNI SVDLITTTSEVSVALT	352
Ec_AKI	DEDELVPKGISNLNNMAMFVSVSGPGMKGMVGMMAARVFAAMSRARISVVLITQSSSEYSIS	380
Ec_AKII	LASGTGARIVTSHDDVCLIEFQVPASQDFKLAHKEIDQILKRAQVRPLAVGVHNDRQLLQ	361
Mj	EMSDSIVKAI STIKNVALINIFGAGMVGVSGETAARIFKALGEEVNVILISQGSSETNIS	362
Tt	EM---DKAVTGVALDLDHAQIGLIGIPDQPGIAAKVFQALAEERGIAVDMIIQGVPGHDP	302
Cg	DIPVEEAVLTGVATDKSEAKVTVLGISDKPGEAAKVFALADAEINIDMVLQNVSSVEDG	306
At	DMTKSILTSIVLKRNVTMLDIASSTRMLGQVGFQVFLAKVFSIFEELGISVDVVATSEVSI SLT	444
Sc	EKRKRGTATAITTKNDIFVINIHSNKKTL SHGFLAQIF TILDKYKLVVDLISTSEVHV SMA	406
	: . . . : : : :	
Ec_AKIII	LDTTGSTS-TGDTLLTQSLMELSA-----LCRVEVEEGLALVALIGNDLSKACGVG-	403
Ec_AKI	FCVPQSDCVRAERAMQEEFYLELKEG-----LLEPLAVTERLAIISVVGDMRTLRGISA	435
Ec_AKII	FCYTSEVADSALKIILDEAGLPGELR-----LRQGLALVAMVGAGVTRNPLHCH	409
Mj	LVVSEEDVDKALKALKREFGDFGKKSFLNNLIRDVSVDKDVCVIVSVVGAGMRGAKGIAG	422
Tt	RQQMAFTVKKDFAQEALAELEPVLAEIG----GEAILRPD-IAKVSIVGVGLASTPEVPA	357
Cg	TTDITFTCPRSDGRRAMEILKKLQVQGN----WTNVLYDDQVGKVSIVGAGMKSHPGVTA	362
At	LDPSKLWSRELIQQELDHVVEELEK-----IAVVNLLKGRAIISLIGNVQHSSLILE-	496
Sc	LPIPDADSLKSLRQAEEKLRILG-----SVDITKKLSIVSLVKGKMKQYIGIAG	455
	. : : : *	
Ec_AKIII	KEVFGVLEP-FNIRMICYGASSHNL CFLVPGEDA EQVVQKLHSLNFE-----	449
Ec_AKI	KFFAALARANINIVAIAQGSSESI SVVNNDDATTGVRVTHQMLENTDQVIEV FVIGVG	495
Ec_AKII	RFWQQLKQGPVEFTWQS--DDGISLVAVLRGTPTESLIQGLHQSVFRAEKRIGLVLFQK	467
Mj	KIFTAVSESGANIKMIAQGSSEVNISFVIDEKDLLNCVRKLHEKFIKTNS-----	473
Tt	KMFQAVASTGANIEMIA--TSEVRISV IIPAEYAEAALRAVHQAFEL---DKA-----	405
Cg	EFMEALRDVNVNIELIS--TSEIRISVLIREDDLDAAARALHEQFQLGGEDEAVVYAGTG	420
At	RAFHVLYTKGVNVQMI SQGASKVNISFIVNEAEAEGCVQALHKSFFESGDLSELLIQPRL	556
Sc	TMFTTLAEEGINIEMISQGANI INISCVINESDSIKALQCIHAKLLSERTNTSNQFEHAI	515
	: : . . . : : : : *	
Ec_AKIII	-----	
Ec_AKI	GVGGALLEQLKRQQSWLKNKH-IDLRVCGVANSKALLTNVHGLNLENWQEELAQAKEPFN	554
Ec_AKII	NIGSRWLELFAREQSTLSARTGF EFVLAGVVDSRRSLLSYDGLDASRALAFFNDEAVEQD	527
Mj	-----	
Tt	-----	
Cg	-----	
At	GNGSPVRTLQVEN-----	569
Sc	DERLEQLKRLGI-----	527
Ec_AKIII	-----	
Ec_AKI	LGRLIRLVKEYHLLNPVIVDCTSSQAVADQYADFLREGFHVVT PNKKANTSSMDYYHQLR	614
Ec_AKII	EESLFLWMRAHPYDDLVLVDVTASQQLADQYLDFA SHGFHVVISANKLAGASDSNKYRQIH	587
Mj	-----	
Tt	-----	
Cg	-----	
At	-----	
Sc	-----	
Ec_AKIII	-----	
Ec_AKI	YAAEKSRRKFLYD TNVAGLPIENLQNLNAGDELMKFSGILSGLSYIFGKLDDEGMSF	674
Ec_AKII	DAFEKTGRHWLYNATVAGLPI NHTVRDLIDSGDTILSISGIFSGTLSWFLQFDGVSVP	647
Mj	-----	
Tt	-----	
Cg	-----	
At	-----	
Sc	-----	
Ec_AKIII	-----	
Ec_AKI	SEATTLAREMGYTEPDRDDLSGMDVARKLLILARETGRELELADIEIEPVLPAEFNAEG	734
Ec_AKII	TELVDQAWQQGLETPDRDDLSGKDV MRKLVILAREAGYNI EPDQVRVESLVPFAHCEG-G	706
Mj	-----	
Tt	-----	
Cg	-----	
At	-----	
Sc	-----	

