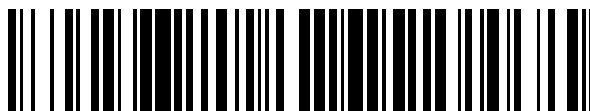


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 480**

51 Int. Cl.:

C07K 14/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/EP2014/061632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14728558 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 3004146**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de permeasa**

30 Prioridad:

05.06.2013 EP 13170644

05.06.2013 EP 13170646

05.06.2013 EP 13170648

18.12.2013 EP 13197988

19.03.2014 EP 14160772

10.04.2014 EP 14164270

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.04.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon, 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

KLAASSEN, PAUL;

DE WAAL, PAULUS PETRUS;

DE JONG, RENÉ MARCEL;

DRIESSEN, ARNOLD JACOB MATTIEU;

NIJLAND, JEROEN GERBEN y

SHIN, HYUN YONG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 480 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

Polipéptidos con actividad de permeasa

Sumario de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar novedosos polipéptidos de permeasa con especificidad por azúcares alterada, en particular mejorada. Es otro objeto de la invención proporcionar cepas recombinantes que expresan el polipéptido de permeasa que tienen captación mejorada de la molécula que la permeasa transporta a través de la membrana celular. Es otro objeto proporcionar un polipéptido de permeasa que tienen una capacidad mejorada de transporte de azúcares C5, en particular xilosa, en comparación con un polipéptido original. Es otro objeto proporcionar un polipéptido de permeasa que tiene actividad de transporte reducida para azúcar C6, en particular glucosa, en comparación con un polipéptido original. Es otro objeto proporcionar un método de identificación de mutaciones en otros polipéptidos de permeasa relacionados que tienen un efecto beneficioso sobre la capacidad mejorada del transporte de xilosa o actividad de transporte reducida para glucosa.

Uno o más de estos objetos se obtienen según la invención. Según la presente invención, se proporciona un polipéptido que tiene una o más sustituciones en una posición correspondiente a la posición 339 o 376 de SEQ ID NO: 59, en la que el polipéptido es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), polipéptido que es polipéptido de hexosa permeasa, en el que, cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 376, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 80 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 Δt_R, y cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 339, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 80 a 160 Å³. En una realización, el aminoácido tiene en la posición 376 un volumen de van der Waals de 85 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 Δt_R.

Los valores para el volumen de van der Waals (Å³) para los aminoácidos se usan en el presente documento como se describen en: http://www.proteinsandproteomics.org/content/free/tables_1/table08.pdf. La bibliografía correspondiente es N. J. Darby, Thomas E. Creighton, Protein Structure (1993) Oxford University Press. Los valores para la hidrofobia de cadena lateral (Δt_R) de aminoácidos se usan en el presente documento como se describen en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.310010507/pdf>. La referencia correspondiente a esto es Monera, O.D. et al, Journal of Peptide Science Vol. 1, 319-329 (1995).

Un polipéptido según la invención que tiene una o más de estas mutaciones tiene un consumo de azúcar y/o producción de productos de fermentación ventajosos. Esto se describirá más abajo en más detalle y se ilustrará por los Ejemplos 1-5 a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra resultados de cultivos en matraces oscilantes aerobios de mutantes transportadores de hexosa sobre Verduyn-urea + 15 g l⁻¹ de glucosa + 20 g l⁻¹ de xilosa. (A) Mediciones de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, (B) concentraciones de glucosa (g l⁻¹), (C) concentraciones de xilosa durante el periodo de cultivo.

La FIG. 2 muestra resultados de cultivos en matraces oscilantes aerobios de mutantes transportadores de hexosa sobre Verduyn-urea + 20 g l⁻¹ de xilosa. (A) Mediciones de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, (B) concentraciones de xilosa (g l⁻¹).

La FIG. 3 muestra el esquema de construcción de cepas para la cepa YD01227

La FIG. 4 muestra resultados de cultivos en matraces oscilantes aerobios del mutante de hexosa cinasa cuádruple (col 2) y la cepa de referencia RN1014 sobre Verduyn-urea + 100 g l⁻¹ de glucosa + 20 g l⁻¹ de xilosa. A) Mediciones de densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, (B) concentraciones de glucosa (g l⁻¹), (C) concentraciones de xilosa durante el periodo de cultivo.

La FIG. 5 muestra resultados de cultivos en placa de microtitulación sobre mezclas de glucosa - xilosa. Características de crecimiento de la cepa de referencia RN1014, y mutantes de hexocinasa cuádruples YD01227 y colonia 2 (Col 2) con igual genotipo sobre Verduyn-urea complementado con mezclas de glucosa y xilosa a las siguientes concentraciones: (A) 60 + 20, (B) 100 + 20, (C) 15 + 5, y (D) 25 g l⁻¹ + 5 g l⁻¹, respectivamente. Cada 15 minutos, se midió DO600 automáticamente por un aparato Bioscreen C. Los puntos de datos son el promedio de mediciones por triplicado.

La FIG. 6 muestra un mapa del plásmido pRN993.

La FIG. 7 muestra las relaciones entre xilosa residual y concentraciones de glucosa (A), o concentraciones residuales de xilosa y crecimiento (DO600; B) en el cribado de contador de la actividad del transporte de glucosa (cribado de GTAC), véanse los ejemplos. Se representaron concentraciones residuales de xilosa (g l⁻¹)

contra la concentración residual (A) de glucosa (g l^{-1}) y (B) DO600 a 96 horas. (Cuadro B) El análisis de regresión lineal muestra una buena correlación de DO600 y xilosa. Cada punto de datos representa el promedio de las concentraciones de azúcar de 1 a 3 duplicados, o de múltiples mediciones de la cepa de control RN1001 o muestras de medio por parte del cribado.

La FIG. 8 muestra el crecimiento y consumo por xilosa de variantes de mutantes Gal2-N376 en el cribado de GTAC. (A) Mediciones de DO600 en los momentos de tiempo 24, 72 y 96 horas, y (B) concentraciones residuales de xilosa (g l^{-1}) medidas para las variantes de mutantes Gal2-N376, cepa de control RN1001 y muestras vacías (medio YD10-solo) durante el cribado de GTAC. Cada columna representa la DO600 promedio o concentración de xilosa residual de 3 transformantes; las barras de error representan el error estándar de la media. Los asteriscos indican aminoácidos con grandes cadenas laterales hidrófobas con un claro efecto.

La FIG. 9 muestra los perfiles de crecimiento del cribado de la actividad de transporte de xilosa (XTA) de TOP15 (véanse los ejemplos). Valores de DO600 de los tres puntos de muestreo para las cepas/variantes de TOP15 de (A) Parte A y (B) Parte B del cribado de XTA. Cada columna representa la DO600 promedio de 3 transformantes; las barras de error representan el error estándar de la media.

La FIG. 10 muestra un alineamiento de secuencias de proteínas de permeasa.

La FIG. 11 muestra la representación del volumen de van der Waals de aminoácidos ($\text{\AA}^3$) (eje y) contra la hidrofobia de aminoácidos (Δt_R) (eje x). Los aminoácidos ventajosos (actividad de transporte de glucosa reducida) para la posición correspondiente a 376 en SEQ ID NO: 59 están dentro del área definida por las líneas de rayas cortas y para la posición 339 por las líneas de rayas largas. Los valores para el volumen de van der Waals usados en el presente documento se describen en: <http://www.proteinsandproteomics.org/content/free/tables/1/table08.pdf>. La bibliografía correspondiente es N. J. Darby, Thomas E. Creighton, Protein Structure (1993) Oxford University Press. Los valores para la hidrofobia (Δt_R) de aminoácidos se usan en el presente documento como se describen en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.310010507/pdf>. La referencia correspondiente a esto es Monera, O.D. et al, Journal of Peptide Science Vol. 1 319-329 (1995).

La FIG. 12 muestra (A) Curva de crecimiento de la cepa RN1053-X2 desarrollada y la cepa RN1053 no mutada sobre Verduyn-urea-his complementado con 2 % de xilosa. Se expresaron curvas de crecimiento como unidades de densidad óptica (DO) medidas a 600 nm de longitud de onda (DO600) con el tiempo (h) (B) Nivel de expresión de *HXT8-HXT17* en la cepa RN1053-X2. Nivel de expresión con respecto a niveles de *ACT1* en cada muestra, se expresó como las veces del nivel de expresión normalizado; los niveles de expresión se normalizaron contra los niveles de ARNm de RN1053 del gen *HXT* específico (nivel de expresión de RN1053 establecido a 1).

La FIG. 13 (A-B) muestra. (A) Nivel de expresión de *HXT11* y (B) Crecimiento de cepas inactivadas en *HXT11* (KO1 a -6) en comparación con RN1053-X2-vacío (1053-X2) y RN1053-vacío. El crecimiento se expresó como unidades de densidad óptica (DO) medida a 600 nm de longitud de onda (DO600).

La FIG. 13 (C-D) muestra (C) Mapa del plásmido de pRS313-P7T7, (D) Crecimiento de RN1053-X2 transformada con control de vector vacío (1053-X), y de cuatro transformantes después de la introducción de pRS313-P7T7-HXT11inversa (iHXT1 a -4) sobre Verduyn-urea complementado con 2 % de xilosa. El crecimiento se expresó como unidades de densidad óptica (DO) medidas a 600 nm de longitud de onda (DO600)

La FIG. 14 muestra los perfiles de crecimiento de RN1053-HXT11 (Hxt11, diamantes rellenos), RN1053-HXT12 (Hxt12, triángulos blancos), RN1053-control de vector vacío (1053; triángulos), RN1041-control de vector vacío (1041; cuadrados blancos) sobre Verduyn-urea complementado con (A) mezcla de glucosa y xilosa (2 % de cada uno) o (B) 2 % de xilosa. Las curvas de crecimiento se expresaron como unidades de densidad óptica (DO) medidas a 600 nm de longitud de onda (DO600) con el tiempo (h).

La FIG. 15 muestra los estudios de captación de xilosa en RN1053-HXT11 (HXT11), RN1053-HXT2 (Hxt2), RN1053-vacío (vacío) con o sin concentraciones crecientes de glucosa de competición (0-500 mM).

La FIG. 16 muestra (A) Crecimiento de RN1053 que expresa proteína Hxt11p-GFP quimérica sobre 2 % de xilosa a 16 h (la densidad celular inicial fue DO 0,5). (B) Microscopía de fluorescencia de RN1053-HXT11 y RN1041-HXT11 cultivadas sobre Verduyn-urea complementado con glucosa o xilosa.

La FIG. 17 muestra los perfiles de fermentación del consumo de azúcar y la producción de etanol de (A) plásmido RN1041-vacío y (B) RN1053-HXT11 sobre Verduyn-urea complementado con 80 g l^{-1} de glucosa y 40 g l^{-1} de xilosa.

La FIG. 18 muestra los perfiles de crecimiento (DO600) (A), xilosa residual (B) y glucosa (C) concentraciones (g l^{-1}) después de 96 horas del cribado de GTAC con los transformantes YD01227-GAL2 (n=3), YD01227-HXT2 (n=3), YD01227-HXT11 (n=3). Se añadieron medio y muestras de RN1001 como controles.

La FIG. 19 (A-B) muestra los perfiles de crecimiento de cultivos en matraces oscilantes de (A) transformantes YD01227-vacío, YD01227-HXT11 y YD01227-mHXT11(N366D) (n=2) sobre Verduyn-urea complementado con 15 % de glucosa y 1 % de xilosa y, (B) de RN1053-transformantes sobre Verduyn-urea con 2 % de xilosa (n=3).

La FIG. 19 (C-E) muestra los perfiles de captación de azúcar radiomarcados con ^{14}C por RN1053-HXT11 y RN1053-mHXT11(N366D). (A) Captación de ^{14}C -glucosa y captación de ^{14}C -xilosa en ausencia (D) y presencia (E) de concentraciones de glucosa no marcada creciente (0-500 mM). La captación de azúcar se expresó como nmol mg de peso seco (DW) de levadura por minuto (min).

La FIG. 19 (C-F) muestra los perfiles de fermentación de RN1041-vacío (diamantes rellenos; 1041+vacío), RN1053-HXT11 (triángulos rellenos; 1053+HXT11), RN1053-mHXT11 (N366D) (cuadrados rellenos; 1053+epHXT11) sobre Verduyn-urea + 100 g l^{-1} de glucosa y 60 g l^{-1} de xilosa. (C) Curvas de crecimiento (expresadas por mediciones de DO600) con el tiempo (h). Los constituyentes se midieron en el caldo de fermentación con el tiempo (h) tal como (D) glucosa, (E) xilosa y (F) etanol.

La FIG. 19 (J-L) muestra los perfiles de fermentación sobre Verduyn-urea complementado con 80 g l^{-1} de glucosa y 40 g l^{-1} de xilosa de la cepa RN1053-HXT11 (J y L-línea discontinua gris) y RN1053-mHXT11(N366D) (K y L-línea negra). (L) Figura combinada de ambos perfiles de fermentación ilustrados en (J) y (K).

La FIG. 20 muestra el esquema para la relación glucosa/xilosa en el medio Verduyn-urea-his durante el cultivo en quimiostato (días) de YD01227;

La FIG. 21 muestra los perfiles de crecimiento de cultivos en matraces oscilantes sobre Verduyn-urea-his complementado con 1 % de xilosa sin (triángulos rellenos; 1+0) o con (3 % de glucosa, raya, 1+3; 6 % de glucosa, círculos rellenos, 1+6; 10 % de glucosa, diamantes rellenos, 1+10) concentraciones crecientes de glucosa con YD01227-evo (A) y YD01227-ori (B). (C) Estudio de captación de ^{14}C -xilosa de YD01227-ori (1227-ori, cuadrados rellenos) o YD01227-evo (1227-evo, diamantes rellenos) con o sin concentraciones crecientes de glucosa (0-500 mM).

La FIG. 22 muestra (A) perfil de expresión de ARNm de YD01227-ori (barras blancas), YD01227-evoB sobre Verduyn-urea-his complementado con una mezcla de azúcar en una relación xilosa:glucosa 1:3 (barras grises) y 1:10 (barras negras). Los datos se expresaron como expresión normalizada (con respecto a *ACT1* y con respecto a YD01227-ori, que se estableció a 1).

La FIG. 22 (B-D) Experimentos de captación con xilosa (B) y glucosa (C). La captación se midió en nmol/mg.DW.min en RN1053-Hxt3-6 (diamantes), RN1053-N367I (triángulos) y 1053-emp (cuadrados). (D) Captación de ^{14}C -xilosa 50 mM en presencia de glucosa 0, 50, 100, 200 y 500 mM en la cepa RN1053-Hxt3-6 (diamantes) y RN1053-N367I (cuadrados).

FIG. 23 Imágenes de fluorescencia de la cepa RN1053 que expresa proteínas de fusión de GFP de Hxt36 (A) y Hxt36-N367I (B). Las imágenes se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse-Ti. (C) Cantidad total de fluorescencia de GFP (en UA/DO600) en ambas cepas.

FIG. 24 Crecimiento de los vectores que contienen la cepa YD01227 que expresan transportadores de HXT36 con todas las posibles sustituciones de aminoácidos en la posición 367. Las células se cultivaron sobre 1 % de xilosa y 10 % de xilosa, y se usó YD01227 transformado con el vector vacío pRS313-P7T7 como control.

FIG. 25 Experimentos de captación para determinar K_m y V_{max} para glucosa (panel A) y xilosa (panel B). La captación se midió en nmol/mgDW.min en la cepa RN1053-HXT36 (diamantes), la cepa RN1053-HXT36-N367I (cuadrados) y en la cepa RN1053-HXT36-N367A (triángulos). Los niveles de captación de la cepa RN1053-vacío fueron, para ambos azúcares, restados de las cepas RN1053-HXT36, RN1053-HXT36-N367I y RN1053-HXT36-N367A.

FIG. 26 Crecimiento de la cepa RN1053 que expresa *HXT36* (A), *HXT36-N367I* (B) y *HXT36-N367A* (C) sobre 5 g l^{-1} de D-glucosa y 5 g l^{-1} de D-xilosa. Se midieron D-glucosa residual (diamantes), D-xilosa (cuadrados) y etanol (círculos) en g/l.

FIG. 27 Caracterización de la especificidad por xilosa de mutantes HXT11-N366X. (A) Tasa de crecimiento exponencial máxima (1/h) de mutantes HXT11-N366X en la cepa YD01227. Tasa de crecimiento exponencial máxima (1/h) para mutantes N366X expresados en RN1053 sobre glucosa (B) o xilosa (C).

FIG. 28 Imágenes de fluorescencia de la cepa RN1053 que expresa proteínas de fusión de GFP de mutantes HXT11-N366X cultivados sobre 2 % de maltosa. Las letras arriba a mano izquierda de la imagen representan el aminoácido en la posición 366 de la variante de Hxt11 respectiva.

FIG. 29 Fermentaciones sobre Verduyn-urea complementado con xilosa (40 g l⁻¹) y glucosa (71,8 g l⁻¹) de (A) RN1053 HXT11-N366M, (B) RN1053 HXT11-N366T, (C) RN1001 y (D) RN1053 HXT11-N366N. Símbolos: glucosa (◆), xilosa (■), etanol (▲), densidad celular (●). (A), (B), (C) y (D) son los paneles de la FIG. 29.

Breve descripción del listado de secuencias

- 5 SEQ ID NO: 1: cebador 5034-kanf
- SEQ ID NO: 2: cebador 5035-kanr
- SEQ ID NO: 3: cebador 5116-lf2
- SEQ ID NO: 4: cebador 5118-lr2
- SEQ ID NO: 5: cebador 5115-lf1
- 10 SEQ ID NO: 6: cebador 5117-lr1
- SEQ ID NO: 7: pRN201; TOPO-BLUNT-loxP-kanMX-loxP
- SEQ ID NO: 8: pRN251; TOPO-BLUNT-loxP-hphMX-loxP
- SEQ ID NO: 9: pRN365; TOPO-BLUNT-loxP-natMX-loxP
- SEQ ID NO: 10: cebador 115-natf
- 15 SEQ ID NO: 11: cebador 116-natr
- SEQ ID NO: 12: pRN447; TOPO-BLUNT-loxP-zeoMX-loxP
- SEQ ID NO: 13: cebador 28-H3f
- SEQ ID NO: 14: cebador 29-H3r
- SEQ ID NO: 15: pRN247 (TOPO- BLUNT-HIS3:loxPkanMXloxP)
- 20 SEQ ID NO: 16: cebador 201-Hx2uf
- SEQ ID NO: 17: cebador 202-Hx2ur
- SEQ ID NO: 18: cebador 203-Hx2df
- SEQ ID NO: 19: cebador 204-Hx2dr
- SEQ ID NO: 20: cebador 205-Hx3uf
- 25 SEQ ID NO: 21: cebador 206-Hx3ur
- SEQ ID NO: 22: cebador 210-Hx4df
- SEQ ID NO: 23: cebador 211-Hx4dr
- SEQ ID NO: 24: cebador 212-Hx5uf
- SEQ ID NO: 25: cebador 213-Hx5ur
- 30 SEQ ID NO: 26: cebador 229-Hx7df
- SEQ ID NO: 27: cebador 230-Hx7dr
- SEQ ID NO: 28: cebador 243-Gal2ufn
- SEQ ID NO: 29: cebador 244-Gal2urn
- SEQ ID NO: 30: cebador 233-Ga2df
- 35 SEQ ID NO: 31: cebador 234-Ga2dr
- SEQ ID NO: 32: pRN485; TOPO-BLUNT-GAL2:loxPzeoMXloxP
- SEQ ID NO: 33: pRN566; TOPO-BLUNT-HXT367:loxP-hphMX-loxP

	SEQ ID NO: 34: pRN569: TOPO-BLUNT-HXT514:loxP-natMX-loxP
	SEQ ID NO: 35: pRN635; TOPO-BLUNT-HXT2:loxP-kanMX-loxP
	SEQ ID NO: 36: cebador 281-Hx3inr2
	SEQ ID NO: 37: cebador 323-Hx7inr1
5	SEQ ID NO: 38: cebador Hx4inr2
	SEQ ID NO: 39: cebador Hx5inf
	SEQ ID NO: 40: cebador 324-Ga2inf1
	SEQ ID NO: 41: cebador 325-Ga2inr1
	SEQ ID NO 42: cebador 289-Hx2inf
10	SEQ ID NO: 43: cebador 290-Hx2inr
	SEQ ID NO: 44: cebador 838-Glk1-psuc227f
	SEQ ID NO: 45: cebador 834- Hxk2-psuc227f
	SEQ ID NO: 46: cebador 645-pSUC227r
	SEQ ID NO: 47: cebador 839-Glk1-psuc225r
15	SEQ ID NO: 48: cebador 835-Hxk2-psuc225r
	SEQ ID NO: 49: cebador 646-pSUC225f
	SEQ ID NO: 50: cebador 846-Hxk1_loxP_f
	SEQ ID NO: 51: cebador 847-Hxk1_loxP_r
	SEQ ID NO: 52: cebador 848-Gal1_loxP_f
20	SEQ ID NO: 53: cebador 849-Gal1_loxP_r
	SEQ ID NO: 54: pRN774; TOPO-BLUNT-loxP-hphMX-loxP (sitios loxP en orientación opuesta)
	SEQ ID NO: 55: pRN775; TOPO-BLUNT-loxP-natMX-loxP (sitios loxP en orientación opuesta)
	SEQ ID NO: 56: secuencia de ADN de <i>WT-GAL2</i>
	SEQ ID NO: 57 pRN993; sitio XbaI (TCTAGA) y sitio BssHII (GCGCGC).
25	SEQ ID NO: 58: pDB1250; vector de expresión <i>WT-GAL2</i> para el cribado; sitio XbaI (TCTAGA) y sitio BssHII (GCGCGC).
	SEQ ID NO: 59: secuencia de aminoácidos de WT Gal2p
	SEQ ID NO: 60: pRN187 (vector de expresión de <i>CRE</i> recombinasa derivado de pSH65)
	SEQ ID NO: 61: pRN486 (TOPO-BLUNT-his3::loxP-natMX-loxP)
30	SEQ ID NO: 62: Cebador ActinF (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 63: Cebador ActinR (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 64: Cebador HXT1 F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 65: Cebador HXT1 R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 66: Cebador HXT2F (PCR en tiempo real)
35	SEQ ID NO: 67: Cebador HXT2R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 68: Cebador HXT3F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 69: Cebador HXT3R (PCR en tiempo real)

	SEQ ID NO: 70: Cebador HXT4F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 71: Cebador HXT4R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 72: Cebador HXT5F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 73: Cebador HXT5R (PCR en tiempo real)
5	SEQ ID NO: 74: Cebador HXT7F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 75: Cebador HXT7R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 76: Cebador HXT8F ((PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 77: Cebador HXT8R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 78: Cebador HXT9F (PCR en tiempo real)
10	SEQ ID NO: 79: Cebador HXT9R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 80: Cebador HXT10F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 81: Cebador HXT10R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 82: Cebador HXT11F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 83: Cebador HXT11R (PCR en tiempo real)
15	SEQ ID NO: 84: Cebador HXT12F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 85: Cebador HXT12R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 86: Cebador HXT13F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 87: Cebador HXT13R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 88: Cebador HXT14F (PCR en tiempo real)
20	SEQ ID NO: 89: Cebador HXT14R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 90: Cebador HXT15F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 91: Cebador HXT15R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 92: Cebador HXT16F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 93: Cebador HXT16R (PCR en tiempo real)
25	SEQ ID NO: 94: Cebador HXT17F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 95: Cebador HXT17R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 96: Cebador GAL2F (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 97: Cebador GAL2R (PCR en tiempo real)
	SEQ ID NO: 98: Cebador KOP11* para KO HXT11
30	SEQ ID NO: 99: Cebador KOT11* para KO HXT11
	SEO ID NO: 100: Cebador iHXT11F (HXT11 inversa)
	SEO ID NO: 101: Cebador iHXT11R (HXT11 inversa)
	SEO ID NO: 102: Cebador HXT11F (clonación)
	SEQ ID NO: 103: Cebador HXT12F (clonación)
35	SEQ ID NO: 104: Cebador HXT11/12R (clonación)
	SEQ ID NO: 105: Cebador HXT1 XbaI (clonación)
	SEQ ID NO: 106: Cebador R HXT1 Cfr9i (clonación)

	SEQ ID NO: 107: Cebador F HXT2 XbaI (clonación)
	SEQ ID NO: 108: Cebador R HXT2 Cfr9I (clonación)
	SEQ ID NO: 109: Cebador F HXT3 XbaI (clonación)
	SEQ ID NO: 110: Cebador R HXT6 Cfr9I (clonación)
5	SEQ ID NO: 111: Cebador F HXT4 XbaI (clonación)
	SEQ ID NO: 112: Cebador R HXT4RN Cfr9I (clonación)
	SEQ ID NO: 113: Cebador F HXT5 XbaI (clonación)
	SEQ ID NO: 114: Cebador R HXT5 Cfr9I (clonación)
	SEQ ID NO: 115: Cebador F HXT7 XbaI (clonación)
10	SEQ ID NO: 116: Cebador R HXT7 Cfr9I (clonación)
	SEQ ID NO: 117: Plásmido pRS313-P7T7
	SEQ ID NO: 118: Plásmido pRS313-P7t7-HXT11+GFP
	SEQ ID NO: 119: Secuencia de ADN de ORF de HXT11 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 120: Secuencia de ADN de ORF de HXT2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	SEQ ID NO: 121: Secuencia de ADN de ORF de GAL2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 122: Secuencia de ADN de ORF de HXT3-6 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 123: Secuencia de aminoácidos de Hxt11p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 124: Secuencia de aminoácidos de Hxt2p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 125: Secuencia de aminoácidos de Gal2p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
20	SEQ ID NO: 126: Secuencia de aminoácidos de Hxt3-6 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	SEQ ID NO: 127: F HXT36 BcuI
	SEQ ID NO: 128: R HXT36 367NNN
	SEQ ID NO: 129: F HXT36 367NNN
	SEQ ID NO: 130: R HXT36 BamHI
25	SEQ ID NO: 131: R HXT36 BamHI-stop
	SEQ ID NO: 132: F GFP BamHI
	SEQ ID NO: 133: R GFP ClaI
	SEQ ID NO: 134: F HXT11 XbaI
	SEQ ID NO: 135: R HXT11 BamHI
30	SEQ ID NO: 136: F HXT11 366NNN
	SEQ ID NO: 137: R HXT11 366NNN
	SEQ ID NO: 138: F HXT11 N366F
	SEQ ID NO: 139: R HXT11 N366F
	SEQ ID NO: 140: F HXT11 N366E
35	SEQ ID NO: 141: R HXT11 N366E
	SEQ ID NO: 142: F HXT11 N366K
	SEQ ID NO: 143: R HXT11 N366K

SEQ ID NO: 144: F HXT11 N366M

SEQ ID NO: 145: R HXT11 N366M

SEQ ID NO: 146: F HXT11 N366W

SEQ ID NO: 147: R HXT11 N366W

5 SEQ ID NO: 148: F HXT11 N366Y

SEQ ID NO: 149: R HXT11 N366Y

Descripción detallada de la invención

10 En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluir", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", deben interpretarse de forma incluyente. Es decir, estas palabras pretenden expresar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente citados, donde lo permita el contexto. Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

15 La invención se refiere a un método de identificación de posiciones de aminoácidos de polipéptidos de hexosa permeasa, más preferentemente polipéptidos de hexosa permeasa de levadura y hongos, incluso más preferentemente en polipéptidos de permeasa Hxt o Gal2 de *Saccharomyces cerevisiae*, que pueden mutarse para alterar la especificidad por azúcares de la permeasa.

20 La invención se refiere a un polipéptido que tiene una o más sustituciones en una posición correspondiente a la posición 339 o 376 de SEQ ID NO: 59, en el que el polipéptido es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), polipéptido que es polipéptido de hexosa permeasa, en el que, cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 376, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 80 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 Δt_R, y cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 339, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 80 a 160 Å³.

25 Cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 376, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 80 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 Δt_R (T, C, V, M, L, I, F).

30 En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 80 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 40 a 100 Δt_R (C, V, M, L, I, F).

En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 90 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 Δt_R (T, V, M, L, I, F)

35 En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 100 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 60 a 100 Δt_R (V, M, L, I, F).

En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 100 a 130 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 60 a 100 Δt_R (V, M, L, I).

40 En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 120 a 130 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 60 a 100 Δt_R (M, L, I).

45 En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 120 a 130 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 80 a 100 Δt_R (L, I).

En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 100 a 130 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 60 a 80 Δt_R (V, M).

50 En una realización, la sustitución es en la posición correspondiente a 376 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 100 a 130 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 60 a 98 Δt_R (V, M, L).

En una realización, la sustitución es N376T, N376C, N376V, N376M, N376L, N376I o N376F.

Cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 339, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 80 a 160 $\text{\AA}^3$ (N, Q, H, K, R).

- 5 En una realización, el polipéptido tiene una sustitución en la posición correspondiente a 339 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 100 a 160 $\text{\AA}^3$ (Q, H, K, R).

- 10 En una realización, el polipéptido tiene una sustitución en la posición correspondiente a 339 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 0 Δt_R y un volumen de van der Waals de 100 a 160 $\text{\AA}^3$ (Q, K, R).

En una realización polipéptido tiene una sustitución en la posición correspondiente a 339 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 0 Δt_R y un volumen de van der Waals de 120 a 160 $\text{\AA}^3$ (K, R).

- 15 En una realización, el polipéptido tiene una sustitución en la posición correspondiente a 339 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 80 a 120 $\text{\AA}^3$ (N, Q, H).

En una realización, el polipéptido tiene una sustitución en la posición correspondiente a 339 y en la que el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 Δt_R y un volumen de van der Waals de 80 a 120 $\text{\AA}^3$ (N, Q).

- 20 En una realización, la sustitución es M339G, M339S, M339N, M339Q, M339H, M339K, M339R o M339V.

En una realización, el polipéptido tiene uno o más aminoácidos correspondientes a 339N/V y/o 376I/M/V.

- 25 Las permeasas pertenecen a la superfamilia de facilitadores principales (MFS). Esto se define en el presente documento más adelante. Los sistemas de transporte celular permiten la captación de nutrientes esenciales e iones, y la eliminación de productos de metabolismo y sustancias perjudiciales. Además, los sistemas de transporte desempeñan una función en la comunicación entre células y el entorno. Por tanto, son una parte esencial del sistema celular para dar o consumir moléculas que suministran energía, tales como ATP.

- 30 El transporte de solutos por transportadores activos primarios es conducido por energía en primer lugar, tal como por energía suministrada de la hidrólisis de ATP, absorción de fotones, flujo de electrones, descarboxilación de sustratos, o transferencia de metilo. Si moléculas cargadas son bombeadas en una dirección como consecuencia del consumo de una fuente de energía celular primaria, un potencial electroquímico es el resultado. Puede entonces usarse el gradiente quimiosmótico resultante para conducir el transporte de moléculas adicionales mediante estructuras de vehículo secundarias que precisamente facilitan el transporte de una o más moléculas a través de la membrana.

- 35 Las dos últimas décadas se ha aclarado la existencia de una multitud de familias de proteínas previamente desconocidas de transportadores primarios y secundarios por la emergencia de estrategias de genómica y haciendo uso de los muchos estudios bioquímicos y de genética molecular realizados. Las dos principales familias de transportadores de las que se encontraron proteínas en todos los organismos vivos son de la superficie de los casetes de unión a ATP (ABC) y la superfamilia de facilitadores principales (MFS), también conocida como la familia de uniportadores-simportadores-antiportadores. Mientras que las permeasas de la familia ABC consisten en múltiples componentes y son transportadores activos primarios, capaces de transportar tanto moléculas pequeñas como macromoléculas solo después de generar energía mediante la hidrólisis de ATP, los transportadores de MFS consisten en un único polipéptido de un vehículo secundario que facilita el transporte de pequeños solutos en respuesta a un gradiente de iones quimiosmótico. La superfamilia de ABC y las proteínas MFS explican casi la mitad de los transportadores de soluto codificados dentro de los genomas de microbio (revisado por Pao et al, 1998, Microbiol Mol Biol Rev.; 62 pp,1-34, y Saier et al, 1999, J Mol Microbiol Biotechnol, 1 pp,257-279).

Secuencias de polipéptidos de permeasa adecuadas pueden contener uno o más de los siguientes motivos:

- a) G-R-x(3)-G-x(3)-G-x(11)-E-x(5)-[LIVM]-R-G-x(12)-[GA] ;
- b) R-x(14)-G-x(2)-Y-x(2)-[YF]-[YF]-[GSAL];
- c) V-x(15)-[GNR]-[RH]-R-x(2)-[LM]-x(2)-[GA]

- 50 El motivo (a) se corresponde con los restos 179-221 en el motivo Gal2; (b) se corresponde con los restos 330-353 en el motivo Gal2; (c) se corresponde con los restos 375-399 en Gal2.

En una realización, el polipéptido comprende un motivo G-R-x(3)-G-x(3)-G-x(11)-Ex(5)-[LIVM]-R-G-x(12)-[GA].

El método reivindicado comprende modelar una secuencia de polipéptidos de permeasa en la estructura cristalina publicada de la xilosa permeasa XylE de *Escherichia coli* unida a xilosa o glucosa (respectivamente, PDB código 4GBY y 4GBZ en la base de datos PDB, <http://www.pdb.org>) para identificar las posiciones de aminoácidos en el canal de la permeasa que interaccionan directamente con el azúcar unido (llamado los restos de la primera envuelta en la materia), y los restos que interaccionan con los restos de la primera envuelta (llamados los restos de la segunda envuelta en la materia). Software de modelado adecuado para construir tales modelos son YASARA, Prime (Schrodinger Inc.) o MODELLER usando los parámetros por defecto. Alternativamente, las posiciones de primera y segunda envuelta que alteran la especificidad por azúcares de los aminoácidos en una secuencia de polipéptidos de permeasa pueden identificarse por un alineamiento por pares global de la secuencia de permeasa con la secuencia de Gal2 SEQ ID NO: 59 usando el protocolo de NEEDLE descrito más adelante. Un alineamiento de ejemplo para Gal2 y Hxt de *Saccharomyces cerevisiae* se da en la Figura 10, que muestra cómo puede usarse el alineamiento para identificar las posiciones de aminoácidos correspondientes en los diferentes Hxt de levadura. Así, las posiciones de aminoácidos en el presente documento se refieren a SEQ ID NO: 59 que describe Gal2 o a posiciones de aminoácidos correspondientes en otros polipéptidos, en particular otros polipéptidos de permeasa. Por ejemplo, la posición correspondiente de la posición N376 en Gal2 (SEQ ID NO: 59) en Hxt1 es N370, en Hxt2 N361, en Hxt3 N367, en Hxt4SC N376, en Hxt4RN N376, en Hxt5 N391, en Hxt6/7 N370, en Hxt8 N372, en Hxt9 N366, en Hxt10 N354, en Hxt11 N366, en Hxt12 N256, en Hxt13 N363, en Hxt14 N387, en Hxt15 N366, en Hxt16 N366 y en Hxt17 N363. Similarmente, la posición correspondiente de N346 en Gal2 (SEQ ID NO: 9) en Hxt1 es D340, en Hxt2 N331, en Hxt3 D337, en Hxt4SC D346, en Hxt4RN D346, en Hxt5 D361, en Hxt6/7 D340, en Hxt8 D342, en Hxt9 D336, en Hxt10 C324, en Hxt11 D336, en Hxt12 D226, en Hxt13 E333, en Hxt14 I357, en Hxt15 E336, en Hxt16 E336 y en Hxt17 E333. Esto puede hacerse similarmente para otros transportadores de la superfamilia MFS, de manera que puedan obtenerse posiciones correspondientes en estos polipéptidos correspondientes a las posiciones en SEQ ID NO: 59. Esto está respaldado por los datos de los Ejemplos 6-20,

Un experto en la materia puede mutar posteriormente las posiciones de aminoácidos identificadas en el polipéptido de permeasa a los otros 19 aminoácidos, y cribar para la captación mejorada de azúcar C5 y/o captación reducida de azúcar C6 de la permeasa mutante, como se describe en el Ejemplo 4 y 5.

Por ejemplo, para un polipéptido que tiene una mutación en una posición correspondiente a una o más posiciones correspondientes a N376 de SEQ ID NO: 59, las mutaciones en las posiciones correspondientes a N376 pueden ser una sustitución con C, P, G, A, V, L, I, M, F, W, Y, H, S, T, N, Q, D, E, K, R o una delección. X puede ser cualquier aminoácido, X(2) significa dos X.

En el presente documento, Gal2 es un transportador de la difusión facilitado requerido para tanto los procesos de transporte de galactosa dependientes de galactocinasa de alta afinidad como independientes de galactocinasa de baja afinidad. Pertenece a la superfamilia de facilitadores importantes, familia de transportadores de azúcar (TC 2.A.1.1). "Polipéptido de permeasa" también se designa en el presente documento como "polipéptido permeasa" o "polipéptido". "Polinucleótido de polipéptido de permeasa" es en el presente documento un polinucleótido que codifica el polipéptido de permeasa.

En una realización de la invención, el polipéptido de permeasa tiene al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 59.

En el presente documento, las mutaciones se indican por aminoácidos de una letra y las posiciones de estos aminoácidos. Por ejemplo, A6 en el presente documento indica un aminoácido (código de una letra) en una cierta posición en SEQ ID NO: 59, aquí A (Alanina) en la posición 6 de la proteína. A6 (L/N/Q/G/V/I/Y/S/E/K) indica en el presente documento la mutación de aminoácido en una cierta posición, aquí A (Alanina) en la posición 6 de la proteína se intercambia por cualquiera de L (Leucina), N (Asparagina), Q (Glutamina), G (Glicina), V (Valina), I (Isoleucina), Y (Tirosina), S (Serina), E (Ácido glutámico) o K (Lisina).

En una realización, el polipéptido tiene actividad de transporte de xilosa.

En una realización, el polipéptido tiene afinidad reducida por la glucosa en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 59.

El polipéptido de permeasa de la invención puede tener una o más actividades alternativas y/o adicionales distintas de la actividad de permeasa de azúcar.

Como se explica anteriormente, un polipéptido de permeasa de la invención normalmente tendrá actividad de permeasa de azúcar. Sin embargo, un polipéptido de permeasa de la invención puede tener una o más de las actividades explicadas anteriormente, además de o alternativa a esa actividad.

Secuencia de polinucleótidos

Con el polipéptido de permeasa y su secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento, el experto puede determinar polinucleótidos adecuados que codifican el polipéptido de permeasa.

5 En una realización el polinucleótido es un polinucleótido de variante que tiene al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 56, y codifica el polipéptido como se describe en las reivindicaciones 1 a 11.

10 La invención, por tanto, proporciona secuencias de polinucleótidos que comprenden el gen que codifica el polipéptido de permeasa, además de su secuencia codificante.

15 Los polinucleótidos de la invención pueden aislarse o sintetizarse. Los polipéptidos de permeasa y polinucleótidos de polipéptidos de permeasa en el presente documento pueden ser polipéptidos sintéticos, respectivamente polinucleótidos. Los polinucleótidos sintéticos pueden optimizarse en el uso de codones, preferentemente según los métodos descritos en los documentos WO2006/077258 y/o PCT/EP2007/055943 que tratan la optimización del par de codones.

El término se refiere a una molécula de polinucleótido, que es una molécula de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), ya sea monocatenaria o bicatenaria. Un polinucleótido puede o bien estar presente en forma aislada, o estar comprendido en moléculas de ácido nucleico recombinantes o vectores, o estar comprendido en una célula hospedadora.

20 La palabra "polipéptido" se usa en el presente documento para cadenas que contienen más de siete restos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos en el presente documento se escriben de izquierda a derecha y en la dirección de extremo amino a extremo carboxi. El código de una letra de aminoácidos usado en el presente documento es comúnmente conocido en la técnica.

25 Por polipéptido "aislado" o proteína está previsto un polipéptido o proteína sacado de su entorno nativo. Por ejemplo, polipéptidos recombinantemente producidos y proteínas expresadas en células hospedadoras se consideran aislados con el fin de la invención ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación de una sola etapa desvelado en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

30 Los polinucleótidos de la presente invención, tales como un polinucleótido que codifica el polipéptido de permeasa, pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en el presente documento.

35 El polinucleótido que codifica el polipéptido de permeasa de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas de amplificación por PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencias de ADN.

Transformación

40 Los polinucleótidos según la invención pueden expresarse en un hospedador adecuado. Así, la invención se refiere a una célula hospedadora transformada. En una realización, la célula hospedadora puede transformarse con una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido según la invención definido antes. Por tanto, pueden usarse técnicas de transformación estándar.

En una realización, la célula hospedadora transformada comprende un nucleótido heterólogo que codifica un polipéptido según la reivindicación 1 o codifica un polipéptido que tiene la sustitución F85Q/V, T89V, V187A/F, I218S, T219A, Q341S/A, N346V, T380A, F444L/V, T448A, T449F, T451G o W455M de secuencia ID NO: 59, y en una realización del mismo la célula hospedadora es *Saccharomyces cerevisiae*.

45 En una realización, el hospedador transformado se transforma con un polinucleótido que codifica un polipéptido que es un mutante de un polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada.

En una realización, el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un miembro de los transportadores de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y un polipéptido transportador de hexosa.

50 En una realización, el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un polipéptido transportador elegido de la lista que consiste en Gal2, Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt5, Hxt6, Hxt7, Hxt8, Hxt9, Hxt10, Hxt11, Hxt12, Hxt13, Hxt14, Hxt15, Hxt16 y Hxt17.

En una realización, el polipéptido de la invención no tiene el resto de aminoácido X (X puede ser cualquier aminoácido) en una posición A dada (A puede ser cualquier posición específica en el polipéptido en SEQ ID NO: 59,

donde X es una mutación en SEQ ID NO: 59, cuando X es nativo en la posición correspondiente a A en un segundo polipéptido de la familia de MFS.

5 En una realización, el polipéptido no tiene el resto de aminoácido S, que se corresponde con M339S en SEQ ID NO: 59, en la posición correspondiente en HXT1 (es decir, no 333S en HXT1), en HXT2 (es decir, no 324S en HXT2), en HXT3 (es decir, no 330S en HXT3), en HXT4 (es decir, no 339S en HXT4), en HXT5 (es decir, no 354S en HXT5), en HXT6 o en HXT7 (es decir, no 333S en HXT6 o HXT7), en HXT8 (es decir, no 335S en HXT8), en HXT9 (es decir, no 329S en HXT9), en HXT10 (es decir, no 317S en HXT10) o en HXT11 (es decir, no 329S en HXT11).

10 En una realización, el polipéptido es un HXT3-6 mutante y tiene una o más sustituciones en HXT3-6. En una realización del mismo, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A/C/D/F/G/I/L/M/S/T/V de SEQ ID NO: 126. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A/I de SEQ ID NO: 126. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A de SEQ ID NO: 126.

15 En una realización, el polipéptido es un HXT11 mutante y tiene una o más sustituciones en HXT11. En una realización del mismo, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366A/C/D/F/G/I/L/M/S/T/V de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido es un HXT11 mutante. En una realización el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366/F/I/L/M/T/V de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366D/M/T de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366M/T de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366M/T o N366T de SEQ ID NO: 123.

20 El término se refiere a una molécula de polinucleótido, que es una molécula de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), ya sea monocatenaria o bicatenaria. Un polinucleótido puede o bien estar presente en forma aislada, o estar comprendido en moléculas de ácido nucleico recombinantes o vectores, o estar comprendido en una célula hospedadora.

25 La palabra "polipéptido" se usa en el presente documento para cadenas que contienen más de siete restos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos en el presente documento se escriben de izquierda a derecha y en la dirección de extremo amino a extremo carboxi. El código de una letra de aminoácidos usado en el presente documento es comúnmente conocido en la técnica.

30 Por polipéptido "aislado" o proteína está previsto un polipéptido o proteína sacado de su entorno nativo. Por ejemplo, polipéptidos recombinantemente producidos y proteínas expresadas en células hospedadoras se consideran aislados con el fin de la invención ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación de una sola etapa desvelado en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

35 Los polinucleótidos de la presente invención, tales como un polinucleótido que codifica el polipéptido de permeasa, pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en el presente documento.

40 El polinucleótido que codifica el polipéptido de permeasa de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, como molde y cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas de amplificación por PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencias de ADN.

Transformación

45 Los polinucleótidos según la invención pueden expresarse en un hospedador adecuado. Así, la invención se refiere a una célula hospedadora transformada. En una realización, la célula hospedadora puede transformarse con una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido según la invención definido antes. Por tanto, pueden usarse técnicas de transformación estándar.

En una realización, la célula hospedadora transformada comprende un nucleótido heterólogo que codifica un polipéptido según la reivindicación 1 o codifica un polipéptido que tiene la sustitución F85Q/V, T89V, V187A/F, I218S, T219A, Q341S/A, N346V, T380A, F444L/V, T448A, T449F, T451G o W455M de secuencia ID NO: 59, y en una realización del mismo la célula hospedadora es *Saccharomyces cerevisiae*.

50 En una realización, el hospedador transformado se transforma con un polinucleótido que codifica un polipéptido que es un mutante de un polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada.

En una realización, el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un miembro de los transportadores de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), en una realización un polipéptido transportador de hexosa.

En una realización, el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un polipéptido transportador elegido de la lista que consiste en Gal2, Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt5, Hxt6, Hxt7, Hxt8, Hxt9, Hxt10, Hxt11, Hxt12, Hxt13, Hxt14, Hxt15, Hxt16 y Hxt17.

5 En una realización, el polipéptido de la invención no tiene el resto de aminoácido X (X puede ser cualquier aminoácido) en una posición A dada (A puede ser cualquier posición específica en el polipéptido en SEQ ID NO: 59, donde X es una mutación en SEQ ID NO: 59, cuando X es nativo en la posición correspondientes a A en un segundo polipéptido de la familia de MFS.

10 En una realización, el polipéptido no tiene el resto de aminoácido S, que se corresponde con M339S en SEQ ID NO: 59, en la posición correspondiente en HXT1 (es decir, no 333S en HXT1), en HXT2 (es decir, no 324S en HXT2), en HXT3 (es decir, no 330S en HXT3), en HXT4 (es decir, no 339S en HXT4), en HXT5 (es decir, no 354S en HXT5), en HXT6 o en HXT7 (es decir, no 333S en HXT6 o HXT7), en HXT8 (es decir, no 335S en HXT8), en HXT9 (es decir, no 329S en HXT9), en HXT10 (es decir, no 317S en HXT10) o en HXT11 (es decir, no 329S en HXT11).

15 En una realización, el polipéptido es un HXT3-6 mutante y tiene una o más sustituciones en HXT3-6. En una realización del mismo, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A/C/D/F/G/I/L/M/S/T/V de SEQ ID NO: 126. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A/I de SEQ ID NO: 126. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N367A de SEQ ID NO: 126.

20 En una realización, el polipéptido es un HXT11 mutante y tiene una o más sustituciones en HXT11. En una realización del mismo, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366A/C/D/F/G/I/L/M/S/T/V de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido es un HXT11 mutante. En una realización el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366/F/I/L/M/T/V de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366D/M/T de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366M/T de SEQ ID NO: 123. En una realización, el polipéptido tiene sustituciones correspondientes a N366M/T o N366T de SEQ ID NO: 123.

Co-consumo

30 En una realización, el hospedador transformado es capaz de co-consumo de glucosa y al menos una pentosa. Esta pentosa puede ser arabinosa o xilosa, en una realización es xilosa. El co-consumo (o co-fermentación) de dos sustratos se define en el presente documento como una captación y conversión intracelular simultánea de dos fuentes de carbono diferentes (por ejemplo, xilosa y glucosa), a un nivel apreciable. Dichas fuentes de carbono se convierten simultáneamente en productos, tales como, por ejemplo, biomasa, etanol, glicerol, y similares.

35 El co-consumo de una célula se cuantifica y expresa en el presente documento como el índice de co-consumo. El índice de co-consumo es en el presente documento el índice de co-consumo para glucosa y xilosa y se calcula como la suma durante el intervalo de tiempo de 0-24 horas (medido a 0, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas) de la diferencia absoluta de la tasa de captación de glucosa (Qg) y la tasa de captación de xilosa (Qx), expresada como gramos de azúcar consumidos por unidad de tiempo, en una fermentación de cultivo discontinuo anaerobio a 1,0 g/l de alquitrán de levadura seca, 30 °C de temperatura y en la que el medio de fermentación contiene 71,8 gramos de glucosa por litro y 40,0 gramos de xilosa por litro, al inicio de la fermentación. Véanse los Ejemplos 16-18.

40 En una realización, el índice de co-consumo de la célula hospedadora transformada es 27 g/h o menos, 25 g/h o menos, 23 g/h o menos, 20 g/h o menos, 18 g/h o menos, 16 g/h o menos, 14 g/h o menos, o 12 g/h o menos,

La invención se refiere además a una construcción de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido como se describe antes, por ejemplo un vector.