Figura 2 (cont.)

ES 2 631 554 T3

```
Ec_AKIII -----  
Ec_AKI      DVAAFMANLSQLDNLFAARVAKARDEGKVLRYVGNIDEDGVCRVKIAEVDSDNDPLFKVKN 794  
Ec_AKII     SIDHFFENGDELNEQMVQRLEAAREMGLVLRVAREFDANGKARVGVEAVREDHPLASLLP 766  
Mj          -----  
Tt          -----  
Cg          -----  
At          -----  
Sc          -----
```

```
Ec_AKIII -----  
Ec_AKI      GENALAFYSHYYQPLPLVLRGYGAGNDVTAAGVFADLLRTLWKLGV 841  
Ec_AKII     CDNVFATIESRWYRDNPLVIRCPGAGRDTVAGAIQSDINRLAQLL--- 810  
Mj          -----  
Tt          -----  
Cg          -----  
At          -----  
Sc          -----
```

Figura 2 (final)

ES 2 631 554 T3

Ec	-----MKNVGFIGWRGMVGSVLMQRMVEERDFDAIRPVFFSTSQLGQAAPSEFGGTTGT	53
Sc	MAG----KKIAGVLGATGSGVQRFIL--LLAN-HPHFELKVLGASSRSAGKKYVDVAVNWQ	54
Cg	-----MTTIAVVGATGQVQVMRT--LLEERNFPADTVRFFASPRASAGRKIEFRGTEIE	52
Bs	----MGRGLHVAVVGATGAVGQQMLK-TLEDNRNFMEDTLTLLSSKRSAGTKVTFKQQLT	55
At	----ESAPSLAVVGVTGAVGQEFLS-VLSDRDFPYSSIKMLASKRSAGKRVAFDGHYEY	54
Tt	-----MRVAVVGATGAVGREILK-VLEARDFPLSDLRLRYASPRASAGVRLAFRGEEIP	51
Mj	MSKGEKMKIKVGLGATGSGVQRVQ--LLAD-HPMFELTALAASERSAGKKYKDACYWFQ	58
	..:* * ** : : . : : : .	
Ec	LQDAFD-----LEALKALDIIVTCQGGDYTNEIYPKLRSEGWQGYWIDAASS	100
Sc	TDLLPESATDIIVS--ECKSEFFKECDIVFSGLDADYAGAIEKEFMEAG--IAIVSNAKN	110
Cg	VEDITQ-----ATEESLKDIDVALFSAGGTASKQYAPLFAAAG--ATVVDNSSA	99
Bs	VQEAS-----PESFEGVNIALFSAGGSVSQALAPEAVKRG--AIVIDNTSA	99
At	VEELT-----ADSFNGVDIALFSAGGSISKEFGPLAAEK--TIVVDNSSA	98
Tt	VEPLP-----EGPLP-VDLVLASAGGGISKAKALVWAEGG--ALVVDNSSA	94
Mj	DRDIPENIKDMVVIPTDPKHFEFEDVDIVFSALPSDLAKKFEPEFAKEG--KLIFSNASA	116
	: : : . . : *	
Ec	LRMKDDAIIILDVFNQD---VITDGLNNG-----IRTFVGGNCTVSLMLMSLGGLF	148
Sc	YRREQDVLIVPVVNPEHLDIVAQKLDTAKAQGKPRPGF--IICISNCSTAGLVAPLKPLI	169
Cg	WRKDDEVPLIVSEVNPST---KDSLKVG-----IIANPNCTTMAAMPVLKPLH	144
Bs	FRMDENTPLVVPEVNEA----DLHEHNG-----IIANPNCSTIICMVAALEPIR	143
At	FRMVDGVLVIPEVNPEAMKGIKVGMGK-----ALIANPNCSTIICLMAVTPH	148
Tt	WRYEPWVPLVPEVNR-----KIFQHRG-----IIANPNCTTAILAMALWPLH	138