45 Otro aspecto de la invención se refiere entonces a vectores, que incluyen vectores de clonación y de expresión, que comprenden un polinucleótido de la invención que codifica un polipéptido de proteína permeasa o un equivalente funcional del mismo y métodos de cultivo, transformación o transfección de tales vectores en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo en condiciones en las que la expresión de una permeasa de la invención se produce. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

50 Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector recombinante replicable, por ejemplo un vector de clonación o de expresión. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y cultivando la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula hospedadora. Células hospedadoras adecuadas se describen más adelante.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Los vectores, tales como vectores de expresión, de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para así producir proteínas o péptidos, codificadas por ácidos nucleicos como se describen en el presente documento. Los vectores, tales como los vectores de expresión recombinantes, de la invención pueden diseñarse para la expresión de proteínas de permeasa en células procariotas o eucariotas.

Por ejemplo, los polipéptidos de permeasa pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), hongos filamentosos, células de levadura o células de mamífero. Células hospedadoras adecuadas se tratan además en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Ejemplos representativos de hospedadores apropiados se describen más adelante.

Se conocen en la técnica medios de cultivo apropiados y condiciones para las células hospedadoras anteriormente descritas.

Para la mayoría de los hongos filamentosos y levadura, el vector o construcción de expresión se integra preferentemente en el genoma de la célula hospedadora con el fin de obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras también están disponibles vectores episómicos adecuados en los que la construcción de expresión puede incorporarse para la expresión estable y de alto nivel, ejemplos de los mismos incluyen vectores derivados de los plásmidos 2 μ y pKD1 de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, respectivamente, o vectores que contienen una secuencia AMA (por ejemplo, AMA1 de *Aspergillus*). En caso de que las construcciones de expresión se integren en el genoma de células hospedadoras, las construcciones son o bien integradas en loci al azar en el genoma, o en loci diana predeterminados usando recombinación homóloga, en cuyo caso los loci diana comprenden preferentemente un gen altamente expresado.

Por consiguiente, vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófago, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus de la variolovacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudovirus de la rabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como aquellos derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos.

Cuando el polipéptido según la invención va a secretarse de la célula hospedadora en el medio de cultivo, puede añadirse una secuencia señal apropiada al polipéptido con el fin de dirigir el polipéptido sintetizado *de novo* a la vía de secreción de la célula hospedadora. El experto en la materia conoce seleccionar una secuencia señal apropiada para un hospedador específico.

El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido que dan lugar a ARN que comprenden secuencias homólogas a secuencias genómicas eucariotas o secuencias genómicas virales. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de una célula hospedadora.

Un vector de clonación integrativo puede integrarse al azar o en un locus diana predeterminado en el (los) cromosoma(s) de la célula hospedadora en la que va a integrarse.

El sistema de vector puede ser un vector único, tal como un único plásmido, o dos o más vectores, tales como dos o más plásmidos, que juntos contienen el ADN total que va a introducirse en el genoma de la célula hospedadora.

El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección antisentido para proporcionar la producción de ARN antisentido.

El ADN de vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o de transfección convencionales. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas conocidas en la materia para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, que incluye co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípidos catiónicos o electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) y otros manuales de laboratorio.

Como se indica antes, la invención proporciona un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 59 con las mutaciones indicadas en la reivindicación 1.

El polipéptido de permeasa según la invención puede recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes por métodos conocidos en la técnica. Lo más preferentemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Polipéptidos de la presente invención incluyen productos naturalmente purificados, productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota, que incluyen, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamífero. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glucosilados o pueden estar no glucosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de los procesos mediados por hospedador.

La invención también caracteriza fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos según la invención.

También se proporcionan células hospedadoras, que comprenden un polinucleótido o vector de la invención. El polinucleótido puede ser heterólogo al genoma de la célula hospedadora. El término "heterólogo", normalmente con respecto a la célula hospedadora, significa que el polinucleótido no se produce naturalmente en el genoma de la célula hospedadora o que el polipéptido no es naturalmente producido por esa célula.

En otra realización, la invención caracteriza células, por ejemplo, células hospedadoras transformadas o células hospedadoras recombinantes que contienen un ácido nucleico englobado por la invención. Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en un ancestro de la que) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico según la invención. Están incluidas tanto células procariotas como eucariotas, por ejemplo, bacterias, hongos, levadura, y similares, especialmente se prefieren células de levadura que incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*.

Puede elegirse una célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en un modo deseado específico. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína.

Diversas células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o sistemas hospedadores familiares para aquellos expertos en la materia de la biología molecular y/o la microbiología para garantizar la modificación deseada y correcta y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras son muy conocidas en la técnica.

Si se desea, puede usarse una célula como se ha descrito anteriormente en la preparación de un polipéptido según la invención. Un método tal normalmente comprende cultivar una célula hospedadora (por ejemplo, transformada o transfectada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente) en condiciones para proporcionar la expresión (por el vector) de una secuencia codificante que codifica el polipéptido, y opcionalmente recuperar el polipéptido expresado. Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector recombinante replicable, por ejemplo, un vector de expresión. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de un polinucleótido de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y cultivando la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula hospedadora.

Los vectores pueden transformarse o transfectarse en una célula hospedadora adecuada como se ha descrito anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en condiciones para proporcionar la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica el polipéptido.

En el presente documento se usan técnicas de aislamiento, hibridación, transformación y clonación estándar (por ejemplo, como se describen en Sambrook, J., Fritsh, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Homología e identidad

Se dice que secuencias de aminoácidos o de nucleótidos son homólogas cuando presentan un cierto nivel de similitud. Dos secuencias que son homólogas indican un origen evolutivo común. Si dos secuencias homólogas están estrechamente relacionadas o más distantemente relacionadas se indica por el "porcentaje de identidad" o "porcentaje similitud", que es alto o bajo, respectivamente. Aunque es cuestionado, para indicar "porcentaje de identidad" o "porcentaje similitud", frecuentemente se usan indistintamente "nivel de homología" o "porcentaje de homología".

Puede llevarse a cabo una comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. El experto conocerá el hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para alinear dos secuencias y determinar la homología entre las dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) Un visión general de la comparación de secuencias en D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), *Time*

warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley). Puede determinarse el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). El algoritmo alinea secuencias de aminoácidos, además de secuencias de nucleótidos. El algoritmo de Needleman-Wunsch ha sido implementado en el programa informático NEEDLE. Con el fin de la presente invención se usó el programa de NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias de proteínas, se usa EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para secuencias de nucleótidos, se usa EDNAFULL. Pueden especificarse otras matrices. Los parámetros opcionales usados para el alineamiento de secuencias de aminoácidos son una penalización por abertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente si se usan diferentes algoritmos.

Definición de homología global

La homología o identidad es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias completas a lo largo de la región alineada total que incluye cualquier hueco o extensión. La homología o identidad entre las dos secuencias alineadas se calcula del siguiente modo: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento que incluye los huecos. La identidad definida como en el presente documento puede obtenerse de NEEDLE y está marcada en la salida del programa como "IDENTIDAD".

Definición de identidad más larga

La homología o identidad entre las dos secuencias alineadas se calcula del siguiente modo: Número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestran un aminoácido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento después de la resta del número total de huecos en el alineamiento. La identidad definida como en el presente documento puede obtenerse de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y está marcada en la salida del programa como "Identidad más larga".

Las diversas realizaciones de la invención descrita en el presente documento pueden ser combinadas de forma cruzada.

La composición de azúcares

La composición de azúcares según la invención comprende glucosa, arabinosa y xilosa. Puede usarse cualquier composición de azúcares en la invención que cumpla aquellos criterios. Azúcares opcionales en la composición de azúcares son galactosa y manosa. En una realización preferida, la composición de azúcares es un hidrolizado de uno o más materiales lignocelulósicos. Lignocelulosa en el presente documento incluye hemicelulosa y partes de hemicelulosa de biomasa. Lignocelulosa también incluye fracciones lignocelulósicas de biomasa. Materiales lignocelulósicos adecuados pueden encontrarse en la siguiente lista: iniciadores de huerta, chaparral, desechos de molino, desechos de madera urbanos, residuos municipales, residuos de podas, materiales de poda de bosques, cultivos de arbolados de rotación corta, residuos industriales, paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, cáscaras de soja, cáscaras de arroz, paja de arroz, pienso de gluten de trigo, cáscaras de avena, caña de azúcar, tallos y hojas de maíz, cañas de maíz, mazorcas de maíz, vainas de maíz, pasto varilla, miscanthus, sorgo dulce, tallos de colza, tallos de soja, pasto de pradera, pasto gama, cola de zorro; pulpa de remolacha dulce, pulpa de frutas cítricas, cáscaras de semillas, residuos animales celulósicos, recortes de césped, algodón, algas marinas, árboles, madera blanda, madera dura, álamo, pino, arbustos, hierbas, trigo, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, maíz, vainas de maíz, mazorcas de maíz, grano de maíz, fibra de granos, productos y subproductos de la molienda en seco o húmedo de granos, residuos sólidos municipales, papel residual, residuos de jardinería, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, papel residual, pulpa, residuos de molienda de papel, ramas, arbustos, cañas, maíz, vainas de maíz, un cultivo energético, bosque, una fruta, una flor, un grano, una hierba, un cultivo herbáceo, una hoja, corteza, una espina, un tronco, una raíz, un árbol joven, un matorral, pasto varilla, un árbol, una verdura, piel de fruta, una vid, pulpa de remolacha azucarera, cascarrillas de trigo, cáscaras de avena, madera dura o blanda, material de residuos orgánicos generado de un proceso agrícola, residuos de madera de silvicultura, o una combinación de cualesquiera dos o más de los mismos.

Una visión general de algunas composiciones de azúcares adecuadas derivadas de lignocelulosa y la composición de azúcares de sus hidrolizados se da en la Tabla 1. Las lignocelulosas enumeradas incluyen: mazorcas de maíz, fibra de maíz, cáscaras de arroz, cáscaras de melón, pulpa de remolacha azucarera, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, madera, pasto y prensados de aceituna.

Tabla 1: Visión general de las composiciones de azúcares de materiales lignocelulósicos. Gal=galactosa, Xil=xilosa, Ara=arabinosa, Man=manosa, Glu=glucosa, Ram=ramnosa. Se da el porcentaje de galactosa (% de Gal) y la fuente bibliográfica.

Material lignocelulósico	Gal	Xil	Ara	Man	Glu	Ram	Suma	% de Gal.
Mazorca de maíz a	10	286	36		227	11	570	1,7
Mazorca de maíz b	131	228	160		144		663	19,8
Cáscaras de arroz a	9	122	24	18	234	10	417	2,2
Cáscaras de arroz b	8	120	28		209	12	378	2,2
Cáscaras de melón	6	120	11		208	16	361	1,7
Pulpa de remolacha azucarera	51	17	209	11	211	24	523	9,8
Paja de trigo Idaho	15	249	36		396		696	2,2
Fibra de maíz	36	176	113		372		697	5,2
Bagazo de caña de azúcar	14	180	24	5	391		614	2,3
Hojas y tallos de maíz	19	209	29		370		626	
Athel (madera)	5	118	7	3	493		625	0,7
Eucalipto (madera)	22	105	8	3	445		583	3,8
CWR (pasto)	8	165	33		340		546	1,4
JTW (pasto)	7	169	28		311		515	1,3
MSW	4	24	5	20	440		493	0,9
Vegetación de pasto alpiste	16	117	30	6	209	1	379	4,2
Semilla de pasto alpiste	13	163	28	6	265	1	476	2,7
Residuos del prensado de aceitunas	15	111	24	8	329		487	3,1

5 Es evidente de la Tabla 1 que en estas lignocelulosas una alta cantidad de azúcar está presente en forma de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. La conversión de glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa en el producto de fermentación es así de gran importancia económica. También está presente manosa en algunos materiales de lignocelulosa, aunque normalmente en cantidades más bajas que los azúcares previamente mencionados. Ventajosamente, por tanto, también se convierte manosa por la célula hospedadora transformada.

10 La célula hospedadora transformada

En una realización, la célula hospedadora transformada puede comprender una o más copias del gen xilosa isomerasa y/o una o más copias de xilosa reductasa y/o xilitol deshidrogenasa, y dos a diez copias de genes *araA*, *araB* y *araD*, en los que estos genes están integrados en el genoma de la célula.

15 En una realización, la célula hospedadora transformada comprende genes, por ejemplo el gen xilosa isomerasa anterior y/o una o más copias de xilosa reductasa y/o xilitol deshidrogenasa, y dos a diez copias de genes *araA*, *araB* y *araD*, están integrados en el genoma de la célula hospedadora transformada.

El número de copias puede ser determinado por el experto por cualquier método conocido. En los ejemplos se describe un método adecuado.

20 En una realización, la célula hospedadora transformada es capaz de fermentar glucosa, arabinosa, xilosa y galactosa.

En una realización, la célula es capaz de convertir el 90 % o más de glucosa, xilosa arabinosa, galactosa y manosa disponible en un producto de fermentación. En una realización, la célula es capaz de convertir el 91 % o más, el 92 % o más, el 94 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más o el 100 % de toda la glucosa, xilosa arabinosa, galactosa y manosa disponible en un producto de fermentación.

En una realización de la invención, la célula hospedadora transformada es capaz de fermentar uno o más azúcares adicionales, preferentemente azúcar C5 y/o C6, por ejemplo, manosa. En una realización de la invención, la célula hospedadora transformada comprende uno o más de: un gen *xylA*, gen *XYL1* y gen *XYL2* y/o gen *XKS1*, para permitir que la célula hospedadora transformada fermente xilosa; delección del gen de aldosa reductasa (*GRE3*); expresión en exceso de los genes de PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RKI1* para permitir el aumento del flujo a través de la vía de la pentosa fosfato en la célula.

En una realización, la célula hospedadora transformada es una célula industrial, más preferentemente una levadura industrial. Una célula industrial y célula de levadura industrial puede definirse del siguiente modo. Los entornos vivos de células (de levadura) en procesos industriales son significativamente diferentes de aquellos en el laboratorio. Células de levadura industriales deben ser capaces de rendir bien en múltiples condiciones medioambientales que pueden variar durante el proceso. Tales variaciones incluyen cambio en las fuentes de nutriente, pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de oxígeno, etc., que juntos tienen el potencial de tener un impacto sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. En condiciones industriales adversas, las cepas tolerantes medioambientales deben permitir el crecimiento y la producción robustos. Las cepas de levadura industriales son generalmente más robustas hacia estos cambios en condiciones medioambientales que pueden producirse en las aplicaciones en las que se usan, tales como en la industria de la panadería, industria cervecera, viticultura y la industria del etanol. En una realización, la célula hospedadora transformada industrial se construye basándose en una célula hospedadora industrial, en la que la construcción se realiza como se describe en lo sucesivo. Ejemplos de levadura industrial (*S. cerevisiae*) son Ethanol Red® (Fermentis), Fermiol® (DSM) y Thermosacc® (Lallemand).

En una realización, la célula hospedadora transformada es tolerante a inhibidor. La tolerancia a inhibidor es resistencia a inhibir compuestos. La presencia y nivel de compuestos inhibidores en lignocelulosa puede variar ampliamente con la variación de materia prima, proceso de hidrólisis del método de pretratamiento. Ejemplos de categorías de inhibidores son ácidos carboxílicos, furanos y/o compuestos fenólicos. Ejemplos de ácidos carboxílicos son ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Ejemplos de furano son furfural e hidroximetilfurfural. Ejemplos de compuestos fenólicos son vainillina, ácido sirínico, ácido ferúlico y ácido cumárico. Las cantidades típicas de inhibidores son para ácidos carboxílicos: varios gramos por litro, hasta 20 gramos por litro o más, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis. Para furanos: varios cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis.

Para fenólicos: varias decenas de miligramos por litro, hasta un gramo por litro, dependiendo de la materia prima, el pretratamiento y las condiciones de hidrólisis.

Las células hospedadoras transformadas según la invención pueden ser tolerantes a inhibidor, es decir, pueden resistir a inhibidores comunes al nivel que normalmente tienen con condiciones de pretratamiento e hidrólisis comunes, de manera que las células hospedadoras transformadas pueden encontrar una amplia aplicación, es decir, tiene alta aplicabilidad para diferente materia prima, diferentes métodos de pretratamiento y diferentes condiciones de hidrólisis.

En una realización, la célula hospedadora transformada industrial se construye basándose en una célula hospedadora tolerante a inhibidor, en la que la construcción se realiza como se describe en lo sucesivo. Pueden seleccionarse células hospedadoras tolerantes a inhibidor seleccionando cepas para el crecimiento sobre inhibidores que contienen materiales, tal como se ilustra en Kadar et al., Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, en el que se seleccionó una cepa de *S. cerevisiae* tolerante a inhibidor ATCC 26602.

En una realización, la célula hospedadora transformada está libre de marcador. Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección de, o el cribado de, una célula hospedadora que contiene el marcador. Libre de marcador significa que los marcadores están esencialmente ausentes en la célula hospedadora transformada. El estar libre de marcador es particularmente ventajoso cuando se han usado marcadores de antibiótico en la construcción de la célula hospedadora transformada y se eliminan a partir de aquí. La eliminación de marcadores puede hacerse usando cualquier técnica del estado de la técnica adecuada, por ejemplo, recombinación intramolecular. Un método adecuado de la eliminación de marcadores se ilustra en los ejemplos.

Una célula hospedadora transformada puede ser capaz de convertir biomasa de planta, celulosas, hemicelulosas, pectinas, almidón, derivados de almidón, por ejemplo en azúcares fermentables. Por consiguiente, una célula hospedadora transformada puede expresar una o más enzimas tales como una celulasa (una endocelulasa o una exocelulasa), una hemicelulasa (una endo- o exo-xilanasas o arabinasas) necesaria para la conversión de celulosa en monómeros de glucosa y hemicelulosa en xilosa y monómeros de arabinosa, una pectinasa capaz de convertir pectinas en ácido glucurónico y ácido galacturónico o una amilasa para convertir almidón en monómeros de glucosa.

La célula hospedadora transformada puede comprender además aquellas actividades enzimáticas requeridas para la conversión de piruvato en un producto de fermentación deseado, tal como etanol, butanol, ácido láctico, di-terpeno, di-terpeno glucosilado, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido

fumárico, ácido málico, ácido itacónico, un aminoácido, 1,3-propanodiol, etileno, glicerol, un antibiótico β -lactámico o una cefalosporina.

5 En una realización, la célula hospedadora transformada es una célula que es naturalmente capaz de fermentación alcohólica, preferentemente, fermentación alcohólica anaerobia. Una célula hospedadora transformada tiene preferentemente una alta tolerancia a etanol, una alta tolerancia a pH bajo (es decir, capaz de crecimiento a un pH inferior a aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2,5) y hacia productos orgánicos y/o una alta tolerancia a temperaturas elevadas.

Cualquiera de las características o actividades anteriores de una célula hospedadora transformada puede estar naturalmente presente en la célula o puede introducirse o modificarse por modificación genética.

10 Construcción de la cepa hospedadora transformada

Según una realización, los genes pueden introducirse en la célula hospedadora introduciendo en una célula hospedadora:

- a) una agrupación que consiste en los genes *araA*, *araB* y *araD* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte
- 15 b) una agrupación que consiste en los genes de PPP *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* y *RKI1*, opcionalmente bajo el control de promotor constitutivo fuerte; y delección de un gen de aldosa reductasa;
- c) una agrupación que consiste en un gen *xyIA* y un gen *XKS1* bajo el control de promotor constitutivo fuerte;
- d) una construcción que comprende un gen *xyIA* bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, que tiene la capacidad de integrarse en el genoma en múltiples loci;
- 20 y evolución adaptativa para producir la célula hospedadora transformada. La célula anterior puede construirse usando técnicas de expresión recombinante.

Expresión recombinante

25 La célula hospedadora transformada es una célula recombinante. Es decir, una célula hospedadora transformada comprende, o se transforma con o se modifica genéticamente con una secuencia de nucleótidos que no se produce en la célula en cuestión.

Técnicas para la expresión recombinante de enzimas en una célula, además de para las modificaciones genéticas adicionales de una célula hospedadora transformada, son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Normalmente, tales técnicas implican la transformación de una célula con construcción de ácidos nucleicos que comprende la secuencia relevante. Tales métodos se conocen, por ejemplo, de manuales estándar, tales como

30 Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, o F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987). Métodos para la transformación y modificación genética de células hospedadoras se conocen de, por ejemplo, los documentos EP-A-0635 574, WO 98/46772, WO 99/60102, WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6.265.186.

35 Normalmente, la construcción de ácidos nucleicos puede ser un plásmido, por ejemplo, un plásmido de copia baja o un plásmido de copia alta. La célula según la presente invención puede comprender una única copia o múltiples copias de la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima, por ejemplo, por múltiples copias de una construcción de nucleótidos o por el uso de la construcción que tiene múltiples copias de la secuencia de enzima.

40 La construcción de ácidos nucleicos puede mantenerse episómicamente y así comprender una secuencia para la replicación autónoma, tal como una secuencia de secuencia de replicación autosómica. Una construcción episómica adecuada de ácidos nucleicos puede basarse, por ejemplo, en los plásmidos 2 μ o pKD1 de levadura (Gleer et al., 1991, Biotechnology 9:968-975), o los plásmidos AMA (Fierro et al., 1995, Curr Genet. 29:482-489). Alternativamente, cada construcción de ácidos nucleicos puede integrarse en una o más copias en el genoma de la célula. La integración en el genoma de la célula puede producirse al azar por recombinación no homóloga, pero

45 preferentemente, la construcción de ácidos nucleicos puede integrarse en el genoma de la célula por recombinación homóloga como es muy conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635 574 y US 6.265.186).

La mayoría de los plásmidos episómicos o 2 μ son relativamente inestables en levadura, perdiéndose en aproximadamente 10⁻² o más células después de cada generación. Incluso en condiciones de crecimiento selectivo,

50 solo del 60 % al 95 % de las células retienen el plásmido episómico. El número de copias de la mayoría de los plásmidos episómicos oscila de 20-100 por célula de hospedadores cir⁺. Sin embargo, los plásmidos no están igualmente distribuidos entre las células, y hay una alta varianza en el número de copias por célula en las poblaciones. Cepas transformadas con plásmidos integrativos son extremadamente estables, incluso en ausencia de presión selectiva. Sin embargo, puede producirse pérdida de plásmidos en aproximadamente 10⁻³ a 10⁻⁴ frecuencias

por recombinación homóloga entre ADN repetido en tándem, conduciendo a pérdida por formación de bucle de la secuencia del vector. Preferentemente, el diseño del vector en el caso de integración estable es tal que, ante la pérdida de los genes de marcadores de selección (que también ocurre mediante recombinación homóloga intramolecular), esa pérdida por formación de bucle de la construcción integrada ya no es posible. Preferentemente, los genes están, por lo tanto, integrados de forma estable. La integración estable se define en el presente documento como la integración dentro del genoma, en el que ya no es posible la pérdida por formación de bucle de la construcción integrada. Preferentemente, los marcadores de selección están ausentes. Normalmente, la secuencia codificante de la enzima estará operativamente unida a una o más secuencias de ácidos nucleicos, capaces de proporcionar o ayudar en la transcripción y/o traducción de la secuencia de la enzima.

El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en la manera esperada. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante de modo que dicho promotor o potenciador afecte la transcripción de la secuencia codificante.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, localizado en la dirección 5' con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y está estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN conocida por un experto en la materia. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo bajo la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está activo bajo regulación medioambiental o del desarrollo.

El promotor que podría usarse para lograr la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima según la presente invención puede no ser nativo a la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que va a expresarse, es decir, un promotor que es heterólogo a la secuencia de nucleótidos (secuencia codificante) a la que está operativamente unido. Sin embargo, el promotor puede ser homólogo, es decir, endógeno, a la célula hospedadora.

Los promotores están ampliamente disponibles y son conocidos para el experto. Ejemplos adecuados de tales promotores incluyen, por ejemplo, promotores de genes glucolíticos, tales como los promotores de fosfofructocinasa (PFK), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD, TDH3 o GAPDH), piruvato cinasa (PYK), fosfoglicerato cinasa (PGK) de levaduras u hongos filamentosos; más detalles sobre tales promotores de levadura pueden encontrarse en (documento WO 93/03159). Otros promotores útiles son los promotores de genes que codifican proteínas ribosómicas, el promotor del gen de lactasa (LAC4), promotores de alcohol deshidrogenasa (ADH1, ADH4, y similares), y el promotor de enolasa (ENO). Otros promotores, tanto constitutivos como inducibles, y potenciadores o secuencias de activación en la dirección 5' serán conocidos por aquellos expertos en la materia. Los promotores usados en las células hospedadoras de la invención pueden modificarse, si se desea, para afectar sus características de control. Promotores adecuados en este contexto incluyen tanto promotores naturales constitutivos como inducibles, además de promotores modificados por ingeniería, que son muy conocidos por el experto en la materia. Promotores adecuados para células hospedadoras eucariotas pueden ser *GAL7*, *GAL10*, o *GAL1*, *CYC1*, *HIS3*, *ADH1*, *PGL*, *PH05*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO1*, *TPI1* y *AOX1*. Otros promotores adecuados incluyen *PDC1*, *GPD1*, *PGK1*, *TEF1* y *TDH3*.

En una célula hospedadora transformada, el extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima está preferentemente unido operativamente a una secuencia terminadora de la transcripción. Preferentemente, la secuencia terminadora es operable en una célula hospedadora de elección, tal como, por ejemplo, las especies de levadura de elección. En cualquier caso, la elección del terminador no es crítica; puede ser, por ejemplo, de cualquier gen de levadura, aunque los terminadores pueden funcionar algunas veces si son de un gen eucariota distinto de levadura. Normalmente, una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima comprende un terminador. Preferentemente, tales terminadores se combinan con mutaciones que previenen el decaimiento del ARNm mediado por elementos sin sentido en la célula hospedadora transformada (véase, por ejemplo: Shirley et al., 2002, Genetics 161:1465-1482).

La secuencia de terminación de la transcripción comprende preferentemente además una señal de poliadenilación.

Opcionalmente, puede estar presente un marcador de selección en una construcción de ácido nucleico adecuada para su uso en la invención. Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección de, o el cribado de, una célula hospedadora que contiene el marcador. El gen marcador puede ser un gen de resistencia a antibióticos por el cual puede usarse el antibiótico apropiado para seleccionar células transformadas de entre células que no están transformadas. Ejemplos de marcadores de resistencia a antibiótico adecuados incluyen, por ejemplo, dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, 3'-O-fosfotransferasa II (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Los marcadores de resistencia a antibiótico pueden ser más convenientes para la transformación de células hospedadoras poliploides. También pueden usarse marcadores no de resistencia a antibiótico, tales como marcadores auxotróficos (*URA3*, *TRP1*, *LEU2*) o el gen *TPI* de *S. pombe* (descrito por Russell P R, 1985, Gene 40: 125-130). En una realización preferida, las células hospedadoras transformadas con las construcciones de ácido nucleico están libres de genes

marcadores. Métodos de construcción de células hospedadoras microbianas recombinantes libres de genes marcadores se desvelan en el documento EP-A-0 635 574 y se basan en el uso de marcadores bidireccionales tales como el gen de *A. nidulans* amdS (acetamidasa) o los genes de levadura *URA3* y *LYS2*. Alternativamente, puede incorporarse un marcador de selección tal como proteína verde fluorescente, lacZ, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, beta-glucuronidasa en las construcciones de ácido nucleico de la invención, que permite cribar las células transformadas.

Elementos adicionales opcionales que pueden estar presentes en las construcciones de ácido nucleico adecuadas para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, una o más secuencias conductoras, potenciadores, factores de integración, y/o genes indicadores, secuencias intrónicas, centrómeros, telómeros y/o secuencias de unión a matriz (MAR). Las construcciones de ácido nucleico de la invención pueden comprender además una secuencia para replicación autónoma, tal como una secuencia ARS.

El proceso de combinación puede así ejecutarse con técnicas de recombinación conocidas. Diversos medios son conocidos por aquellos expertos en la materia para la expresión y expresión en exceso de enzimas en una célula hospedadora transformada. En particular, una enzima puede expresarse en exceso aumentando el número de copias del gen que codifica la enzima en la célula hospedadora, por ejemplo, mediante la integración de copias adicionales del gen en el genoma de la célula hospedadora, mediante la expresión del gen desde un vector de expresión multicopia episómico o mediante la introducción de un vector de expresión episómico que comprende múltiples copias del gen.

Alternativamente, la expresión en exceso de enzimas en las células hospedadoras de la invención puede lograrse usando un promotor que no es nativo a la secuencia que codifica la enzima que va a expresarse en exceso, es decir, un promotor que es heterólogo a la secuencia codificante a la que está operativamente unido. Aunque el promotor es preferentemente heterólogo a la secuencia codificante a la que está operativamente unido, también se prefiere que el promotor sea homólogo, es decir, endógeno a la célula hospedadora. Preferentemente, el promotor heterólogo es capaz de producir un mayor nivel de estado estacionario del transcrito que comprende la secuencia codificante (o es capaz de producir más moléculas de transcrito, es decir, moléculas de ARNm, por unidad de tiempo) que el promotor que es nativo a la secuencia codificante. Promotores adecuados en este contexto incluyen tanto promotores naturales constitutivos como inducibles, además de promotores modificados por ingeniería.

En una realización, la célula hospedadora transformada está libre de marcadores, que significa que no están presentes marcadores auxotróficos o dominantes, en particular marcadores de resistencia a antibióticos, en el genoma o extracromosómicamente.

La secuencia codificante usada para la expresión en exceso de las enzimas mencionadas anteriormente puede preferentemente ser homóloga a la célula hospedadora. Sin embargo, pueden usarse secuencias codificantes que son heterólogas al hospedador.

La expresión en exceso de una enzima, cuando se refiere a la producción de la enzima en una célula genéticamente modificada, significa que la enzima se produce a un nivel mayor de actividad enzimática específica en comparación con la célula hospedadora sin modificar en condiciones idénticas. Normalmente, esto significa que la proteína enzimáticamente activa (o proteínas en el caso de enzimas con múltiples subunidades) se produce en cantidades mayores, o bien a un nivel de estado estacionario mayor en comparación con la célula hospedadora sin modificar, en condiciones idénticas. Similarmente, esto normalmente significa que el ARNm que codifica la proteína enzimáticamente activa se produce en cantidades mayores, o nuevamente a un nivel de estado estacionario mayor, en comparación con la célula hospedadora sin modificar en condiciones idénticas. Preferentemente, en un hospedador, una enzima que va a expresarse en exceso se expresa en exceso al menos un factor de aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con una cepa que es genéticamente idéntica, excepto por la modificación genética que causa la expresión en exceso. Debe entenderse que estos niveles de expresión en exceso pueden aplicarse al nivel de estado estacionario de la actividad de la enzima, al nivel de estado estacionario de la proteína de la enzima, además de al nivel de estado estacionario del transcrito que codifica la enzima.

Adaptación

La adaptación es el proceso evolutivo por el cual una población se vuelve más adecuada (adaptada) para su hábitat o hábitats. Este proceso tiene lugar durante de varias a muchas generaciones, y es uno de los fenómenos básicos de la biología.

El término adaptación también se puede referir a una característica que es especialmente importante para la supervivencia de un organismo. Tales adaptaciones se producen en una población variable por las formas mejor adecuadas que se reproducen más satisfactoriamente, mediante selección natural.

Los cambios en las condiciones medioambientales alteran el resultado de la selección natural, que afecta los beneficios selectivos de adaptaciones posteriores que mejoran la aptitud de un organismo bajo las nuevas condiciones. En el caso de un cambio medioambiental extremo, la aparición y fijación de adaptaciones beneficiosas puede ser esencial para la supervivencia. Un gran número de factores diferentes, tales como, por ejemplo,

disponibilidad de nutrientes, temperatura, la disponibilidad de oxígeno, etcétera, pueden impulsar la evolución adaptativa.

Aptitud

- 5 Hay una clara relación entre la adaptabilidad (el grado al cual un organismo es capaz de vivir y reproducirse en un grupo dado de hábitats) y la aptitud. La aptitud es una estimación y un factor pronóstico de la tasa de selección natural. Mediante la aplicación de la selección natural, las frecuencias relativas de fenotipos alternativos variarán con el tiempo, si son heredables.

Cambios genéticos

- 10 Cuando la selección natural actúa sobre la variabilidad genética de la población, los cambios genéticos son el mecanismo subyacente. Por este medio, la población se adapta genéticamente a sus circunstancias. Los cambios genéticos pueden producir estructuras visibles, o pueden ajustar la actividad fisiológica del organismo en un modo que se adecue al hábitat cambiado.

- 15 Puede ocurrir que los hábitats cambien frecuentemente. Por tanto, de esto resulta que el proceso de adaptación nunca está finalmente completo. Con el tiempo, puede ocurrir que el entorno cambie gradualmente, y la especie llegue a adaptarse a su entorno cada vez mejor. Por otra parte, puede ocurrir que los cambios en el entorno ocurran con relativa rapidez, y entonces la especie se vuelva cada menos bien adaptada. La adaptación es un proceso genético, que está ocurriendo todo el tiempo de algún modo, también cuando la población no cambia el hábitat o entorno.

La evolución adaptativa

- 20 Las células hospedadora transformada pueden someterse en su preparación a evolución adaptativa. Una célula hospedadora transformada puede adaptarse a la utilización de azúcares mediante selección de mutantes, ya sean espontáneos o inducidos (por ejemplo, mediante radiación o productos químicos), para crecer sobre el azúcar deseado, preferentemente como única fuente de carbono, y más preferentemente en condiciones anaerobias. Puede realizarse selección de mutantes por técnicas que incluyen transferencia en serie de cultivos como, por ejemplo, se describe por Kuyper et al. (2004, FEMS Yeast Res. 4: 655-664) o por cultivo bajo presión selectiva en un cultivo quimiostático. Por ejemplo, en una célula hospedadora preferida, al menos una de las modificaciones genéticas descritas previamente, que incluye las modificaciones obtenidas por selección de mutantes, confiere a la célula hospedadora la capacidad de crecer sobre xilosa como fuente de carbono, preferentemente como única fuente de carbono, y preferentemente en condiciones anaerobias. Cuando se usa XI como gen para convertir xilosa, preferentemente la célula esencialmente no produce xilitol, por ejemplo, el xilitol producido está por debajo del límite de detección o, por ejemplo, es inferior a aproximadamente el 5, aproximadamente el 2, aproximadamente el 1, aproximadamente el 0,5, o aproximadamente el 0,3 % del carbono consumido en base molar.

La evolución adaptativa también se describe, por ejemplo, en Wisselink H.W. et al., Applied and Environmental Microbiology Aug. 2007, p. 4881-4891

- 35 En una realización de la evolución adaptativa se aplica un régimen que consiste en cultivo discontinuo repetido con ciclos repetidos de crecimiento consecutivo en diferentes medios, por ejemplo, tres medios con diferentes composiciones (glucosa, xilosa y arabinosa; xilosa y arabinosa. Véase Wisselink et al. (2009) Applied and Environmental Microbiology, Feb. 2009, p. 907-914.

Transformación de levaduras y estabilidad genética

- 40 La ingeniería genética, es decir, la transformación de células de levadura con ADN recombinante, fue posible por primera vez en 1978 [Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978]. La tecnología de ADN recombinante en levadura se ha establecido desde entonces. Están disponibles una multitud de diferentes construcciones de vector. Generalmente, estos vectores plasmídicos, denominados vectores lanzadera, contienen material genético derivado de vectores de *E. coli* que consiste en un origen de replicación y un marcador de selección (frecuentemente el gen de β -lactamasa, *ampR*), que les permite propagarse en *E. coli* antes de la transformación en células de levadura. Además, los vectores lanzadera contienen un marcador de selección para selección en levadura. Los marcadores pueden ser genes que codifican enzimas para la síntesis de un aminoácido o nucleótido particular, de manera que las células que llevan la delección genómica correspondiente (o mutación) se complementan para auxotrofia o autotrofia. Alternativamente, estos vectores contienen marcadores de resistencia dominantes heterólogos, que proveen a las células de levadura recombinantes (es decir, las células que han incorporado el ADN y expresan el gen marcador) resistencia hacia ciertos antibióticos, como g418 (Geneticin), higromicina B o fleomicina. Además, estos vectores pueden contener una secuencia de sitios de restricción (combinados) (sitio de clonación múltiple o MCS) que permitirá clonar ADN foráneo en estos sitios, aunque también existen métodos alternativos.

- 55 Tradicionalmente, pueden distinguirse cuatro tipos de vectores lanzadera por la ausencia o presencia de elementos genéticos adicionales:

- Plásmidos integrativos (YIp) que se integran por recombinación homóloga dentro del genoma del hospedador en el locus del gen marcador u otro gen, cuando éste se abre por restricción y se usa el ADN linealizado para la transformación de las células de levadura. Esto generalmente resulta en presencia de una copia del ADN foráneo insertado en este sitio particular en el genoma.
- 5 • Plásmidos episómicos (YE_p) que llevan parte de la secuencia de ADN del plásmido 2 μ necesaria para la replicación autónoma en células de levadura. Se propagan múltiples copias del plásmido transformado en la célula de levadura y se mantienen como episomas.
- Plásmidos de replicación autónoma (YR_p) que llevan un origen de replicación para levaduras (ARS, secuencia replicada autónomamente) que permite que los plásmidos transformados se propaguen varios cientos de veces.
- 10 • Plásmidos CEN (YC_p) que llevan, además de una secuencia ARS, una secuencia centromérica (derivada de uno de los cromosomas nucleares) que normalmente garantiza la segregación mitótica estable y normalmente reduce el número de copias de plásmido autoreplicado a solo una.

Estos plásmidos se introducen en las células de levadura por transformación. La transformación de células de levadura puede lograrse por varias técnicas diferentes, tales como permeabilización de las células con acetato de litio (Ito et al., 1983) y métodos de electroporación.

En la aplicación comercial de microorganismos recombinantes, la inestabilidad del plásmido es el problema más importante. La inestabilidad es la tendencia de las células transformadas a perder sus propiedades modificadas por ingeniería debido a cambios o a pérdida de plásmidos. Este problema se trata en detalle por Zhang et al (Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Advances, Vol. 14, N.º 4, pp. 401-435, 1996). Las cepas transformadas con plásmidos integrativos son extremadamente estables, incluso en ausencia de presión selectiva (Sherman, F. <http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/shermanf/yeast/9.html> y referencias en la misma).

El ADN heterólogo normalmente se introduce en el organismo en forma de plásmidos extracromosómicos (YE_p, YC_p y YR_p). Desafortunadamente, se ha encontrado, tanto con bacterias como con levaduras, que no pueden ser retenidas las nuevas características, especialmente si la presión de selección no se aplica continuamente. Esto es debido a la inestabilidad segregacional del plásmido híbrido cuando las células recombinantes crecen durante un largo periodo de tiempo. Esto conduce a heterogeneidad de la población y variabilidad clonal, y eventualmente a una población celular en la que la mayoría de las células han perdido las propiedades que se introdujeron por la transformación. Si se usan vectores con marcadores auxotróficos, el cultivo en medios ricos frecuentemente conduce a una pérdida rápida del vector, debido a que el vector solo se retiene en medio mínimo. La alternativa, el uso de marcadores de resistencia a antibióticos dominantes, frecuentemente no es compatible con los procesos de producción. El uso de antibióticos puede ser no deseable desde el punto de vista del registro (la posibilidad de que cantidades traza del antibiótico terminen en el producto final) o por motivos económicos (costes del uso de antibióticos a escala industrial).

La pérdida de vectores conduce a problemas en situaciones de producción a gran escala. Existen métodos alternativos para la introducción de ADN para levaduras, tales como el uso de plásmidos integrativos (YIp). El ADN se integra en el genoma hospedador mediante recombinación, produciendo alta estabilidad (Caunt, P. Stability of recombinant plasmids in yeast. Journal of Biotechnology 9(1988) 173 -192). Los presentes inventores han encontrado que es una buena alternativa un método de integración que usa los transposones del hospedador. En una realización, los genes pueden ser integrados en el genoma de la célula hospedadora transformada. La introducción inicial (es decir, antes de la evolución adaptativa) de múltiples copias, puede ejecutarse de cualquier modo conocido en la técnica que conduzca a la introducción de los genes. En una realización, esto puede llevarse a cabo usando un vector con partes homólogas a secuencias repetitivas (transposones), de la célula hospedadora. Cuando la célula hospedadora es una célula de levadura, secuencias repetidas adecuadas son las repeticiones terminales largas (LTR) del elemento Ty, conocido como secuencia delta. Los elementos Ty se clasifican en dos subfamilias bastante similares denominadas Ty1 y Ty2. Estos elementos son de aproximadamente 6 kilobases (kb) de longitud y están unidos mediante repeticiones terminales largas (LTR), secuencias de aproximadamente 335 pares de bases (Boeke JD et al., The *Saccharomyces cerevisiae* Genome Contains Functional and Nonfunctional Copies of Transposon Ty1. Molecular and Cellular Biology, Apr. 1988, p. 1432-1442 Vol. 8, N.º 4). En la cepa totalmente secuenciada de *S. cerevisiae*, S288c, los transposones más abundantes son Ty1 (31 copias) y Ty2 (13 copias) (Gabriel A, Daprich J, Kunkel M, Gresham D, Pratt SC, et al. (2006) Global mapping of transposon location. PLoS Genet 2(12): e212.doi:10.1371/journal.pgen.0020212). Estos transposones consisten en dos marcos de lectura abiertos solapados (ORF), cada uno de los cuales codifica varias proteínas. Las regiones codificantes están flanqueadas por las LTR casi idénticas anteriormente mencionadas. Otros elementos Ty, pero menos abundantes y más distintos, en *S. cerevisiae* comprenden Ty3, Ty4 y Ty5. Para cada familia de elementos Ty de longitud completa hay un orden de magnitud más de elementos LTR solos dispersos a lo largo del genoma. Se cree que éstos surgen de la recombinación LTR-LTR de elementos de longitud completa, con una escisión por formación de bucle de las regiones internas que codifican proteínas.

Se ha usado el mecanismo de retrotransposición del retrotransposón Ty para integrar múltiples copias a lo largo del genoma (Boeke et al., 1988; Jacobs et al., 1988). Las repeticiones terminales largas (LTR) del elemento Ty, conocido como secuencias delta, también son buenas dianas para la integración por recombinación homóloga ya que existen en aproximadamente 150-200 copias que están o bien asociadas a Ty o a sitios solos (Boeke, 1989; Kingsman y Kingsman, 1988). (Parekh R.N. (1996). An Integrating Vector for Tunable, High Copy, Stable Integration into the Dispersed Ty DELTA Sites of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Prog. 1996, 12, 16-21). Por adaptación evolutiva, puede cambiar el número de copias.

La célula hospedadora

La célula hospedadora puede ser cualquier célula hospedadora adecuada para la producción de un producto útil. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula adecuada, tal como una célula procariota, tal como una bacteria, o una célula eucariota. Normalmente, la célula será una célula eucariota, por ejemplo, una levadura o un hongo filamentoso.

Las levaduras se definen en la presente como microorganismos eucariotas e incluyen todas las especies de la subdivisión Eumycotina (Alexopoulos, C. J., 1962, en: Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) que crecen predominantemente en forma unicelular.

Las levaduras pueden crecer ya sea por gemación de un tallo unicelular o pueden crecer por fisión del organismo. Una levadura preferida como célula hospedadora transformada puede pertenecer a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces* o *Yarrowia*. Preferentemente, la levadura es una capaz de fermentación anaerobia, más preferentemente una capaz de fermentación alcohólica anaerobia.

Los hongos filamentosos se definen en el presente documento como microorganismos eucariotas que incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina. Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo compuesto de quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos que son adecuados para su uso como una célula de la presente invención son morfológicamente, fisiológicamente y genéticamente distintos de las levaduras. Pueden usarse ventajosamente células de hongos filamentosos debido a que la mayoría de los hongos no requieren condiciones estériles para la propagación y son insensibles a las infecciones por bacteriófagos. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos es por elongación de hifas y el metabolismo del carbono de la mayoría de los hongos filamentosos es aerobio estricto. Hongos filamentosos preferidos como célula hospedadora pueden pertenecer al género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium* o *Penicillium*. Más preferentemente, la célula de hongo filamentoso puede ser una célula de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, un *Penicillium chrysogenum*, o *Rhizopus oryzae*.

En una realización, la célula hospedadora puede ser levadura.

Preferentemente, el hospedador es un hospedador industrial, más preferentemente una levadura industrial. Un hospedador industrial y una célula de levadura industrial pueden definirse como sigue. Los entornos vivos de las células de levadura en procesos industriales son significativamente diferentes de los del laboratorio. Las células de levadura industriales deben ser capaces de rendir bien bajo múltiples condiciones medioambientales que pueden variar durante el proceso. Tales variaciones incluyen cambios en las fuentes de nutrientes, pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de oxígeno, etc., que juntos tienen un posible impacto sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. En condiciones industriales adversas, las cepas tolerantes al entorno deben permitir un crecimiento y producción robustos. Las cepas de levaduras industriales son generalmente más robustas a estos cambios en las condiciones medioambientales que pueden producirse en las aplicaciones en las que se usan, tales como en la industria de la panadería, industria cervecera, viticultura y la industria del etanol. Ejemplos de levaduras industriales (*S. cerevisiae*) son Ethanol Red® (Fermentis) Fermiol® (DSM) y Thermosacc® (Lallemand).

En una realización, el hospedador es tolerante a inhibidor. Pueden seleccionarse células hospedadoras tolerantes a inhibidor mediante el cribado de cepas para crecimiento sobre materiales que contienen inhibidores, tal como se ilustra en Kadar et al., Appl. Biochem. Biotechnol. (2007), Vol. 136-140, 847-858, en el que se seleccionó una cepa tolerante a inhibidor de *S. cerevisiae* ATCC 26602.

Genes *araA*, *araB* y *araD*

Una célula hospedadora transformada es capaz de usar arabinosa. Una célula hospedadora transformada es, por tanto, capaz de convertir L-arabinosa y L-ribulosa y/o xilulosa 5-fosfato y/o en un producto de fermentación deseado, por ejemplo, uno de aquellos mencionados en el presente documento.

Pueden producirse organismos, por ejemplo cepas de *S. cerevisiae*, capaces de producir etanol a partir de L-arabinosa modificando una célula por introducción de los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribulocinasa) y *araD* (L-ribulosa-5-P4-epimerasa) a partir de una fuente adecuada. Tales genes pueden introducirse en una célula hospedadora transformada con el objetivo de que sea capaz de usar arabinosa. Un enfoque tal se da se describe en el documento WO2003/095627. Pueden usarse genes *araA*, *araB* y *araD* de *Lactobacillus plantanum* y se desvelan

en el documento WO2008/041840. Pueden usarse el gen *araA* de *Bacillus subtilis* y los genes *araB* y *araD* de *Escherichia coli* y se desvelan en el documento EP1499708. En otra realización, los genes *araA*, *araB* y *araD* pueden derivar de al menos uno del género *Clavibacter*, *Arthrobacter* y/o *Gramella*, en particular uno de *Clavibacter michiganensis*, *Arthrobacter aureescens* y/o *Gramella forsetii*, como se desvela en el documento WO 2009011591.

5 Genes de PPP

Una célula hospedadora transformada puede comprender una o más modificaciones genéticas que aumentan el flujo de la vía de la pentosa fosfato. En particular, la(s) modificación (modificaciones) genética(s) puede(n) conducir a un aumento del flujo a través de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato. Una modificación genética que produce un aumento del flujo de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato se entiende en el presente documento que significa una modificación que aumenta el flujo al menos un factor de aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con el flujo en una cepa que es genéticamente idéntica, excepto por la modificación genética que causa el aumento de flujo. El flujo de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato puede medirse cultivando el hospedador modificado sobre xilosa como única fuente de carbono, determinando la tasa de consumo específico de xilosa y restando la tasa específica de producción de xilitol de la tasa específica de consumo de xilosa, si es que se produce xilitol. Sin embargo, el flujo de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato es proporcional a la tasa de crecimiento sobre xilosa como única fuente de carbono, preferentemente con la tasa de crecimiento anaeróbico sobre xilosa como única fuente de carbono. Hay una relación lineal entre la tasa de crecimiento sobre xilosa como única fuente de carbono ($\mu_{\text{máx}}$) y el flujo de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato. La tasa específica de consumo de xilosa (Q_s) es igual a la tasa de crecimiento (μ) dividida entre el rendimiento de biomasa en azúcar (Y_{xs}) debido a que el rendimiento de biomasa en azúcar es constante (en un grupo de condiciones dadas: anaerobias, medio de crecimiento, pH, antecedentes genéticos de la cepa, etc.; es decir, $Q_s = \mu / Y_{xs}$). Por lo tanto, el aumento de flujo de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato puede deducirse a partir del aumento de la tasa de crecimiento máxima en estas condiciones a pesar del transporte (la captación es limitante).