Mj	YRMEEDVPLVIPEVNADHLELIEIQREKRGWDG-----A-IITNPNCTICAVITLKPIM	170
	* . : : * * : * * . : :	
Ec	ANDL--VDWVSVATYQAASGGGARHMRLLTQMGLYGHVADELATPSSAILDIERKVTTL	207
Sc	EKFGPIDALTTTTLQAI SAGFSPGVGIDILDNI-----	204
Cg	DAAG--LVKLVHSSYQAVSGSGLAGVETLAKQVAAVGDHNVEFVHDG-----	189
Bs	KAYG--LNKVIVSTYQAVSAGNEAVKELYSQTQAI--LNKEEIEPE-----	186
At	HHAK--VKRMVSTYQAASGAGAAAMEELVQQTREV--LEGK-----	186
Tt	RAFQ--AKRVIVATYQAASGAGAKAMEELLTETHRF--LHGE-----	176
Mj	DKFG--LEAVFIATMQAVSAGYN--GVPSMAILDNL-----	203
	: : : * * * *	
Ec	TRSGELPVDNFGVPLAGSLIPWIDKQLDNG--QSREEWKQAETNKILNTSSVIPVDGLC	265
Sc	-IPYIGGEEDKMEWETKKILAPLAEDKTHVKLLTPEEIKVSAQCNRVAVSDGHT-ECISL	262
Cg	QAADAGDVGPVYSPIAYNVLPFAGNLVDDGT FETDEEQKLRNESRKILGLPDLK--VSGTC	248
Bs	IMPVKGDK--KHYQIAFNAIPQIDKFQDNG--YTFEEMKMINETKKIMHMPDLQ--VAATC	241
At	--PPTCNI--FGQYAFNLF SHNAPILDNG--YNEEEMKLVKETRKIWNDETVK--VTATC	239
Tt	--APKAEA--FAHPLPFNVIPHIDAFQENG--YTREEMKVVWETHKIFGDDTIR--ISATA	229
Mj	-IPFIKNEEEKMQTESLKLGLTKDGG--VELAN---FKISASCNRVAVIDGHT-ESIFV	256
	. . . : . * . : :	
Ec	VRVGALRCHSQAFTIKLKKDVS IPTVEELLAAHNPWAKVVPNDREITMRELT PAAVTGTL	325
Sc	RFKNRPAPSVEQVKTCLKEYVCDAYKLGCHSAPKQTIHVLEQPD--RPQPRDRNRDSGY	320
Cg	VRVPVFTGHTLTIHAEFDK-AITVDQAQEILGAASGVKLV-----VPTPLAAAGID	299
Bs	VRLPIQTGHSESVYIEIDRDDATVEDIKNLLKEAPGVTLODDPS--QQLYPMPADAVGKN	299
At	IRVPVMRAHAESVNLQFEN-PLDENTAREILKKAPGVYIIDDRA--SNTFPTPLDVSNKD	296
Tt	VRVPTLRAHAEAESVVEFAR-PVTPAAREVLKEAPGVEVVDEPE--AKRYPMPLTASGKW	286
Mj	KTKEGAEP--EIKEVMDKF--DPLKDLNLPTYAKPIVIREEID--RPQPRDRNEGNM	310
	. : . :	
Ec	TTPVGRRLRKLN--MGPEFLSAFTVGDQLLWGAAEPLRRMLRQLA-----	367
Sc	GVSVGRIREDP----LLDFKMVLSHNTIIGAAGSGVLIAEILLARNLI	365
Cg	ESLVGRIRQDSTVDDNRGLVLSVSGDNLRKGAALNTIQIAELLVK----	344
Bs	DVFVGRIRKDLDRAN--GFHLWVSDNLLKGAAWNSVQIAESLKKLNLV	346
At	DVAVGRIRRDVSQDGNFGLDIFVCGDQIRKGAALNAVQIAEMLL-----	340
Tt	DVEVGRIRKSLAFEN--GLDFFVVDQLLKGAALNAVQIAEEWLKG--	331
Mj	SIVVGRIRKDP----IFDVKYTALEHNTIRGAAGASVNLNAEYFVKKYI-	354
	***:*. . . : ***	