Pueden introducirse una o más modificaciones genéticas que aumentan el flujo de la vía de la pentosa fosfato en la célula hospedadora de diversas formas. Éstas incluyen, por ejemplo, conseguir mayores niveles de actividad de estado estacionario de xilulosa cinasa y/o una o más de las enzimas de la parte no oxidativa de la vía de la pentosa fosfato y/o un nivel en estado estacionario reducido de la actividad inespecífica de aldosa reductasa. Estos cambios en los niveles de actividad de estado estacionario pueden estar afectados por la selección de mutantes (espontáneos o inducidos por productos químicos o radiación) y/o por tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, por expresión en exceso o inactivación, respectivamente, de genes que codifican para las enzimas o factores que regulan estos genes.

En una célula hospedadora preferida, la modificación genética comprende la expresión en exceso de al menos una enzima de la (parte no oxidativa) de la vía de la pentosa fosfato. Preferentemente, la enzima se selecciona del grupo que consiste en las enzimas que codifican ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa. Pueden expresarse en exceso diversas combinaciones de las enzimas de la (parte no oxidativa) vía de la pentosa fosfato. Por ejemplo, las enzimas que se expresan en exceso pueden ser al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato epimerasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y transcetolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato epimerasa y transcetolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato epimerasa y transaldolasa; o al menos las enzimas transcetolasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, transcetolasa y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, y transaldolasa; o al menos las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa y transcetolasa. En una realización de la invención, cada una de las enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa se expresan en exceso en la célula hospedadora. Se prefiere más una célula hospedadora en la que la modificación genética comprenda al menos la expresión en exceso de ambas enzimas transcetolasa y transaldolasa de modo que una célula hospedadora ya sea capaz de crecimiento anaerobio sobre xilosa. En realidad, en algunas condiciones, las células hospedadoras que expresan en exceso solo la transcetolasa y la transaldolasa ya tienen la misma tasa de crecimiento anaerobio sobre xilosa que las células hospedadoras que expresan en exceso las cuatro enzimas, es decir, la ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa. Además, se prefieren las células hospedadoras que expresan en exceso ambas enzimas ribulosa-5-fosfato isomerasa y ribulosa-5-fosfato epimerasa con respecto a las células hospedadoras que expresan en exceso solo la isomerasa o solo la epimerasa ya que la expresión en exceso de solo una de estas enzimas puede producir desequilibrios metabólicos.

La enzima "ribulosa 5-fosfato epimerasa" (EC 5.1.3.1) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la epimerización de D-xilulosa 5-fosfato a D-ribulosa 5-fosfato y viceversa. La enzima también se conoce como fosforribulosa epimerasa; eritrosa-4-fosfato isomerasa; fosfocetopentosa 3-epimerasa; xilulosa fosfato 3-epimerasa; fosfocetopentosa epimerasa; ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa; D-ribulosa fosfato-3-epimerasa; D-ribulosa 5-fosfato epimerasa; D-ribulosa-5-P 3-epimerasa; D-xilulosa-5-fosfato 3-epimerasa; pentosa-5-fosfato 3-epimerasa; o D-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa. Una ribulosa 5-fosfato epimerasa también puede definirse además por su

secuencia de aminoácidos. Asimismo, una ribulosa 5-fosfato epimerasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una ribulosa 5-fosfato epimerasa. La secuencia de nucleótidos que codifica ribulosa 5-fosfato epimerasa se designa en el presente documento *RPE1*.

- 5 La enzima "ribulosa 5-fosfato isomerasa" (EC 5.3.1.6) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-ribosa 5-fosfato en D-ribulosa 5-fosfato y viceversa. La enzima también se conoce como fosfopentosisomerasa; fosforribosisomerasa; ribosa fosfato isomerasa; 5-fosforribosa isomerasa; D-ribosa 5-fosfato isomerasa; D-ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa; o D-ribosa-5-fosfato aldosa-cetosa-isomerasa. Una ribulosa 5-fosfato isomerasa también puede definirse por su secuencia de aminoácidos. Asimismo, una ribulosa 5-fosfato isomerasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una ribulosa 5-fosfato isomerasa. La secuencia de nucleótidos que codifica ribulosa 5-fosfato isomerasa se designa en el presente documento *RKI1*.

- 15 La enzima "transcetolasa" (EC 2.2.1.1) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la reacción: D-ribosa 5-fosfato + D-xilulosa 5-fosfato $\leftrightarrow$ sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato y viceversa. La enzima también se conoce como glicolaldehído transferasa o sedoheptulosa-7-fosfato:D-gliceraldehído-3-fosfato glicolaldehído transferasa. Una transcetolasa también puede definirse por su aminoácido. Asimismo, una transcetolasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una transcetolasa. La secuencia de nucleótidos que codifica transcetolasa se designa en el presente documento *TKL1*.

- 20 La enzima "transaldolasa" (EC 2.2.1.2) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la reacción: sedoheptulosa 7-fosfato + D-gliceraldehído 3-fosfato $\leftrightarrow$ D-eritrosa 4-fosfato + D-fructosa 6-fosfato y viceversa. La enzima también se conoce como dihidroxiacetona transferasa; dihidroxiacetona sintasa; formaldehído transcetolasa; o sedoheptulosa-7-fosfato:D-gliceraldehído-3-fosfato glicerina transferasa. Una transaldolasa también puede definirse por su secuencia de aminoácidos. Asimismo, una transaldolasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una transaldolasa. La secuencia de nucleótidos que codifica transcetolasa se designa en el presente documento *TAL1*.

Genes de xilosa isomerasa o xilosa reductasa

- 30 Según la invención, se introducen una o más copias de uno o más genes de xilosa isomerasa y/o uno o más genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa en el genoma de la célula hospedadora. La presencia de estos elementos genéticos confiere a la célula la capacidad de convertir xilosa por isomerización o reducción.

En una realización, las una o más copias de uno o más genes de xilosa isomerasa se introducen en el genoma de la célula hospedadora.

- 35 Una "xilosa isomerasa" (EC 5.3.1.5) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la isomerización directa de D-xilosa en D-xilulosa y/o viceversa. La enzima también se conoce como una D-xilosa cetoisomerasa. Una xilosa isomerasa en el presente documento también puede ser capaz de catalizar la conversión de D-glucosa y D-fructosa (y, por consiguiente, puede, por tanto, denominarse una glucosa isomerasa). Una xilosa isomerasa en el presente documento puede requerir un catión bivalente, tal como magnesio, manganeso o cobalto como cofactor.

- 40 Por consiguiente, una célula hospedadora transformada tal es capaz de isomerizar xilosa en xilulosa. La capacidad de isomerizar xilosa en xilulosa se confiere a la célula hospedadora por la transformación de la célula hospedadora con una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una xilosa isomerasa definida. Una célula hospedadora transformada isomeriza xilosa en xilulosa por la isomerización directa de xilosa en xilulosa.

- 45 Una unidad (U) de actividad de xilosa isomerasa puede definirse en el presente documento como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de xilulosa por minuto, en condiciones como se describieron en Kuyper et al. (2003, FEMS Yeast Res. 4: 69-78).

- 50 El gen de xilosa isomerasa puede tener diversos orígenes, tales como, por ejemplo, de *Piromyces* sp. como se desvela en el documento WO2006/009434. Otros orígenes adecuados son *Bacteroides*, en particular *Bacteroides uniformis* como se describe en el documento PCT/EP2009/52623, *Bacillus*, en particular *Bacillus stearothermophilus* como se describe en el documento PCT/EP2009/052625.

- 55 En otra realización, una o más copias de uno o más genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa se introducen en el genoma de la célula hospedadora. En esta realización, la conversión de xilosa se realiza en una conversión de dos etapas de xilosa en xilulosa a través de un producto intermedio de xilitol como se cataliza por xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, respectivamente. En una realización de la misma, pueden expresarse en exceso xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) y xilocinasa (XK), y opcionalmente se regulan por incremento uno o

más de genes que codifican enzimas productoras de NADPH y se regulan por incremento uno o más de los genes que codifican enzimas consumidoras de NADH, como se desvela en el documento WO 2004085627.

Gen XKS1

Una célula hospedadora transformada puede comprender una o más modificaciones genéticas que aumentan la actividad específica de xilulosa cinasa. Preferentemente, la modificación o modificaciones genéticas producen la expresión en exceso de una xilulosa cinasa, por ejemplo mediante expresión en exceso de una secuencia de nucleótidos que codifica una xilulosa cinasa. El gen que codifica la xilulosa cinasa puede ser endógeno a la célula hospedadora o puede ser una xilulosa cinasa que es heteróloga a la célula hospedadora. Una secuencia de nucleótidos usada para la expresión en exceso de xilulosa cinasa en la célula hospedadora es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de xilulosa cinasa.

La enzima "xilulosa cinasa" (EC 2.7.1.17) se define en el presente documento como una enzima que cataliza la reacción $\text{ATP} + \text{D-xilulosa} = \text{ADP} + \text{D-xilulosa 5-fosfato}$. La enzima también se conoce como una xilulocinasa fosforilante, D-xilulocinasa o ATP:D-xilulosa 5-fosfotransferasa. Una xilulosa cinasa de la invención también puede definirse por su secuencia de aminoácidos. Asimismo, una xilulosa cinasa puede definirse por una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una xilulosa cinasa.

En una célula hospedadora transformada, puede combinarse una modificación o modificaciones genéticas que aumenta(n) la actividad específica de xilulosa cinasa con cualquiera de las modificaciones que aumentan el flujo de la vía de la pentosa fosfato como se describió anteriormente. Esto no es, sin embargo, esencial.

Así, una célula hospedadora puede comprender solo una modificación o modificaciones genéticas que aumentan la actividad específica de xilulosa cinasa. Los diversos medios disponibles en la materia para conseguir y analizar la expresión en exceso de una xilulosa cinasa en las células hospedadoras de la invención son los mismos que se describieron anteriormente para enzimas de la vía de la pentosa fosfato. Preferentemente, en las células hospedadoras de la invención, una xilulosa cinasa que va a expresarse en exceso se expresa en exceso al menos un factor de aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10 o aproximadamente 20 en comparación con una cepa que es genéticamente idéntica, excepto por la(s) modificación (modificaciones) genética(s) que causan la expresión en exceso. Debe entenderse que estos niveles de expresión en exceso pueden aplicarse al nivel de estado estacionario de la actividad de la enzima, al nivel de estado estacionario de la proteína de la enzima, además de al nivel de estado estacionario del transcrito que codifica la enzima.

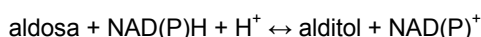
Delección del gen de aldosa reductasa (GRE3)

En una realización, donde XI se usa como gen para convertir xilosa, puede ser ventajoso reducir la actividad de aldosa reductasa. Una célula hospedadora transformada puede, por tanto, comprender una o más modificaciones genéticas que reduzcan la actividad inespecífica de aldosa reductasa en la célula hospedadora. Preferentemente, la actividad inespecífica de aldosa reductasa se reduce en la célula hospedadora mediante una o más modificaciones genéticas que reducen la expresión o inactivan un gen que codifica una aldosa reductasa inespecífica. Preferentemente, la(s) modificación (modificaciones) genética(s) reducen o inactiva la expresión de cada copia endógena de un gen que codifica una aldosa reductasa inespecífica en la célula hospedadora (denominada en el presente documento delección de GRE3). Las células hospedadoras transformadas pueden comprender múltiples copias de genes que codifican aldosas reductasas inespecíficas como resultado de di-, poli-o aneuploidía, y/o la célula hospedadora puede contener varias (iso)enzimas diferentes con actividad de aldosa reductasa que se diferencian en la secuencia de aminoácidos y que son cada una codificadas por un gen diferente. También en dichas casos se reduce o inactiva preferentemente la expresión de cada gen que codifica una aldosa reductasa inespecífica. Preferentemente, el gen se inactiva mediante delección de al menos parte del gen o mediante interrupción del gen, por lo que en este contexto el término gen también incluye cualquier secuencia no codificante en la dirección 5' o 3' de la secuencia codificante, cuya delección (parcial) o inactivación produce una reducción de la expresión de la actividad inespecífica de aldosa reductasa en la célula hospedadora.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una aldosa reductasa cuya actividad va a reducirse en la célula hospedadora es una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de aldosa reductasa.

Así, una célula hospedadora que comprende solo una modificación o modificaciones genéticas que reduzca(n) la actividad inespecífica de aldosa reductasa en la célula hospedadora está especialmente incluida en la invención.

La enzima "aldosa reductasa" (EC 1.1.1.21) se define en el presente documento como una enzima que es capaz de reducir xilosa o xilulosa a xilitol. En el contexto de la presente invención, una aldosa reductasa puede ser cualquier aldosa reductasa inespecífica que sea nativa (endógena) a una célula hospedadora de la invención y que sea capaz de reducir xilosa o xilulosa a xilitol. Las aldosa reductasas inespecíficas catalizan la reacción:



La enzima tiene una amplia especificidad y también se conoce como aldosa reductasa; poliol deshidrogenasa (NADP⁺); alditol:NADP oxidorreductasa; alditol:NADP⁺ 1-oxidorreductasa; NADPH-aldopentosa reductasa; o NADPH-aldosa reductasa.

- 5 Un ejemplo particular de una aldosa reductasa inespecífica tal que es endógena a *S. cerevisiae* y que está codificada por el gen GRE3 (Traff et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5668-74). Así, una aldosa reductasa de la invención también puede definirse por su secuencia de aminoácidos. Asimismo, una aldosa reductasa puede definirse por la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, además de por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica una aldosa reductasa.

Producción de bioproductos

- 10 A lo largo de los años se han hecho sugerencias para la introducción de diversos organismos para la producción de bioetanol a partir de azúcares de cultivo. En la práctica, sin embargo, todos los procesos de bioproducción de etanol han continuado usando las levaduras del género *Saccharomyces* como productor de etanol. Esto es debido a las muchas características atractivas de las especies de *Saccharomyces* para los procesos industriales, es decir, una alta capacidad de crecimiento anaerobio con tolerancia a ácido, etanol y osmolaridad, y, por supuesto, su alta capacidad fermentativa alcohólica. Las especies de levadura preferidas como células hospedadoras incluyen *S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnetti*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* o *K. fragilis*.
- 15

Una célula hospedadora transformada puede ser una célula adecuada para la producción de etanol. Una célula hospedadora transformada puede, sin embargo, ser adecuada para la producción de productos de fermentación distintos de etanol

- 20 Tales productos de fermentación no etanólicos incluyen en principio cualquier producto químico a granel o refinado que pueda ser producido mediante un microorganismo eucariota tal como una levadura o un hongo filamentoso.

Una célula hospedadora transformada que puede usarse para la producción de productos de fermentación no etanólicos es una célula hospedadora que contiene una modificación genética que produjo una actividad de alcohol deshidrogenasa reducida.

- 25 En una realización, la célula hospedadora transformada puede usarse en un proceso en el que los azúcares que se originan a partir de lignocelulosa se convierten en etanol.

Lignocelulosa

- 30 La lignocelulosa, que puede considerarse como una materia prima potencialmente renovable, generalmente comprende los polisacáridos celulosa (glucanos) y hemicelulosas (xilanos, heteroxilanos y xiloglucanos). Además, algo de la hemicelulosa puede estar presente como glucomananos, por ejemplo en materias primas derivadas de madera. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos en azúcares solubles, que incluyen tanto monómeros como multímeros, por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa, manosa, ramnosa, ribosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico y otras hexosas y pentosas, se produce bajo la acción de diferentes enzimas que actúan en concierto.

- 35 Además, pectinas y otras sustancias pécticas tales como arabinanos pueden constituir una proporción considerable de la masa seca de paredes celulares típicas de tejidos vegetales distintos de madera (aproximadamente entre un cuarto y la mitad de la masa seca puede ser pectinas).

Pretratamiento

- 40 Antes del tratamiento enzimático, el material lignocelulósico puede ser pretratado. El pretratamiento puede comprender exponer el material lignocelulósico a un ácido, una base, un disolvente, calor, un peróxido, ozono, ruptura mecánica, trituración, molienda o despresurización rápida, o una combinación de dos o más cualquiera de los mismos. Este pretratamiento químico se combina frecuentemente con pretratamiento con calor, por ejemplo entre 150-220 °C durante 1 a 30 minutos.

Hidrólisis enzimática

- 45 El material pretratado comúnmente se somete a hidrólisis enzimática para liberar los azúcares que pueden ser fermentados según la invención. Esto se puede llevar a cabo con métodos convencionales, por ejemplo poniendo en contacto con celulasas, por ejemplo celobiohidrolasa(s), endoglucanasa(s), beta-glucosidasa(s) y opcionalmente otras enzimas. La conversión con las celulasas puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o a temperaturas más altas, a un tiempo de reacción para liberar cantidades suficientes de azúcar(es). El resultado de la hidrólisis enzimática es un producto de hidrólisis que comprende azúcares C5/C6, designados en el presente documento como la composición de azúcares.
- 50

Fermentación

El proceso de fermentación puede ser un proceso de fermentación aerobio o anaerobio. Un proceso de fermentación anaerobio se define en el presente documento como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente se consume menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, más preferentemente 0 mmol/l/h (es decir, el consumo de oxígeno no es detectable), y en el que las moléculas orgánicas sirven tanto de donante de electrones como de aceptores de electrones. En ausencia de oxígeno, el NADH producido en la glicolisis y formación de biomasa no puede ser oxidado mediante la fosforilación oxidativa. Para resolver este problema, muchos microorganismos usan piruvato o uno de sus derivados como aceptor de electrones y de hidrógeno, regenerando así NAD⁺.

Así, en un proceso de fermentación anaerobio preferido se usa piruvato como aceptor de electrones (y de hidrógeno) y se reduce a productos de fermentación tales como etanol, butanol, ácido láctico, di-terpeno, di-terpeno glucosilado, ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, un aminoácido, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico β-lactámico y una cefalosporina.

El proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es óptima para la célula. Así, para la mayoría de las células hospedadoras de levadura o fúngicas, el proceso de fermentación se realiza a una temperatura que es inferior a aproximadamente 42 °C, preferentemente inferior a aproximadamente 38 °C. Para células hospedadoras de levadura o de hongos filamentosos, el proceso de fermentación se realiza preferentemente a una temperatura que es inferior a aproximadamente 35, aproximadamente 33, aproximadamente 30 o aproximadamente 28 °C y a una temperatura que es superior a aproximadamente 20, aproximadamente 22, o aproximadamente 25 °C.

El rendimiento de etanol sobre xilosa y/o glucosa en el proceso es preferentemente de al menos aproximadamente el 50, aproximadamente el 60, aproximadamente el 70, aproximadamente el 80, aproximadamente el 90, aproximadamente el 95 o aproximadamente el 98 %. El rendimiento de etanol se define en el presente documento como un porcentaje del rendimiento teórico máximo.

La invención también se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación.

El proceso de fermentación según la presente invención puede realizarse en condiciones aerobias y anaerobias. En una realización, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones microaerófilas o de oxígeno limitado.

Un proceso de fermentación anaerobio se define en el presente documento como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno o en el que sustancialmente no se consume oxígeno, preferentemente menos de aproximadamente 5, aproximadamente 2,5 o aproximadamente 1 mmol/l/h, y en el que las moléculas orgánicas sirven de donante de electrones como de aceptores de electrones.

Un proceso de fermentación de oxígeno limitado es un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El grado de limitación de oxígeno se determina por la cantidad y composición del flujo de gas entrante, además de las propiedades de mezcla/transferencia de masa reales del equipo de fermentación usado. Preferentemente, en un proceso en condiciones de oxígeno limitado, la tasa de consumo de oxígeno es de al menos aproximadamente 5,5, más preferentemente al menos aproximadamente 6, tal como al menos 7 mmol/l/h. Un proceso de la invención puede comprender la recuperación del producto de fermentación.

En un proceso preferido, la célula fermenta tanto la xilosa como la glucosa, preferentemente simultáneamente, en cuyo caso preferentemente se usa una célula que no es sensible a la represión por glucosa para prevenir el crecimiento diauxico. Además de una fuente de xilosa (y glucosa) como fuente de carbono, el medio de fermentación comprenderá además el componente apropiado requerido para el crecimiento de la célula. Composiciones de medio de fermentación para el crecimiento de microorganismos tales como levaduras son muy conocidas en la técnica.

Los procesos de fermentación pueden llevarse a cabo en modo discontinuo, de lotes alimentados o continuo. También puede aplicarse un proceso de hidrólisis y fermentación (SHF) separado o un proceso de sacarificación y fermentación (SSF) simultáneo. También es posible una combinación de estos modos de procesos de fermentación para una productividad óptima. Estos procesos se describen más adelante en más detalle.

Modo SSF

Para el modo de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), el tiempo de reacción para la etapa de licuefacción/hidrólisis o presacarificación depende del tiempo para lograr un rendimiento deseado, es decir, el rendimiento de conversión de celulosa a glucosa. Tal rendimiento es preferentemente tan alto como sea posible, preferentemente 60 % o más, 65 % o más, 70 % o más, 75 % o más 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más, incluso 99,5 % o más o 99,9 % o más.

Según la invención, se logran concentraciones de azúcar muy altas en el modo SHF y concentraciones de producto muy altas (por ejemplo, etanol) en el modo SSF. En la operación de SHF, la concentración de glucosa es 25 g/l o

más, 30 g/l o más, 35 g/l o más, 40 g/l o más, 45 g/l o más, 50 g/l o más, 55 g/l o más, 60 g/l o más, 65 g/l o más, 70 g/l o más, 75 g/l o más, 80 g/l o más, 85 g/l o más, 90 g/l o más, 95 g/l o más, 100 g/l o más, 110 g/l o más, 120 g/l o más o puede ser, por ejemplo, 25 g/l-250 g/l, 30 g/l-200 g/l, 40 g/l-200 g/l, 50 g/l-200 g/l, 60 g/l-200 g/l, 70 g/l-200 g/l, 80 g/l-200 g/l, 90 g/l, 80 g/l-200 g/l.

5 Concentración de producto en modo SSF

En la operación de SSF, la concentración de producto (g/l) depende de la cantidad de glucosa producida, pero esto no es visible debido a que los azúcares se convierten en producto en SSF, y las concentraciones de productos pueden relacionarse con la concentración de glucosa subyacente por multiplicación con el rendimiento máximo teórico (Yps máximo en g de producto por gramo de glucosa)

- 10 El rendimiento máximo teórico (Yps máximo en g de producto por gramo de glucosa) de un producto de fermentación puede derivar de textos de bioquímica. Para etanol, 1 mol de glucosa (180 gramos) da según la vía normal de fermentación por glicolisis en levadura 2 moles de etanol (= $2 \times 46 = 92$ g de etanol. El rendimiento máximo teórico de etanol en glucosa es, por tanto, $92/180 = 0,511$ g de etanol/g de glucosa.

- 15 Para butanol (MW 74 g/mol) o isobutanol, el rendimiento teórico máximo es 1 mol de butanol por mol de glucosa. Así, el Yps máximo para (iso-)butanol = $74/180 = 0,411$ g de (iso-)butanol/g de glucosa.

Para el ácido láctico, el rendimiento de fermentación para la fermentación homoláctica es 2 moles de ácido láctico (MW = 90 g/mol) por mol de glucosa. Según esta estequiometría, el Yps máximo = 1 g de ácido láctico/g de glucosa.

Para otros productos de fermentación puede hacerse un cálculo similar.

Modo SSF

- 20 En la operación SSF, la concentración de producto es 25 g * Yps g/l/l o más, 30 * Yps g/l o más, 35 g * Yps g/l o más, 40 * Yps g/l o más, 45 * Yps g/l o más, 50 * Yps g/l o más, 55 * Yps g/l o más, 60 * Yps g/l o más, 65 * Yps g/l o más, 70 * Yps g/l o más, 75 * Yps g/l o más, 80 * Yps g/l o más, 85 * Yps g/l o más, 90 * Yps g/l o más, 95 * Yps g/l o más, 100 * Yps g/l o más, 110 * Yps g/l o más, 120 g/l * Yps o más o puede ser, por ejemplo, 25 * Yps g/l-250 * Yps g/l, 30 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 40 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 50 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 60 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 70 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 80 * Yps g/l-200 * Yps g/l, 90 * Yps g/l, 80 * Yps g/l-200 * Yps g/l

Por consiguiente, la invención proporciona un método para la preparación de un producto de fermentación, método que comprende:

- a. degradar lignocelulosa usando un método como se describe en el presente documento; y
- b. fermentar el material resultante,

- 30 preparando así un producto de fermentación.

Producto de fermentación

- El producto de fermentación de la invención puede ser cualquier producto útil. En una realización, es un producto seleccionado del grupo que consiste en etanol, n-butanol, isobutanol, ácido láctico, di-terpeno, di-terpeno glucosilado, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, 35 ácido itacónico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido adípico, un aminoácido, tal como lisina, metionina, triptófano, treonina y ácido aspártico, 1,3-propano-diol, etileno, glicerol, un antibiótico β -lactámico y una cefalosporina, vitaminas, productos farmacéuticos, suplementos para piensos para animales, especialidades químicas, materias primas químicas, plásticos, disolventes, combustibles, que incluyen biocombustibles y biogás o polímeros orgánicos, y una enzima industrial, tal como una proteasa, una celulasa, una amilasa, una glucanasa, una lactasa, una lipasa, 40 una liasa, una oxidoreductasa, una transferasa o una xilanas. Por ejemplo, los productos de fermentación pueden ser producidos por células según la invención, siguiendo métodos de preparación de células del estado de la técnica y procesos de fermentación, cuyos ejemplos, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes en el presente documento. Puede producirse n-butanol mediante células como se describe en los documentos WO2008121701 o WO2008086124; ácido láctico como se describe en los documentos US2011053231 o US2010137551; ácido 3- 45 hidroxipropiónico como se describe en el documento WO2010010291; ácido acrílico como se describe en el documento WO2009153047.

Recuperación del producto de fermentación

- Para la recuperación del producto de fermentación se usan tecnologías existentes. Para diferentes productos de fermentación son apropiados diferentes procesos de recuperación. Los métodos existentes de recuperación de 50 etanol de mezclas acuosas comúnmente usan técnicas de fraccionamiento y adsorción. Por ejemplo, todavía puede usarse una cerveza para procesar un producto fermentado, que contiene etanol en una mezcla acuosa, para producir una mezcla enriquecida que contiene etanol que luego se somete a fraccionamiento (por ejemplo, destilación fraccionada u otras técnicas similares). A continuación, las fracciones que contienen las concentraciones

de etanol más altas pueden pasarse a través de un adsorbente para eliminar la mayoría, sino toda el agua remanente del etanol.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

EJEMPLOS

5 MÉTODOS

Técnicas de biología molecular y productos químicos. Se adquirieron enzimas de restricción y T4 ADN ligasa de Fermentas. Los antibióticos higromicina (HG), fleomicina (fleo) y geneticina (G418) se adquirieron de Invivogen. Se adquirieron pYL16 y nourseotricina (nour) de Werner Bioagents. Se adquirieron ampicilina y kanamicina de Sigma-Aldrich.

- 10 Para las amplificaciones por PCR, se usó la ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity (Finnzymes). Se subclonaron fragmentos de PCR usando el kit TOPO® TA Cloning® o el kit de clonación por PCR Zero Blunt® TOPO® (ambos de Life Technologies). Los oligonucleótidos usados para la construcción de cepas se compraron de Sigma-Aldrich.

- Se amplificaron los plásmidos y se mantuvieron en células TOP10 químicamente competentes (kit TOPO® TA Cloning®, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se aislaron de minicultivos de *E. coli* usando el kit GeneJET™ Plasmide (Fermentas). Se aisló ADN genómico de levadura usando el kit de ADN genómico YeaStar™ (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 15 Se realizaron técnicas de biología molecular estándar y genética de levadura según libros de textos que incluyen Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1995).

- 20 **Cepas y mantenimiento.** Para el almacenamiento de las cepas usadas en este trabajo (Tabla 2), se realizaron cultivos en matraces oscilantes en medio rico (YP), que consiste en 10 g l⁻¹ de extracto de levadura (Oxoid) y 20 g l⁻¹ de peptona (BD Difco), complementado con tanto 2 % de glucosa (YPD), 2 % de maltosa (YPM), como 3 % de xilosa (YPX). Los cultivos se mantuvieron a 30 °C en un agitador orbital hasta que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria. Después de añadir glicerol al 30 % (v/v), las muestras de los cultivos de matraces con agitación se almacenaron en alícuotas de 2 ml a -80 °C.

- 25 **Tabla 2: Cepas usadas o preparadas en el presente documento**

Cepa	Genotipo
RN1001	<i>Mat a, ura3-52, leu2-112, gre3::loxP, loxP-Ptpi:TAL1, loxP-Ptpi::RKI1, loxP-Ptpi-TKL1, loxP-Ptpi-RPE1, delta::Padh1XKS1Tcyc1-LEU2, delta::URA3-Ptpi-xyIA-Tcyc1</i>
RN1014	RN1001 + manipulación <i>in vivo</i> sobre xilosa y ácido acético
RN1041	RN1001 <i>his3::loxP</i>
RN1053	RN1041 <i>hxt2::loxP-kanMX-loxP, hxt367::loxP-hphMX-loxP, hxt145::loxP-natMX-loxP, gal2::loxP-zeoMX-loxP</i>
YD01227	RN1014 <i>glk1::lox72; hxx1::loxP; hxx2::lox72; gal1::loxP; his3::loxPnatMXloxP</i>

- 30 **DO600 y análisis de HPLC en cultivo en matraces oscilantes.** Se muestrearon cultivos en matraces oscilantes regularmente durante el cultivo. Para mediciones de DO600, se diluyeron apropiadamente cultivos para la medición precisa y se midió la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda en un instrumento Perkin Elmer Spectrophotometer λ2. Se filtró la muestra restante para separar el medio de levadura.

- El filtrado se insertó en los viales apropiados para análisis de HPLC. Se determinaron las concentraciones de glucosa, xilosa, glicerol, ácido acético y etanol en el medio usando un sistema de HPLC Shimadzu. El sistema está equipado con horno de columna CTO-10A-vp y autoinyector SIL-10AD-vp con una precolumna (cartucho Bio-Rad H, Bio-Rad) y una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm; Bio-Rad). La elución tuvo lugar a 80 °C con H₂SO₄ 5 mM a 0,6 ml/min. El eluato se monitorizó usando un detector del índice de refracción RID-10A (Shimadzu).

- 35 **Cultivo en placas de microtitulación para el perfilado de la curva de crecimiento.** Para el cultivo de microtitulación de cepas, se usó Bioscreen C (Growth Curves Ltd.). Durante la noche, se sedimentaron los precultivos, se lavaron con agua desmineralizada y se diluyeron en agua desmineralizada a dos veces la DO600 deseada para la inoculación. Se preparó medio en dos veces la concentración según se deseara. En un pocillo de una placa de titulación en panal de abeja, se mezclaron 150 µl de medio con 150 µl de suspensión de células. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se mantuvieron los parámetros para Bioscreen C a 30 °C de T de incubación, mediciones cada 15 min, agitación en tipo Continuo, amplitud Máximo y velocidad Normal. La agitación se estableció para detenerse 5 s antes de la medición.

40

Transformación automatizada y recogida de colonias. Para la generación de la transformación de una biblioteca de mutagénesis de saturación en las cepas modelo, se realizaron cultivos en matraces con agitación en o bien YPM para RN1053 o YPX para YD01227 (véase más adelante). Se sedimentaron células de levadura y, posteriormente, se usaron en un protocolo de transformación automatizado basado en Schiestl y Gietz (1989). Se sembraron las mezclas de transformación en medio de selección que consistía en base nitrogenada de levadura (Sigma-Aldrich; 6,7 g l⁻¹), agar (BD Biosciences; 15 g l⁻¹), complementado con o bien 2 % de maltosa (transformaciones de RN1053) o 3 % de xilosa (transformaciones de YD01227). Las placas de transformación se incubaron a 30 °C, y después de la formación de colonias, las colonias volvieron a sembrarse usando un proceso automatizado que transfirió colonias a placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP) que contenían los medios de selección anteriormente citados. Se incubaron MTP con transformantes a 30 °C hasta que se observó el claro crecimiento.

Análisis de RMN. Para la cuantificación de glucosa, xilosa, glicerol, ácido acético y etanol en la muestra, se transfiere muestra de 100 µl con exactitud a un vial adecuado. Posteriormente se añadieron 100 µl de disolución de patrón interno, que contenía ácido maleico (20 g/l), EDTA (40 g/l) y cantidades traza de DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico) en D₂O, y 450 µl de D₂O.

Se registran espectros de RMN ¹H 1D en un Bruker Avance III 700 MHz, equipado con una criosonda, usando un programa de pulsos con supresión de agua (potencia correspondiente a 3 Hz) a una temperatura de 27 °C.

Las concentraciones de analito se calculan basándose en las siguientes señales (δ con respecto a DSS):

- Pico de α-glucosa a 5,22 ppm (d, 0,38 H, J = 4 Hz),
- Pico de α-xilosa a 5,18 ppm (d, 0,37 H, J = 4 Hz),
- Pico de glicerol a 3,55 ppm (dd, 2 H, J_{1,2} = 6 Hz y J_{1a,1b} = 12 Hz)
- Pico de ácido acético a 1,91 ppm (s, 3 H)
- Pico de etanol a 1,17 ppm (t, 3 H, J = 7Hz)
- El usuario de señal para el patrón:
- Pico de ácido maleico a 6,05 ppm (s, 2H)

Ejemplo 1 – Deleciones de genes transportadores de hexosa

Construcción de casetes de delección. Los cebadores usados en las construcciones de plásmido se muestran en la Tabla 3; se muestran los plásmidos generados en la Tabla 4. Se muestran esquemas con sitios de restricción usados para clonar y sitios usados para liberar construcciones de delección del esqueleto de plásmido en la Tabla 5.

Tabla 3: Cebadores (oligonucleótidos) usados en los ejemplos

SEQ ID NO:	Código interno	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Gen(es)	Fin
2	5034	Kanf	AAGCTTGCCTCGTCCCCGCC	kanMX	Amplificación kanMX
3	5035	Kanr	GTCGACACTGGATGGCGGCG	kanMX	Amplificación kanMX
4	5116	If2	ATTCTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAAGCTTGCCTCGT CCCCGCCG	loxP	Parte del flanco loxP
5	5118	Ir2	CATACATTATACGAAGTTATGCGCGCTCTAGATATCGTCGACACTGGATGGC GGCG	loxP	Parte del flanco loxP
6	5115	If1	ATCGGACGTACGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTAG TAACGGCCGCCA	loxP	Reamplificación / flanco de loxP completo
10	5117	Ir1	TCATGACGTCTCGAGGCCTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT GCGCGCT	loxP	Reamplificación / flanco de loxP completo
11	115	Natf	ACATGTAAAATGACCACTCTTGACGACACGGC	nat1	Amplificación nat1

ES 2 663 480 T3

SEQ ID NO:	Código interno	Cebador	Secuencia (5'→ 3')	Gen(es)	Fin
13	116	Natr	CAGTACTAGGGGCCAGGGCATGCTC	nat1	Amplificación nat1
14	28	H3f	TGTACATCCGGAATTCTAGATTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCC	HIS3	-
16	29	H3r	CTCGAGTATTTACACCCGCATATGATCCGTCG	HIS3	-
17	201	Hx2uf	GACTAGTACCGGTGTTTTCAAACCTAGCAACCCC	HXT2	Flanco en la dirección 5'
18	202	Hx2ur	CGTACGCGTCTTCCGGAAGGGTACCATCAGATTTCAATTTGACC	HXT2	Flanco en la dirección 5'
19	203	Hx2df	GAAGACACTCGAGACGTCCTTTGTCTGTGAAACCAAGGGC	HXT2	Flanco en la dirección 3'
20	204	Hx2dr	GTCGACGGGCCCTTATGTTGGTCTTGTTTAGTATGGCCG	HXT2	Flanco en la dirección 3'
21	205	Hx3uf	AAGCGGCCGCACTAGTACCGGTGAAACAACCTCAATAACGATGTGGGAC	HXT3	Flanco en la dirección 5'
22	206	Hx3ur	ATCCGGACGTCTTCCCTCAAGAAATCAGTTTGGGCGACG	HXT3	Flanco en la dirección 5'
23	210	Hx4df	AGAAGACGCTCGAGACGTCCTTATGGGAAGAAGGTGTTTTGCC	HXT4	Flanco en la dirección 3'
24	211	Hx4dr	ATGGATCCTAGGGGTTCTTGCAGAGTAACTGCG	HXT4	Flanco en la dirección 3'
25	212	Hx5uf	AAGCGGCCGCACTAGTACATGTGAACTTGAAACGCTCATCAAGGC	HXT5	Flanco en la dirección 5'
26	213	Hx5ur	TTCGTACGCGTCTTCCGGAGTAACATGAAACCAGAGTACCACG	HXT5	Flanco en la dirección 5'
27	229	Hx7df	AGAAGACCCTCGAGACGTCCGACGCTGAAGAAATGACTCACG	HXT7	Flanco en la dirección 3'
28	230	Hx7dr	AGTCGACGGATCCGTAATTTTTCTTCTTTAAGTGACGGGCG	HXT7	Flanco en la dirección 3'
29	243	Gal2ufn	AAGCGGCCGCACTAGTACCGGTGATCTATATTCGAAAGGGGCGG	GAL2	Flanco en la dirección 5'
30	244	Gal2urn	AACGTACGTCCGGATCATTAGAATACTTTTGAGATTGTGCGCT	GAL2	Flanco en la dirección 5'
31	233	Ga2df	AGAAGACCCTCGAGACGTCTTACCTTGAAATCTGAAGGCTGG	GAL2	Flanco en la dirección 3'
36	234	Ga2dr	GTGGATCCTAGGTAAACGGTACGAGAAAAGCTCCG	GAL2	Flanco en la dirección 3'
42	281	Hx3inr2	GCTCTTTTCACGGAGAAATTCGGG	HXT3-6-7	Comprobación de integración
43	289	Hx2inf	TCTTCGGGAAGTACTAGATAGGTGGC	HXT2	Comprobación de integración
38	290	Hx2inr	GAAGTAATCAGCCACAATACGCC	HXT2	Comprobación de integración
39	299	Hx4inr2	CCATACTATTTGTCGACTCAAGCGC	HXT5-1-4	Comprobación de integración
37	317	Hx5inf	GGGTTAATTAGTTTTAGGGGCACGG	HXT5-1-4	Comprobación de integración

SEQ ID NO:	Código interno	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Gen(es)	Fin
40	323	Hx7inr1	GATGAGAATCCTTGGAACCGC	HXT3-6-7	Comprobación de integración
41	324	Ga2inf1	TCAATTCGGAAGCTTCCTTCGG	GAL2	Comprobación de integración
44	325	Ga2inr1	CAGTGATAGTTTGGTTCGAGCGG	GAL2	Comprobación de integración
45	838	Glk1-psuc227f	ATGTCATTGACGACTTACACAAAGCCACTGAGAGAGCGGTATCCAGGCC GTCGACCTCGAGTACCGTTTCG	GLK1	Flanco de hexocinasa / casete bipartito
46	834	Hxk2-psuc227f	GCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATCC GTCGACCTCGAGTACCGTTTCG	HXK2	Flanco de hexocinasa / casete bipartito
47	645	pSUC22 7r	GCAATTTCCGGCTATACGTAAC		Casete bipartito
48	839	Glk1-psuc225r	CAATCTTCAAGTGACCTTCTCTACCCCTCGGCACCCAAAGGGTGACAAGCC GGATCCTACCGTTTCGTATAGC	GLK1	Flanco de hexocinasa / casete bipartito
49	835	Hxk2-psuc225r	GCCAGAAAGGGTTCCATGGCCGATGTGCCAAAGGAATTGATGCAACAAATCC GTCGACCTCGAGTACCGTTTCG	HXK2	Flanco de hexocinasa/casete bipartito
50	646	pSUC22 5f	CGTTCATCATGGAAAATAGC		Casete bipartito
51	846	Hxk1_lox P_f	ATGGTTCAATTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCCG GATCCACTAGCATAACTTCG	HXK1	Flanco de hexocinasa / casete de DRM
52	847	Hxk1_lox P_r	ATGGTTCAATTAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCCATGGCCG GATCCACTAGCATAACTTCG	HXK1	Flanco de hexocinasa / casete de DRM
53	848	Gal1_lox P_f	ATGACTAAATCTCATTGAGAGAAAGTATTGACCTGAGTTCAATTCTAGCGG ATCCACTAGCATAACTTCG	GAL1	Flanco de hexocinasa / casete de DRM
54	849	Gal1_lox P_r	TTATAATTCATATAGACAGCTGCCAATGCTGTTTAGAGACGATGATGTTG GGCCGCCAGTGTGATGG	GAL1	Flanco de hexocinasa /casete de DRM

Tabla 4: Plásmidos usados en la construcción de cepas

Número	Construcción	Fin	SEQ ID NO:
pRN201	pCR-BLUNT-loxP-kanMX-loxP	Marcador de resistencia dominante	8
pRN251	pCR-BLUNT-loxP-hphMX-loxP	Marcador de resistencia dominante	9
pRN365	pCR-BLUNT-loxP-natMX-loxP	Marcador de resistencia dominante	10
pRN447	pCR-BLUNT-loxP-zeoMX-loxP	Marcador de resistencia dominante	14
pRN247	pCR-BLUNT-his3:loxP-kanMX-loxP	Construcción de delección de <i>HIS3</i>	16
pRN485	pCR-BLUNT-gal2:loxP-zeoMX-loxP	Construcción de delección de <i>GAL2</i>	33
pRN566	pCR-BLUNT-hxt367:loxP-hphMX-loxP	Construcción de delección de la agrupación <i>HXT3-HXT6-HXT7</i>	34

Número	Construcción	Fin	SEQ ID NO:
pRN569	pCR-BLUNT- <i>hxt514:loxP-natMX-loxP</i>	Construcción de delección de la agrupación <i>HXT5-HXT1-HXT4</i>	35
pRN635	pCR-BLUNT- <i>hxt2:loxP-kanMX-loxP</i>	Construcción de delección de <i>HXT2</i>	36
pRN993	pRN978- <i>P_{HXT7(-491)}-GAL2-T_{ADH1}</i>	Vector de expresión de <i>GAL2</i>	58
pDB1250	pRN978- <i>P_{HXT7(-491)}-synt.wt-GAL2-T_{ADH1}</i>	Vector de expresión de <i>GAL2</i> no mutada sintética	59
pRN187	pCRE-zeoMX (basado en pSH65)	Vector de expresión de CRE recombinasa	60
pRN486	pCR-BLUNT-HIS3::loxPnatMXloxP	Construcción de delección de HIS3	61

Tabla 5: Esquema de clonación

Construcción	Fragmento	Sitios de clonación	Sitio de liberación
pRN247	<i>HIS3</i> en la dirección 5'	<i>SacI-DraI</i>	<i>XhoI-BsrGI</i>
	<i>loxP-kanMX-loxP</i>	<i>StuI-BsiWI</i>	
	<i>HIS3</i> en la dirección 3'	<i>BsiWI-ApaI</i>	
pRN485	<i>GAL2</i> en la dirección 5'	<i>NotI-BsiWI</i>	<i>BamHI-SpeI-PmlI</i>
	<i>loxP-zeoMX-loxP</i>	<i>BsiWI-XhoI</i>	
	<i>GAL2</i> en la dirección 3'	<i>XhoI-BamHI</i>	
pRN566	<i>HXT3</i> en la dirección 5'	<i>SpeI-BsiWI</i>	<i>BamHI-AgeI-NaeI</i>
	<i>loxP-hphMX-loxP</i>	<i>BsiWI-XhoI</i>	
	<i>HXT7</i> en la dirección 3'	<i>XhoI-BamHI</i>	
pRN569	<i>HXT5</i> en la dirección 5'	<i>NotI-BspEI</i>	<i>BamHI-NotI-ApaLI</i>
	<i>loxP-natMX-loxP</i>	<i>BspEI-XhoI</i>	
	<i>HXT4</i> en la dirección 3'	<i>XhoI-BamHI</i>	
pRN635	<i>HXT2</i> en la dirección 5'	<i>SpeI-BsiWI</i>	<i>AgeI-NotI-BspHI</i>
	<i>loxP-kanMX-loxP</i>	<i>BsiWI-XhoI</i>	
	<i>HXT2</i> en la dirección 3'	<i>XhoI-EcoRI</i>	

5 Se amplificó el marcador *kanMX* del plásmido pFA6-*kanMX4* (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/kanmx4.txt) usando cebadores de SEQ ID NO 1 y 2. Posteriormente, el marcador *kanMX* se flanqueó mediante la adición de flancos de *loxP* por amplificación por PCR con cebadores de SEQ ID NO 3 y 4. La reamplificación se hizo con cebadores SEQ ID NO 5 y 6. El fragmento *loxP-kanMX-loxP* resultante se clonó en pCR-BLUNT produciendo pRN201 (SEQ ID NO: 7).

10 Para la construcción de pRN251 (SEQ ID NO: 8), se aisló *hphMX* de pGRE3:*hphMX* (Kuyper *et al*, 2005). Para delecionar un *MluI* como sitio de restricción apropiado en la proximidad de *hphMX*, se cortó pGRE3:*hphMX* con *Eco32I* y se re-ligó. Posteriormente, se clonó *hphMX* como el fragmento *XhoI-MluI* en pRN201 digerido con *Sall* y *MluI* para sustituir *kanMX*.

15 Para la construcción de pRN365 (SEQ ID NO: 9), se amplificó por PCR el gen *nat1* de *Streptomyces noursei* a partir de pYL16 (Werner Bioagents) usando cebadores con SEQ ID NO: 10 y -11. Se clonaron el fragmento *PscI-Scal nat1* junto con el fragmento *Acc65I-NcoI* pRN201 en pRN201, ya linealizado con *Acc65I* y *Scal*, con el fin de sustituir *kanR* por *nat1*.

Para la construcción de pRN447 (SEQ ID NO: 12), se digirió pRN201 con *Pml*. Esto sirvió a dos fines. En primer lugar, se aisló el ORF *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (gen de resistencia a zeocina o fleomicina), y en segundo lugar, después de la re-ligación de pRN201 digerido con *Pml* se delecionó un sitio *NcoI*. Posteriormente, se clonaron *ble* como fragmento de *NcoI-Pml* y parte de pRN201 como fragmento del vector *BamHI-NcoI* en pRN201 re-ligado (falta *ble*), se digirió con *BamHI* y *SacI* produciendo pRN447.

Para la primera construcción de delección de *HIS3*, se usaron los cebadores SEQ ID13 y -14 para amplificar el locus *HIS3* de ADN genómico de levadura. Los sitios usados para cortar los flancos de *HIS3* y para ligar éstos al marcador *kanMX* flanqueado por *loxP* se muestran en la Tabla 5. El producto de ligación se digirió con *SacI* y *Apal* y se clonó en pCR-BLUNT digerido con *SacI* y *Apal*. El plásmido resultante es pRN247 (SEQ ID NO: 15).

Para la delección de los ocho transportadores de hexosa principales (*HXT1-7* y *GAL2*) en *S. cerevisiae*, se generaron cuatro construcciones de delección (véase la Tabla 4). Cada construcción de delección contuvo un marcador de resistencia dominante flanqueado por *loxP* diferente. Para cada gen *HXT* se amplificaron flancos de 400-700 pb usando los cebadores enumerados en la Tabla 3 (SEQ ID NO: 16-31) usando ADN genómico de RN1001 como molde. Se ligaron el flanco en la dirección 5', el marcador de resistencia dominante y el marcador en la dirección 3' usando los fragmentos y los sitios de clonación enumerados abajo en la Tabla 5. Las ligaciones se amplificaron usando los cebadores directos de los flancos en la dirección 5' y el cebador inverso de los flancos en la dirección 3' (combinaciones de cebador SEQ ID NO: 16+19, SEQ ID NO: 20+27, SEQ ID NO: 24+23 y SEQ ID NO: 28+31). Los fragmentos de PCR fusionados se clonaron en pCR-BLUNT para obtener pRN485, pRN566, pRN569, pRN635 (SEQ ID NO: 32-35, respectivamente). Para obtener altos rendimiento de ADN de plásmido, los plásmidos se aislaron de cultivos de *E. coli* de 50 ml usando NucleoBond® Xtra Midi kit (Bioké, Leiden, Los Países Bajos). Antes de la transformación en levadura, se liberaron construcciones de delección del esqueleto de plásmido por digestión con los sitios de restricción de liberación enumerados en la Tabla 5.