Figura 3:

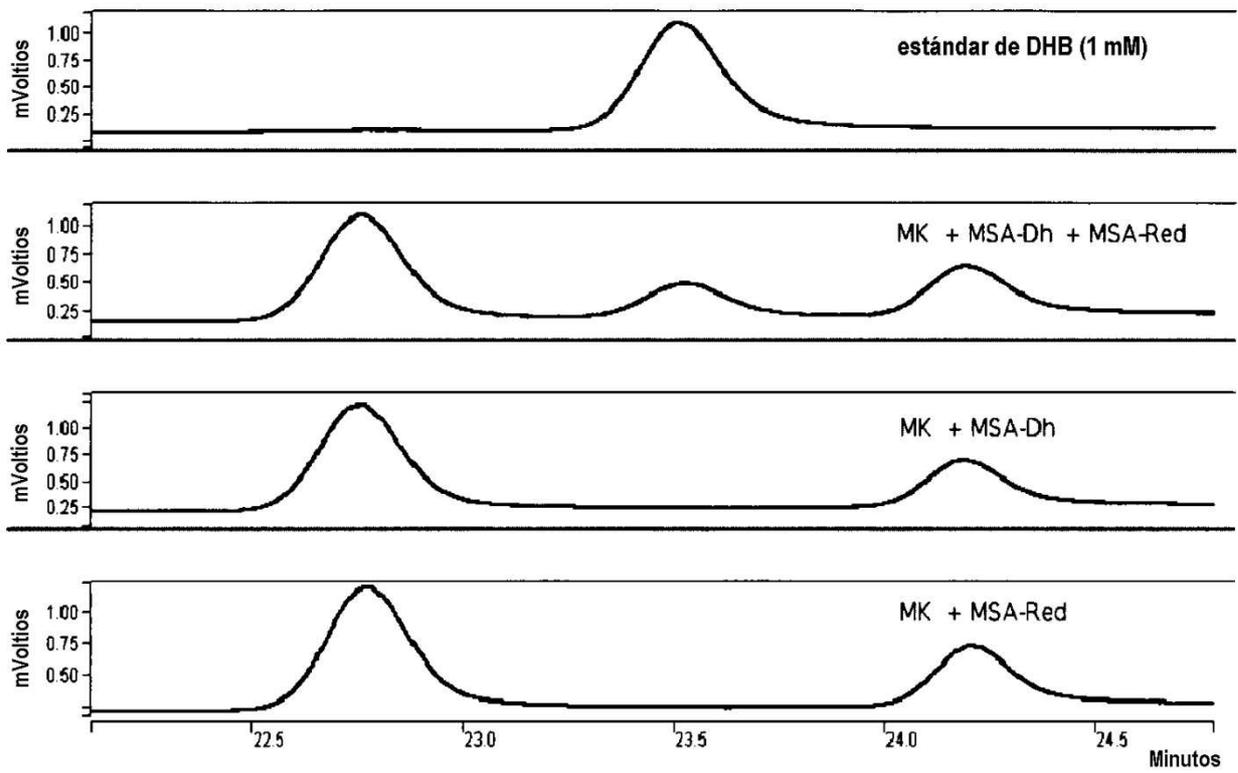