Construcción de cepas. Se hizo auxótrofa a histidina la cepa fermentadora de xilosa RN1001 por la inserción de *loxP-kanMX-loxP* (liberado de pRN247; SEQ ID NO 15) en el locus *HIS3*. Posteriormente, el marcador se eliminó mediante expresión transitoria del plásmido pRN187 (derivado de pSH65 que expresa *cre* recombinasa inducible por galactosa; SEQ ID NO 60). Se seleccionó la introducción de pRN187 en fleo y se indujo la expresión de *CRE* recombinasa en medio YP complementado con galactosa. La cepa *his3:loxP* resultante se llamó RN1041. Los transportadores de hexosa se deleccionaron en el siguiente orden: 1) agrupación *HXT3-HXT6-HXT7*, 2) agrupación *HXT5-HXT1-HXT4*, 3) *GAL2*, 4) *HXT2*. Las construcciones de delección se linealizaron o liberaron del esqueleto de plásmido cortando con las combinaciones de enzimas enumeradas en la Tabla 5 y éstas se integraron en el genoma de RN1041. Todas las transformaciones se sembraron en placa en medio de extracto de levadura (10 g/l), peptona (20 g/l) y agar (15 g/l) complementado con 20 g/l de maltosa. La maltosa se añadió al medio, debido a que la captación de este disacárido va mediante un sistema de transporte alternativo al sistema de transporte de la glucosa (Wieczorke *et al*, 1999). Con cada delección de una (agrupación de) gen(es) *HXT*, se insertó un marcador adicional en el orden: 1) *hphMX*, 2) *natMX*, 3) *zeoMX*, 4) *kanMX*. Con cada marcador adicional insertado, el antibiótico respectivo se complementó adicionalmente al medio en el siguiente orden: 1) HG, 2) HG y nour, 3) HG, nour y fleo, 4) HG, nour, fleo y G418. Después de la integración de las cuatro construcciones de delección, se aisló una única colonia bajo selección de los cuatro antibióticos. Se verificaron las correctas integraciones por análisis por PCR en cepas aisladas de ADN genómico. Se usaron cebadores fuera del sitio de integración (combinaciones SEQ ID NO: 36+37, SEQ ID NO: 38+39, SEQ ID NO: 40+41, SEQ ID NO: 42+43; secuencias enumeradas en la Tabla 3).

Caracterización de cepas. Para caracterizar las cepas transportadoras de hexosa (intermedias), se realizaron cultivos en matraces oscilantes. Se inocularon cultivos a DO600=0,1. La cepa resultante, RN1053 ($\Delta hxt1-7$; *gal2*-mutante RN1041; véase la Tabla 2 para el genotipo exacto), mostró un patrón de crecimiento retardado sobre Verduyn-urea (medio mineral según Verduyn usando urea como fuente de nitrógeno; Luttk *et al*, 2001) complementado con 0,2 g l⁻¹ de histidina (Sigma-Aldrich; Verduyn-urea-his; para complementar la auxotrofia de histidina) y 15 g l⁻¹ de glucosa y 20 g l⁻¹ de xilosa solo a partir de cultivar lentamente sobre glucosa solo después de 60 horas; de forma interesante, cuando la glucosa estuvo presente en el medio xilosa se acabó también después de 150 h (Figura 1), que indica que uno o más de los genes transportadores de hexosa crípticos (*HXT8-17*) se indujo sobre glucosa y facilitó el transporte de xilosa (Figura 1). Sin embargo, sobre xilosa como única fuente de carbono, RN1053 no creció sobre Verduyn-urea (+ 20 g l⁻¹ % de xilosa durante el periodo de cultivo (Figura 2) que indica que la cepa es útil como cepa modelo para probar los transportadores de xilosa putativos. RN1053 se mantuvo adicionalmente sobre YPM.

Ejemplo 2 – Delecciones de genes hexocinasa

Construcción de casetes de delección. Para la delección de genes hexocinasa se diseñaron oligonucleótidos (SEQ ID NO: en la Tabla 3) que comprendían secuencias flanqueantes de 60 nucleótidos homólogos al locus del gen hexocinasa y 20 nucleótidos homólogos a un casete de marcador de resistencia dominante flanqueado por *loxP*. Los oligonucleótidos se usaron para amplificar las construcciones de delección. Productos de PCR posteriores se purificaron en filtro en columna (Fermentas GeneJet Kit) y se usaron para experimentos de transformaciones. Se usaron tres tipos de casetes de delección: en primer lugar, para las delecciones *GLK1* y *HXK2* se usó un sistema bipartito. Un fragmento consistió en un sitio *lox66*, *KanMX*, promotor *GAL1* en la dirección 5' de *CRE*, y la parte 5' de

CRE (*CRE1*) se amplificó de pSUC227 con un cebador específico de gen (SEQ ID NO: 44 para *GLK1* y SEQ ID NO: 45 para *HXK2*) y un cebador específico de pSUC227 (SEQ ID NO: 46); el segundo fragmento consistió en la parte 3' de *CRE* (*CRE2*) con solapamiento sobre *CRE1*, y un sitio *lox71*, amplificado de pSUC225 con nuevamente un cebador específico de gen (SEQ ID NO: 47 para *GLK1* y SEQ ID NO: 48 para *HXK2*) y un cebador específico de pSUC225 de SEQ ID NO: 49. Mediante recombinación homóloga, los dos fragmentos se integran como *lox66-kanMX-CRE-lox71* en el locus de hexocinasa (secuencias de pSUC225 y pSUC227 y método proporcionado en el documento PCT/EP2013/055047). En segundo lugar, para delecciones *HXK1* (cebadores SEQ ID NO: 50-51) y *GAL1* (cebadores de SEQ ID NO: 52-53), se amplificó un marcador de resistencia dominante (DRM) flanqueado por *loxP* con secuencias flanqueantes homólogas a la hexocinasa respectiva para sustituir la región codificante en el locus; como moldes para la amplificación por PCR del casete de DRM se usaron pRN774 (*loxP-hphMX-loxP*; SEQ ID NO: 54) y pRN775 (*loxP-natMX-loxP*; SEQ ID NO: 55), respectivamente. En tercer lugar, para la delección *HIS3* para permitir la complementación del fenotipo auxotrófico por plásmidos episómicos transportadores, se integró una construcción similar con flancos homólogos a *HIS3* como se usó para generar RN1041 (RN1001-*his3:loxP*, en la familia de cepas RN1053; véase el Ejemplo 1 anterior). En este caso, la construcción poseyó *natMX* como marcador de resistencia dominante en lugar de *kanMX* (SEQ ID NO 61).

Construcción de cepas. Para la generación de una cepa incapaz del metabolismo hexosa, pero capaz del transporte de hexosa, se hicieron delecciones del gen hexocinasa en la cepa fermentadora de xilosa RN1014 (Tabla 2; Figura 3 para el esquema de delección).

Como se mencionó, en el caso de *GLK1* y *HXK2*, los casetes de rotura fueron bipartitos. Mediante recombinación homóloga, los dos fragmentos se integran como *lox66-kanMX-CRE-lox71* en el locus de hexocinasa. La integración se seleccionó en YPD complementado con G418. Los casetes de rotura para *HXK1* y *GAL1* consistieron en un fragmento: ya sea *loxP-natMX-loxP* o *loxP-hphMX-loxP*, respectivamente. RN1014 se transformó con los productos de PCR purificados y se seleccionó la integración en el antibiótico apropiado. Adicionalmente, *HIS3* se alteró con una construcción similar (SEQ ID NO: 61) usada para la generación de RN1053. En este caso, *natMX* fue el marcador de selección en lugar de *kanMX*.

Los genes se deleccionaron en el siguiente orden: 1) *GLK1*, 2) *HXK1*, 3) *GAL1*, 4) *HXK2* y 5) *HIS3*. Después de la delección de *GLK1* y *HXK1*, ambos marcadores se recircularon por recombinación mediada por Cre inducida por galactosa. Después de la delección de *HXK2*, la cepa intermedia se mantuvo en medio rico que contenía xilosa (YPX). Después de la delección de *HIS3*, se eliminaron los marcadores *hphMX* y *kanMX* integrados por recombinación de CRE inducida por galactosa. Para garantizar el crecimiento de la cepa, se añadieron 2 % de xilosa a YP 2 % de galactosa + nourseotricina (YPGX). La selección en nourseotricina garantizó el mantenimiento del marcador *natMX* en el locus *HIS3* dejando un rasgo de selección que iba a usarse posiblemente después. Después del aislamiento de una sola colonia, la cepa se verificó para sus delecciones y el perfil de secuencia por PCR de colonias, y se llamó YD01227.

Caracterización de cepas. En experimentos en cultivos en matraces oscilantes aerobios usando Verduyn-urea-his, se caracterizó otra colonia con el mismo genotipo de inactivación (KO) de hexocinasa cuádruple (col 2) como YD01227 en un pre-cribado para su capacidad para consumir xilosa en ausencia y presencia de un exceso de glucosa (10 %), y para su capacidad para consumir glucosa (Figura 4). Los cultivos se inocularon a DO600=0,1. Tanto RN1014 como KO de hexocinasa cuádruple son capaces de crecer y consumir xilosa (datos no mostrados). Y, como era de esperar, el KO de hexocinasa cuádruple ni crece ni consume glucosa, mientras que RN1014 sí (datos no mostrados). Además, el exceso de glucosa (10 %) previene el crecimiento y consumo de xilosa durante al menos 96 horas, mientras que RN1014 utiliza xilosa (Figura 4).

En experimentos de Bioscreen C, YD01227 y la col 2 anteriormente mencionada se cribaron para crecimiento sobre Verduyn-urea-his complementado con diferentes azúcares y mezclas de azúcar. Los cultivos se inocularon a DO600=0,05. YD01227 se cultivó sobre xilosa, pero no fue capaz de crecer sobre glucosa, maltosa o galactosa (datos no mostrados). Se cribaron mezclas de glucosa-xilosa para soportar una elección de composición de medio adecuada para el cribado para transportadores específicos de pentosa. Como se observa en la Figura 5, con una relación de glucosa: xilosa de 5:1 se mostró la inhibición del crecimiento óptima sobre xilosa para la cepa YD01227. Esto fue el caso para tanto una carga alta de azúcar (10:2), como para una carga baja (2,5: 0,5). YD01227 se mantuvo adicionalmente sobre YPX para almacenamiento y manipulación.

Ejemplo 3. Biblioteca de mutagénesis de saturación de *GAL2* y otras construcciones.

Se ordenó una construcción de ADN sintética para *GAL2* no mutada (WT) en GeneArt (SEQ ID NO: 56; Invitrogen) y se usó como molde para la mutagénesis dirigida al sitio. La construcción de ADN de *GAL2* WT sintética se clonó en pRN993 (SEQ ID NO: 57) como fragmento *XbaI-BssHII* intercambiando la construcción de *GAL2* WT sintética por otro ORF para generar pDB1250 (SEQ ID NO: 58). pDB1250 es un vector de levadura lanzadera basado en pRS313, que lleva como las principales características prominentes, además de ORF de *GAL2* sintéticamente preparado: 1) un casete de expresión de *HIS3* para complementar la auxotrofia a histidina, 2) un CEN.ARSH para mantener 1-2 copias (bajo número de copias) del vector de expresión en células de levadura, 3) promotor *HXT7* truncado (-491 pb) que produce niveles de expresión medios de ORF en la dirección 3', 4) terminador *ADH1*, y 5) gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*) para la selección en células TOP10 de *E. coli* (véase anteriormente) para fines

de clonación (Figura 6). Se ordenó la biblioteca de mutagénesis de saturación para al menos 13 cambios de aminoácidos no naturales en 30 posiciones de aminoácidos en Gal2p de Invitrogen Life Technologies. (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/gene-synthesis/directed-evolution/GeneArt-Site-Saturation-Mutagenesis.html>); para posiciones y cambios de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de Gal2p no mutada (SEQ ID NO: 59) véase la Tabla 6.

5

Tabla 6: Biblioteca de mutagénesis de saturación de un único sitio de GAL2

N.º sitios	Gal2		Nº AA no wt	AA no wt
	Posición	AA WT		
1	85	F	15	A, C, D, E, G, H, K, M, N, P, Q, R, S, T, V
2	89	T	18	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y
3	187	V	17	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, W, Y
4	191	A	19	C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
5	214	Y	15	A, C, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
6	215	Q	16	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, R, S, V, W, Y
7	218	I	15	A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, R, S, T, V, W
8	219	T	15	A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
9	222	I	15	A, C, D, E, G, H, K, M, P, R, S, T, V, W, Y
10	226	Y	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
11	338	Q	18	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
12	339	M	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
13	341	Q	13	D, E, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, Y
14	342	Q	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
15	343	L	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
16	346	N	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
17	347	N	13	A, D, E, G, H, I, K, L, Q, R, S, T, V
18	350	F	14	D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
19	373	G	19	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
20	376	N	18	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
21	380	T	18	A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y
22	383	S	17	A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
23	444	F	19	A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
24	446	Y	13	D, E, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V
25	448	T	18	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, V, W, Y
26	449	T	19	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y
27	451	A	18	C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
28	455	W	18	A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y
29	478	N	16	A, C, D, F, G, H, I, K, L, P, Q, R, V, W, Y

N.º sitios	Gal2		Nº AA no wt	AA no wt
	Posición	AA WT		
30	479	W	18	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y

Se insertaron construcciones resultantes por clonación personalizada en GeneArt (Invitrogen, Regensburg, Alemania) en pDB1250 (SEQ ID NO: ID58).

Ejemplo 4: Cribado de contador de la actividad de transporte de glucosa

- 5 **Objetivo.** Usando el cribado de contador de la actividad de transporte de glucosa (GTAC), es decir, transformación de la cepa mutante de hexocinasa YD01227 como hospedador para introducir variantes de GAL2 y cribado de los transformantes resultantes en medio para el crecimiento y consumo de xilosa en presencia de una cantidad 5 veces más alta de glucosa, pueden identificarse mutaciones que favorecen la xilosa anterior en presencia de un excedente de glucosa en la variante de Gal2p (es decir, afinidad por xilosa más alta que por la reducción de glucosa o más
- 10 preferentemente eliminación completa de la capacidad de transporte de glucosa, mientras que se mantiene la capacidad de transporte de xilosa más o menos intacta).

- 15 **Transformación y recogida de colonias.** Se transformó YD01227 con un total de 497 construcciones, llevando cada una un mutante GAL2. Se incluyó una construcción con secuencia de GAL2 no mutada (pDB1250; SEQ ID NO: 58) como control. Para cada transformación, 3 colonias, cuando estuvieron disponibles, se volvieron a sembrar en MTP de medio agar ascendiendo a 1450 transformantes. Los 1450 transformantes se cribaron en tres partes. Para cada parte del cribado, se incluyó GAL2 no mutada como control.

- 20 **Pre-cultivo y cribado.** Para el pre-cultivo, se transfirieron transformantes por proceso automatizado de MTP de medio de agar de selección a placas de pocillos semi-profundos de 96 pocillos (96HDWP) que contenían medio de selección líquido que consistía en medio mineral (según Verduyn, con urea como fuente de nitrógeno) complementado con 3 % de xilosa. Se cultivaron 96HDWP durante 3 días de pre-cultivo en un agitador orbital a 30 °C y 750 rpm. Posteriormente, para cada pocillo se transfirieron 20 µl de cultivo por proceso automatizado a placas de 24 pocillos profundos (24 DWP) que contenían 2,5 ml de Verduyn-urea complementado con la mezcla de
- 25 azúcares glucosa:xilosa en una relación 5:1 con las siguientes concentraciones: 10 g l⁻¹ de glucosa y 2 g l⁻¹ de xilosa (medio YD10). Para cada uno de los tres puntos de muestreo se inoculó una serie de 24DWP. En cada 24DWP, se inoculó un control de crecimiento de RN1001 para tener una indicación de los efectos de variación de placas. Después de 24 horas, 72 horas y 96 horas se realizó el muestreo automático y transferencia a 96HDWP para la medición de DO automatizada a 600 nm de longitud de onda.

- 30 Después de la última medición de DO después de 96 horas, las células se sedimentaron después de la centrifugación y se recogieron 100 µl de sobrenadante por proceso automatizado para los constituyentes de análisis residual de RMN de flujo en el medio después del cultivo (véase anteriormente para la descripción del método). Para cada construcción y cada momento de tiempo, se promediaron la glucosa residual medida y las concentraciones de xilosa para los diferentes duplicados. Con el fin de comparar las diferentes partes del cribado, se calculó un valor relativo basado en la diferencia con la concentración de xilosa residual no mutada medida en la parte particular del cribado de GTAC, según la siguiente fórmula:

35
$$\text{Xil rel} = \frac{(\text{xilosa residual}_{\text{Gal2-no mutada}} - \text{xilosa residual}_{\text{Gal2-mu tan te}})}{\text{xilosa residual}_{\text{Gal2-no mutada}}} \times 100 \%$$

- Resultados.** Mientras que RN1001 presentó consumo completo de tanto glucosa como xilosa, los transformantes YD01227 de construcciones de GAL2 de bibliotecas no mutadas y de mutagénesis no consumieron glucosa y presentaron un espectro de concentraciones residuales de xilosa que representan su capacidad individual para consumir xilosa en presencia de glucosa (Figura 7A). Como se muestra en la Figura 7B, el consumo de xilosa
- 40 presentó una alta correlación ($R^2=0,93$) con las medidas de crecimiento (DO600). Como el cribado se realizó en condiciones aerobias, y se mostró poca formación de etanol (datos no mostrados) y el crecimiento presentó alta correlación con el consumo de xilosa, se usaron las concentraciones de xilosa residual como parámetro principal para comparar variantes de GAL2 con no mutada. La comparación de todas las variantes de GAL2 mutantes probadas frente a GAL2 no mutada sobre el consumo de xilosa (Xil rel promedio) a las 96 horas se enumera en la
- 45 Tabla 7. Todas las mutaciones que afectan el transporte de glucosa con respecto al beneficio del transporte de xilosa tienen Xil rel>0 (Tabla 7). Se clasificaron las posiciones de TOP con respecto a la diana para una segunda ronda de mutagénesis basándose en su puntuación de Xil rel promedio por mutación; mutaciones específicas se clasificaron por preferencia basándose también en la puntuación de Xil rel (Tabla 8).

Tabla 7. DO600 relativa (DO600rel) y consumo de xilosa (Xilrel) del cribado de GTAC. La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
85	F	A	1,45
		C	0,66
		D	-1,89
		E	-13,09
		G	-1,06
		H	1,76
		K	-20,81
		M	7,03
		N	1,96
		P	2,83
		Q	37,68
		R	-1,93
		S	19,81
		T	50,51
		V	32,76
89	T	A	11,68
		C	13,22
		D	19,68
		F	-9,97
		H	25,59
		I	-17,32
		K	-24,84
		L	12,38
		M	-8,38
		N	9,88
		Q	-16,03
		R	-16,11
		S	-11,44
		V	41,06
		Y	-2,89
187	V	A	26,84
		C	9,98

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		D	3,76
		E	6,21
		F	14,53
		G	10,01
		H	8,32
		I	6,69
		K	4,09
		L	4,12
		M	1,85
		Q	10,17
		R	3,05
		S	7,54
		T	10,41
		W	1,81
		Y	1,22
191	A	C	4,70
		D	12,43
		E	-2,61
		F	5,49
		G	15,83
		H	2,83
		I	11,93
		K	1,94
		L	-8,25
		M	-14,37
		N	20,35
		P	14,89
		Q	2,94
		R	-1,09
		S	3,09
		T	10,61
		V	4,52
		W	2,49
		Y	1,93

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
214	Y	A	-12,81
		C	-5,85
		G	18,41
		I	-12,07
		K	-4,66
		L	35,33
		M	23,92
		N	32,71
		P	18,44
		Q	39,94
		R	25,50
		S	14,91
		V	55,48
		W	47,35
215	Q	A	2,01
		C	9,90
		D	13,62
		F	10,12
		G	-9,62
		H	-18,18
		I	17,72
		L	24,63
		M	21,59
		N	-11,47
		S	2,14
		V	-8,22
		W	-20,47
		Y	-8,07
218	I	A	17,98
		C	5,52
		D	4,64
		E	8,44
		G	4,62
		H	9,88

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		K	27,86
		L	9,73
		M	5,80
		N	24,31
		R	-0,73
		S	24,96
		T	-2,65
		V	7,69
		W	-2,10
219	T	A	52,55
		C	25,05
		D	18,04
		E	-14,58
		F	43,86
		G	46,45
		I	-11,07
		K	-4,44
		M	-18,28
		N	7,85
		Q	-22,81
		R	-24,62
		S	4,90
		W	-16,77
222	I	A	11,37
		C	13,45
		D	20,91
		E	3,35
		G	3,75
		H	9,73
		K	-4,92
		M	4,39
		P	0,97
		S	1,85
		T	-1,59

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		V	8,42
		W	-8,04
		Y	7,87
226	Y	A	63,63
		C	62,07
		D	81,68
		E	70,43
		G	39,06
		H	5,10
		I	32,79
		K	-1,86
		L	42,48
		M	74,04
		N	62,81
		P	49,78
		Q	56,23
		R	65,53
		S	14,97
		T	7,27
		V	-11,15
		W	44,48
338	Q	A	38,18
		C	52,66
		D	33,17
		E	46,93
		F	46,65
		G	13,80
		H	26,28
		I	28,32
		L	33,08
		M	-2,53
		N	22,26
		P	3,96
		R	39,83

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		S	3,96
		T	11,84
		V	24,84
		W	35,55
		Y	19,90
339	M	A	50,56
		C	30,36
		D	46,71
		E	10,48
		F	63,75
		G	73,03
		H	67,99
		I	40,96
		K	71,92
		L	67,43
		N	83,73
		P	12,77
		Q	77,74
		R	70,25
		S	81,65
		T	57,02
		V	82,35
		W	-23,02
		Y	37,43
341	Q	D	-20,08
		E	-3,38
		H	-22,19
		L	46,71
		M	23,17
		N	11,77
		R	-5,18
		S	15,78
		T	28,67
		Y	19,78

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
342	Q	A	61,47
		C	64,63
		D	48,62
		E	34,90
		F	45,61
		G	14,10
		H	46,28
		I	16,81
		K	41,75
		L	37,38
		M	27,70
		N	32,30
		P	44,88
		R	23,95
		S	68,48
		T	50,54
		V	24,39
		W	59,43
		Y	76,45
343	L	A	9,67
		C	8,74
		D	9,41
		E	2,39
		F	15,49
		G	11,87
		H	16,96
		I	10,67
		K	40,15
		M	16,94
		N	14,03
		P	26,08
		Q	8,73
		R	29,11
		S	20,28

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		T	14,38
		V	-6,06
		W	7,76
		Y	20,43
346	N	A	21,99
		C	17,11
		D	8,88
		E	-8,32
		F	9,91
		G	8,42
		H	26,01
		I	17,12
		K	17,48
		L	6,48
		M	13,19
		Q	19,93
		R	7,94
		S	23,37
		T	23,19
		V	47,09
		W	45,58
		Y	41,70
347	N	A	44,64
		D	26,67
		E	25,36
		G	-22,71
		H	11,18
		I	27,33
		K	-22,05
		L	7,79
		Q	-14,96
		R	-15,36
		S	-15,56
		T	-19,33

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		V	-28,12
350	Y	D	2,93
		E	-13,15
		H	-19,99
		I	-10,76
		K	3,00
		L	40,49
		M	5,01
		N	13,57
		Q	0,66
		R	57,58
		S	15,25
		T	21,64
		V	13,39
		Y	-7,36
373	G	A	25,90
		C	36,56
		D	36,22
		E	41,01
		F	15,15
		H	6,96
		I	9,10
		K	20,72
		L	51,94
		M	35,03
		N	38,49
		P	35,75
		Q	5,50
		R	8,35
		S	11,62
		T	10,67
		V	21,91
		W	22,96
		Y	31,04

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
376	N	A	36,70
		C	78,63
		D	19,23
		E	20,15
		F	92,62
		H	39,30
		I	99,46
		K	7,53
		L	93,69
		M	97,33
		P	51,70
		Q	24,24
		R	27,86
		S	59,39
		T	99,01
		V	96,57
		W	13,51
		Y	43,95
380	T	A	53,06
		C	42,34
		D	37,28
		E	-29,92
		F	54,67
		G	34,22
		I	47,40
		K	42,12
		L	39,25
		M	74,78
		N	49,79
		P	43,28
		Q	43,31
		R	42,31
		S	42,03
		V	42,53

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		W	51,16
		Y	25,09
383	S	A	57,21
		C	67,78
		D	29,42
		E	54,55
		F	52,71
		G	39,71
		I	25,88
		K	49,19
		L	37,72
		M	52,64
		N	58,14
		Q	83,94
		R	61,78
		T	71,85
		V	19,38
		W	65,32
		Y	62,76
444	F	A	32,41
		C	14,64
		D	13,21
		E	16,38
		G	12,78
		H	25,62
		I	31,95
		K	28,79
		L	39,43
		M	17,30
		N	5,43
		P	15,65
		Q	19,63
		R	0,06
		S	10,94

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		T	7,44
		V	37,29
		W	2,94
		Y	32,56
446	F	D	10,80
		E	10,63
		H	16,93
		I	8,65
		K	-3,40
		L	22,78
		M	18,62
		N	14,99
		Q	34,25
		R	-8,44
		S	-20,59
		T	-16,07
		V	-9,48
448	T	A	76,95
		C	58,53
		D	66,10
		E	53,25
		F	61,94
		G	65,05
		H	67,00
		I	58,01
		K	54,82
		L	63,49
		M	77,64
		P	64,39
		Q	58,15
		R	33,80
		S	59,40
		V	53,50
		W	56,69

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		Y	47,73
449	T	A	57,64
		C	50,44
		D	55,89
		E	37,14
		F	92,65
		G	61,00
		H	82,47
		I	71,71
		K	79,30
		L	81,03
		M	89,29
		N	84,60
		P	37,06
		Q	81,19
		R	82,14
		S	83,15
		V	74,98
		W	80,75
		Y	79,80
451	T	C	10,57
		D	9,68
		E	15,39
		F	13,38
		G	43,34
		H	7,65
		I	17,96
		K	8,59
		L	11,00
		M	5,68
		N	14,56
		P	11,89
		Q	8,63
		R	4,46

ES 2 663 480 T3

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		S	13,08
		T	2,10
		V	4,99
		W	15,25
		Y	1,62
455	W	A	1,31
		C	1,19
		D	-6,13
		E	19,68
		F	-1,57
		G	0,73
		I	-2,70
		K	6,91
		L	19,08
		M	19,92
		N	19,10
		P	14,76
		Q	3,03
		R	-14,86
		S	8,05
		T	19,75
		V	10,66
		Y	7,30
478	N	A	-11,71
		C	-1,14
		D	-3,08
		F	30,35
		G	8,29
		H	-15,02
		I	10,06
		K	9,95
		L	-3,27
		P	30,98
		Q	4,37

Pos	AA wt	AA mut	Xilrel
		R	11,41
		V	21,91
		W	3,25
		Y	4,98
479	W	C	13,20
		D	6,12
		E	11,20
		F	1,41
		G	1,34
		H	6,90
		I	1,50
		K	5,54
		L	7,80
		M	5,47
		N	2,20
		P	7,07
		Q	15,50
		R	1,63
		S	18,50
		T	21,51
		V	5,89
		Y	8,63

Tabla 8. Posiciones de Gal2p y mutaciones identificadas en el cribado de GTAC se ordenan por preferencia. PUNTUACIÓN PRINCIPAL es la puntuación de Xilrel para la sustitución de aminoácidos dentro que una posición que da la mejora más clara en comparación con Gal2p no mutada. Esto permite una clasificación de las mutaciones más influyentes y posiciones relevantes con respecto a la diana en Gal2p para eliminar la afinidad por glucosa.