Figura 4

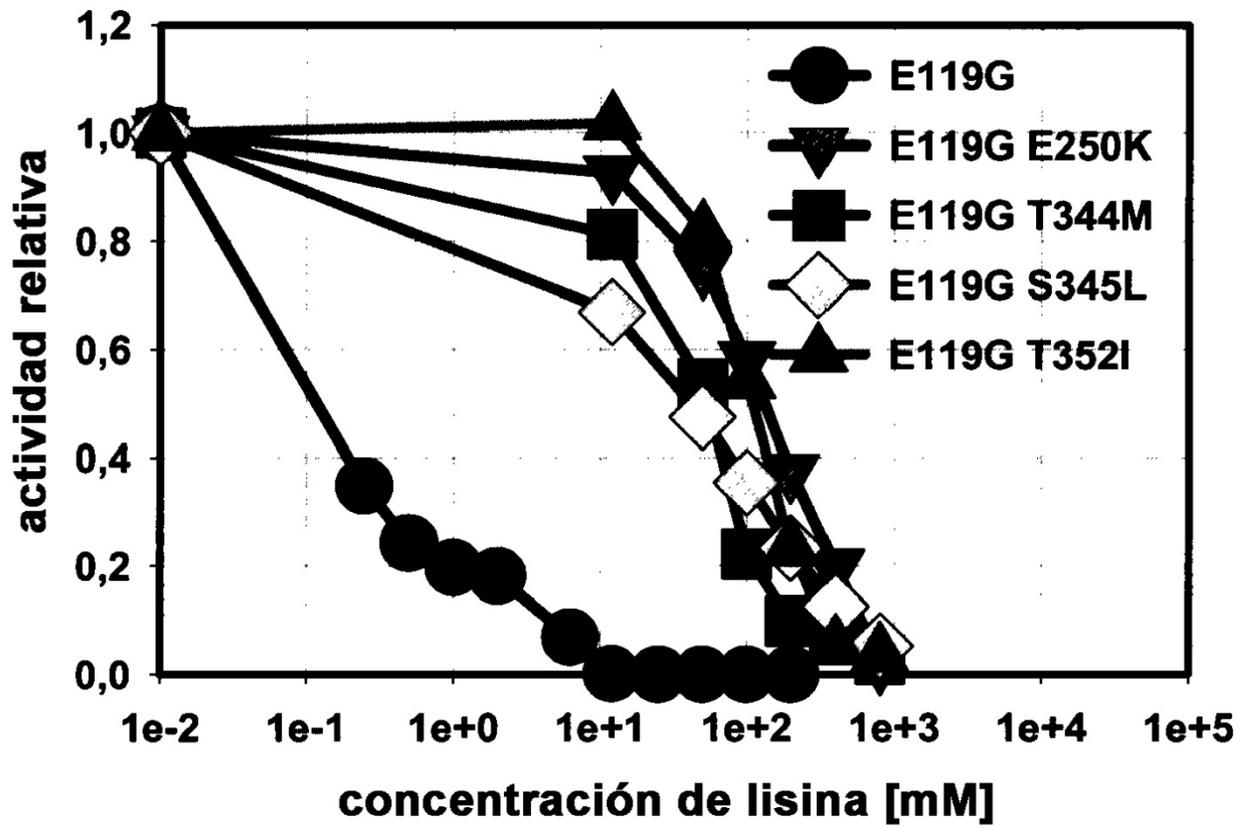


Figura 5