5

	GTAC	Mutaciones					
	Posición	AA wt	Más preferida	Preferida	Menos preferida	Inactiva	PUNTUACIÓN PRINCIPAL
Más preferida	376	N	FILMTV	ACHPSY	DEKQRW		99,46
	449	T	FM	HIKLNQRSWY	ACDEGP		92,65
	383	S	CQRTWY	AEFKMN	DGILV		83,94
	339	M	NQSV	AFGHKLRT	CDEIPY	W	83,73
	226	Y	ACDMNR	EQ	GHILPSTW	KV	81,68
	448	T	AM	CDEFGHIKLPQSWW	RY		77,64

	GTAC	Mutaciones					
	Posición	AA wt	Más preferida	Preferida	Menos preferida	Inactiva	PUNTUACIÓN PRINCIPAL
	342	Q	ACSWY	DFHKPT	EGILMNRV		76,45
	380	T	AFMW	CDGIKLNQRSV	Y	E	74,78
	350	F	LR	NSTV	DKMQ	EHY	57,58
	214	Y	VW	LNQ	GMPRS	ACIK	55,48
	338	Q	CEF	ADHILRW	GNPSTVY	M	52,66
	219	T	AFG	CD	NS	EIKMQRW	52,55
	373	G	L	ACDEMNPVWY	FHIKQRST		51,94
	85	F	QTV	S	ACHMNP	DEGKR	50,51
Preferida	346	N	VWY	AHST	CDFGIKLMQR	E	47,09
	341	Q	L	MT	NSY	DEHR	46,71
	347	N	A	DEI	HL	GKQRSTV	44,64
	451	A	G	CDEFILNPSW	HKMQRTVY		43,34
	89	T	DHV	ACL	N	FIKMQRSY	41,06
	343	L	K	PRSY	ACDEFGHIMNQ W	V	40,15
	444	F	AILVY	HK	CDEGMNPQSTW	R	39,43
	446	F	Q	HLMN	DEI	KRSTV	34,25
	478	N	FP	V	GIKQRWY	ACDHL	30,98
Menos preferida	218	I	KNS	AHL	CDEGMV	RTW	27,86
	187	V	A	CFGQT	DEHIKLMRSWY		26,84
	215	Q	LM	CDF	AIS	GHNWY	24,63
	479	W	QST	CE	DFGHIKLMNPRVY		21,51
	222	I	D	ACH	EGMPSTVY	KTW	20,91
	191	A	N	DGIPT	CFHKQSVWY	ELMR	20,35
	455	W	ELMNT	PV	ACGKQSY	DFIR	19,92

Las mutaciones más destacadas se encontraron en la posición 376 cuando el aminoácido no mutado Asn se intercambió por aminoácidos con grandes cadenas laterales hidrófobas tales como Phe, Ile, Leu, Met, Thr o Val; estas variantes facilitaron el claro crecimiento y el consumo casi completo de xilosa y casi ningún transporte de actividad para glucosa en el cribado de GTAC (Figura 8). Los presentes inventores han encontrado que aminoácidos ventajosos en la posición 376 tienen un volumen de van der Waals de 85 a 138 Å³ y una hidrofobia de 10 a 100 Δt_R, o en una realización un volumen de van der Waals de 100 a 138 Å³ y una hidrofobia de 10 a 100 Δt_R. Una realización importante adicional es aminoácidos específicos en la posición 339, donde los presentes inventores han encontrado que un aminoácido que tiene un hidrofobia de -30 a 10 Δt_R produce mutantes con actividad de transporte de glucosa reducida. Esto se ilustra por la Figura 11.

Los valores para el volumen de van der Waals (Å³) para aminoácidos usados en el presente documento son como se describen en: http://www.proteinsandproteomics.org/content/free/tables_1/table08.pdf. La bibliografía correspondiente es N. J. Darby, Thomas E. Creighton, Protein Structure (1993) Oxford University Press. Los valores

para la hidrofobia (Δt_R) de los aminoácidos usados en el presente documento son como se describen en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.310010507/pdf>. La referencia correspondiente a esto es Monera, O.D. et al, Journal of Peptide Science Vol. 1 319-329 (1995).

Ejemplo 5: Cribado de la actividad de transporte de xilosa

Objetivo. Usando el cribado de la actividad de transporte de xilosa (XTA), es decir, usando la cepa mutante del transportador de hexosa RN1053 como hospedador para introducir variantes de GAL2 y cribando los transformantes resultantes en medio para crecimiento sobre bajas concentraciones de xilosa (1 g l^{-1}), pueden identificarse mutaciones que aumentan la actividad de transporte de xilosa en la variante de Gal2p. La actividad de transporte puede definirse por más de un parámetro, por ejemplo, la afinidad del transportador (expresada por la constante de Michaelis, es decir, K_m), o la tasa del transportador (expresada como $V_{m\text{áx}}$). También es posible que una mutación aumente la expresión del transportador, y así mejore la actividad de transporte de xilosa en la célula hospedadora.

Transformación y recogida de colonias. Se transformó RN1053 con un total de 468 construcciones, llevando cada una el mutante GAL2. Se incluyó una construcción con secuencia de GAL2 no mutada (SEQ ID 58) como control. Para cada transformación, volvieron a sembrarse 1-3 colonias en MTP de medio de agar ascendiendo a 1229 transformantes. Los 1229 transformantes se cribaron en dos partes. Para cada parte del cribado, se incluyó GAL2 no mutada como control.

Pre-cultivo y cribado. Para el pre-cultivo, se transfirieron transformantes resultantes de la transformación automatizada y la recogida de colonias por proceso automatizado de las MTP de medio de agar de selección a 96HDWP que contenían en cada pocillo 250 μl de Verduyn-urea complementado con 2 % de maltosa. Después de 3 días de pre-cultivo en un agitador orbital a 30°C y 750 rpm, se transfirieron 5 μl de cultivo a tres 96HDWP diferentes que contenían 250 μl de Verduyn-urea complementado con 1 g l^{-1} de xilosa (medio RN01), representando cada 96HDWP un punto de muestreo. En cada placa (24 DWP o 96 HDWP) se inoculó al menos un control de crecimiento de RN1001 para tener una indicación de los efectos de placa a placa. Después de 24 horas, 72 horas y 96 horas se recogió una serie de 96HDWP para la medición de DO automatizada a 600 nm. Para cada construcción y cada momento de tiempo se promediaron los valores de DO600 para los duplicados diferentes. Con el fin de comparar las diferentes partes del cribado, se calculó un valor relativo basándose en la diferencia con el valor de DO600 no mutada medido en la parte particular del cribado de XTA, según la siguiente fórmula:

$$\text{DO600 rel} = \frac{(\text{DO600}_{\text{Gal2-mutante}} - \text{DO600}_{\text{Gal2-no mutada}})}{\text{DO600}_{\text{Gal2-no mutada}}} \times 100 \%$$

Resultados. En ambas partes del cribado de XTA, RN1001 es parte de las posiciones de TOP15 basándose en el perfil de crecimiento en comparación con Gal2p no mutada; RN1001 tiene el complemento completo de transportadores de hexosa y la presencia de RN1001 en TOP15 en ambas partes del cribado de XTA (Figura 9) indica que uno o más transportadores de hexosa endógenos en levadura facilitan la captación de afinidad de alta afinidad a diferencia de los transformantes RN1053 de Gal2 no mutada que presentaron peores perfiles de crecimiento. Las variantes mutantes con los cambios de un único aminoácido presentes en TOP15 presentaron una elevada afinidad por xilosa en comparación con Gal2p no mutada y se desarrollaron hacia el perfil de crecimiento de RN1001 o incluso mostraron características de crecimiento similares o mejoradas sobre bajas concentraciones de xilosa. De forma interesante, cuando se alinean secuencias de aminoácidos de la familia de transportadores de hexosa de *S. cerevisiae*, algunas de las mutaciones de Gal2p en TOP15, por ejemplo N346D y M339S, deben ser encontradas en las secuencias no mutadas de Hxt2 (S324) y Hxt11 (D336 y S329), respectivamente. La comparación de todas las variantes de GAL2 mutantes probadas frente a GAL2 no mutada sobre el crecimiento (DO600 rel promedio) a las 96 horas se enumera en la Tabla 8. Se propone que todas las mutaciones con DO600 rel >0 tienen un efecto positivo sobre la afinidad de xilosa.

Tabla 9. Valores de DO600 rel promedio para los mutantes Gal2p cribados en el cribado de XTA.

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.			
Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
85	F	A	-2,50
		C	-1,81
		D	-32,03
		E	-37,55
		G	-51,06

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		H	-35,08
		K	-27,75
		N	-6,14
		P	-23,27
		Q	-0,27
		R	-18,30
		S	7,30
		T	-6,07
		V	2,40
89	T	A	-1,12
		C	19,39
		E	-13,89
		I	-20,86
		K	-13,89
		L	1,12
		M	-9,48
		N	-8,70
		Q	-4,57
		R	-10,12
		V	3,11
		W	-43,47
		Y	0,01
187	V	A	-10,62
		C	14,34
		D	-5,07
		E	-2,94
		F	-6,14
		G	14,77
		H	-2,79
		I	15,55
		L	10,08
		M	36,83
		Q	26,77

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		R	-11,36
		S	-28,01
		T	-10,54
		W	-17,20
		Y	11,95
191	A	C	5,10
		D	7,05
		E	0,58
		F	-1,81
		G	-4,01
		H	-12,93
		I	10,13
		K	7,11
		M	-4,82
		N	4,60
		P	1,90
		Q	-8,47
		R	3,34
		S	-19,15
		T	-2,00
		V	-9,91
		W	4,10
		Y	-15,24
214	Y	A	-3,04
		C	-12,04
		G	-6,92
		I	-6,92
		K	-4,15
		L	6,02
		M	-26,59
		N	-9,60
		P	5,35
		Q	-26,44

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		R	-29,77
		S	-37,90
		W	-21,91
215	Q	A	1,54
		C	5,92
Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		D	25,93
		E	20,81
		F	3,28
		I	-5,50
		L	8,24
		M	11,19
		R	-48,74
		S	16,66
		V	-21,07
		W	-39,22
		Y	-24,30
218	I	A	-15,52
		C	-13,03
		D	-19,50
		E	-15,31
		G	-9,12
		H	-9,12
		K	-10,19
		L	-15,45
		M	-24,27
		N	-23,20
		R	-13,39
		S	-13,60
		T	-15,95
		V	-4,00
		W	40,30
219	T	A	-6,71

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		C	-20,53
		D	-21,69
		E	3,47
		F	-17,01
		G	-35,80
		I	-47,23
		L	3,78
		M	-20,00
		N	-13,93
		P	-18,27
		Q	-14,25
		R	7,17
		S	-18,08
		V	11,19
		W	-15,13
222	I	A	-7,91
		C	-6,92
		D	-12,54
		E	-16,80
		G	28,78
		H	-13,50
		K	-48,17
		M	20,18
		P	11,01
		R	-0,62
		S	3,03
		T	10,25
		V	-12,55
		W	11,38
		Y	23,82
226	Y	A	23,92
		C	-6,78
		D	-12,89

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		E	5,10
		F	-28,04
		G	-4,64
		H	-11,26
		I	-12,46
		K	-10,55
		M	24,16
		N	-4,86
		P	20,39
		Q	0,33
		R	-9,19
		S	-5,78
		T	23,80
		W	-5,71
338	Q	A	4,10
		C	10,88
		D	7,99
		E	3,59
		F	0,45
		G	5,29
		H	11,63
		I	12,95
		L	0,58
		M	4,79
		N	14,12
		P	2,21
		R	15,03
		S	-17,02
		T	-26,76
		V	-11,33
		W	-6,92
		Y	-17,30
339	M	A	28,42

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		C	20,32
		D	-0,09
		E	18,97
		F	4,17
		G	-20,00
		H	-14,46
		I	-17,55
		K	-11,75
		L	21,03
		N	4,25
		P	-4,64
		Q	-3,65
		R	-7,91
		S	54,52
		T	10,79
		V	-11,90
		W	6,56
		Y	38,66
341	Q	D	-10,62
		E	-8,13
		H	2,89
		K	-21,66
		L	-22,79
		M	-11,30
		N	-13,31
		R	-10,76
		S	7,16
		T	-3,08
		V	18,89
		Y	9,37
342	Q	A	-15,66
		C	2,04
		D	-12,54

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		E	-9,23
		F	33,22
		G	42,01
		H	45,21
		I	34,38
		K	12,92
		L	28,91
		M	7,99
		N	45,31
		P	-7,15
		R	44,36
		S	22,25
		T	20,62
		V	-16,07
		W	32,62
		Y	-21,41
343	L	A	15,98
		C	7,16
		D	-12,82
		E	9,65
		F	-6,07
		G	-6,63
		H	-9,83
		I	19,04
		K	2,40
		M	-0,73
		N	0,97
		P	4,53
		Q	19,53
		R	-10,62
		S	10,72
		T	-6,46
		W	0,69

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		Y	29,99
346	N	A	26,36
		C	15,73
		D	69,10
		F	10,15
		G	24,01
		H	-4,93
		I	0,76
		K	-1,66
		P	-0,80
		Q	-5,28
		R	-7,84
		V	-44,97
		Y	-3,51
347	N	D	5,29
		E	-24,11
		G	7,59
		H	-4,57
		I	-3,08
		K	9,65
		L	14,52
		Q	6,55
		R	-1,93
		S	18,92
		T	2,61
		V	6,09
350	Y	D	-2,08
		E	39,52
		I	-28,19
		L	33,56
		M	7,09
		Q	6,95
		R	-40,48

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		S	7,93
		T	-6,33
		V	-15,81
		Y	-9,27
373	G	A	-51,50
		E	-50,72
		F	-47,17
		H	-37,99
		I	2,84
		K	15,40
		L	18,36
		M	14,21
		N	21,06
		Q	14,02
		R	32,18
		S	18,92
		T	-11,04
		V	-6,71
		W	-5,20
		Y	1,21
376	N	A	10,19
		C	24,67
		D	8,93
		E	10,19
		F	-13,02
		H	-13,78
		I	14,59
		K	47,76
		L	-9,63
		M	6,29
		P	29,04
		Q	35,51
		R	-23,42

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		S	44,42
		V	-42,40
		W	-15,74
		Y	-21,28
380	T	A	3,56
		C	8,37
		D	24,95
		E	14,21
		F	-17,33
		G	29,22
		I	20,81
		K	14,34
		L	23,45
		M	29,16
		N	-50,25
		P	-7,46
		Q	-15,32
		R	-0,55
		S	-6,02
		V	-6,21
		W	14,78
		Y	29,48
383	S	A	16,05
		C	3,32
		D	-2,94
		E	1,97
		F	-15,10
		G	-4,50
		I	2,40
		K	-47,86
		L	3,59
		M	-2,56
		N	-44,72

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		Q	14,40
		R	21,37
		T	-28,26
		V	24,58
		W	26,71
		Y	27,84
444	F	C	-6,49
		D	-2,08
		E	-16,16
		G	1,54
		H	-16,38
		I	-20,29
		K	-24,06
		L	-10,19
		M	-7,20
		N	-9,76
		P	-18,79
		Q	-27,18
		S	-14,45602
		W	-16,94
		Y	-18,08
446	F	D	19,61
		E	-36,17
		H	30,98
		I	0,83
		L	-40,55
		M	-2,58
		N	-10,90
		Q	-35,54
		R	-37,62
		S	-2,94
		T	-39,41
		V	-47,79

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
448	T	A	10,57
		C	0,08
		D	15,78
		E	19,55
		F	-6,65
		G	16,91
		H	25,64
		I	-0,18
		K	26,65
		L	22,31
		M	0,77
		P	12,58
		Q	14,08
		R	29,22
		S	11,19
		V	
		W	8,09
		Y	-2,01
449	T	A	4,67
		C	6,59
		D	-2,58
		E	-2,08
		F	16,48
		G	11,00
		H	16,26
		I	9,51
		K	-3,51
		L	11,29
		M	-15,59
		N	-7,13
		P	8,73
		Q	13,21
		R	-10,33

ES 2 663 480 T3

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		S	15,48
		V	14,41
		W	-5,78
		Y	-5,57
451	T	C	-33,23
		D	-23,20
		F	-4,75
		G	-16,94
		H	-41,76
		I	-40,26
		K	-8,91
		L	-23,73
		N	-6,07
		P	-6,14
		Q	-8,22
		R	-6,21
		S	2,90
		T	-11,42
		V	-5,89
		W	4,10
		Y	3,91
455	W	C	-14,75
		D	8,18
		E	4,22
		F	-2,31
		G	-10,67
		I	5,45
		K	8,12
		L	-5,96
		M	6,39
		N	-9,22
		P	0,83
		Q	0,95

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		R	-48,55
		S	-4,82
		T	-9,44
		V	-2,06
		Y	-19,81
478	N	A	-25,74
		C	-14,75
		D	-9,91
		F	6,86
		G	0,01
		H	-13,12
		I	8,81
		K	-24,30
		P	-20,47
		Q	14,40
		R	-27,44
		W	-13,40
		Y	6,77
479	W	C	-12,96
		D	15,20
		E	18,40
		F	24,87
		H	1,83
		I	48,83
		K	8,58
		L	-3,79
		M	7,87
		N	8,05
		P	-42,40
		Q	-33,73
		R	13,42
		S	57,22
		T	15,48

La construcción de GAL2 no mutada pDB1250 se estableció a 0. Los valores de DO600 rel son los promedios de 1-3 duplicados y son valores relativos en comparación con no mutada.

Pos	AA wt	AA mut	DO600 rel
		V	-12,54
		Y	12,07

Tabla 10. Posiciones de Gal2p y mutaciones identificadas en el cribado de XTA se ordenan por preferencia. PUNTUACIÓN PRINCIPAL es la puntuación de Xilrel para la sustitución de aminoácidos dentro que una posición que da la mejora más clara en comparación con Gal2p no mutada. Esto permite una clasificación de las mutaciones más influyentes y posiciones relevantes con respecto a la diana en Gal2p para aumentar la actividad de transporte de xilosa.

5

	XTA	Mutaciones					
	Posición	AA wt	Más preferida	Preferida	Menos preferida	Inactivo	PUNTUACIÓN PRINCIPAL
Más preferida	346	N	D	AG	CF	HIKPQRVY	69,10
	479	W	S	I	DEFHKMNRTY	CLPQV	57,22
	339	M	SY	ACEL	FNTW	DGHIKPQRV	54,52
	342	Q	GHNR	FILW	CKMST	ADEPVY	47,76
	376	N	KS	CPQ	ADEIM	FHLRVWY	47,76
Preferida	218	I	W			ACDEGHKLMNRSTV	40,30
	350	F	E	L	MQS	DIRTVY	39,52
	187	V	MQ	CGI	LY	ADEFHRSTW	36,83
	373	G	R	KLMNQS	IY	AEFHTVW	32,18
	446	F	H	D		EILMNQRSTV	30,98
Menos preferida	343	L	Y	AIQ	CEKSP	DFGHMNRWTW	29,99
	380	T	GMV	DIL	ACEKW	FNPQRSV	29,48
	448	T	HKR	EL	ADGPQSW	MCFIVY	29,22
	222	I	G	MY	PTW	ACDEHKRSV	28,78
	383	S	VWY	AQR	CEIL	DFGKMNT	27,84
	215	Q	DE	S	ACFL	IMRVWY	25,93
	226	Y	AMPT		E	CDFGHIKNQRSW	24,16
	89	T	C		LVY	AEIKMNQRW	19,39
	347	N	S	KL	DGQTV	EHIR	18,92
	449	T	FH	QSV	ACGILP	DEKMNRWY	16,48
	338	Q	NR	CDHI	AEFGLMP	STVWY	15,03
	478	N	Q	FIY		ACDGHKPRW	14,40
	191	A	I	DK	CENPRW	FGHMQSTVY	10,13
	341	Q	V	SY	H	DEKLMNRT	9,37

	XTA	Mutaciones					
	Posición	AA wt	Más preferida	Preferida	Menos preferida	Inactivo	PUNTUACIÓN PRINCIPAL
	455	W	DK	EIM		CFGLNPQRSTVY	8,18
	85	F	S	V		ACDEGHKNPQRT	7,30
	219	T	V	R	EL	ACDFGIMNPQSW	7,17
	214	Y	LP			ACGIKMNQRS	6,02
	451	A	WY	S		CDFGHIKLNQRTV	4,10
	444	F			G	CDEHIKLMNPQSWY	1,54

EJEMPLOS 6 a 15

Métodos

- 5 **Técnicas de biología molecular y productos químicos.** Se adquirieron enzimas de restricción y T4 ADN ligasa de Fermentas (Fisher Scientific, Landsmeer, Los Países Bajos). Los cebadores usados en los estudios (SEQ ID NO: 1-55) se indican en la Tabla 11. Se realizaron técnicas de biología molecular y genética de levadura estándar según libros de textos que incluyen Sambrook et al. (2001; Molecular cloning: a laboratory manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, EE.UU.) y Ausubel et al. (1995; Current Protocols in Molecular Biology).
- 10 **Amplificación por PCR y clonación.** Para las amplificaciones por PCR, se usó Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix con tampón HF (Finnzymes; Fisher Scientific, Landsmeer, Los Países Bajos). Los cebadores usados para la clonación y secuenciación se indican en la Tabla 11 (SEQ ID NO: 37-55). Se clonaron fragmentos de PCR de *HXT2*, *HXT3-6* y *HXT11* en el vector de expresión en levadura pRS313-P7T7 (SEQ ID NO 56), basándose en el vector lanzadera pRS313 (Sikorski & Hieter, 1989, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient
- 15 manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 122, pp. 19-27). La construcción pRS313-P7T7 lleva el promotor *HXT7* truncado (Hauf et al, 2000, Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb Technol, 26:688-698) y el terminador *HXT7*. Entre el promotor y el
- 20 terminador, existe un sitio de clonación múltiple (MCS). Los fragmentos de PCR resultantes se digirieron por combinaciones de enzimas de restricción (como se indica adicionalmente en los ejemplos más adelante) y se clonaron por técnicas de biología molecular estándar en el vector de expresión en levadura. *HXT11* también se clonó en pRS313-P7T7-GFP (produciendo SEQ ID NO: 57) para estudios de localización de la proteína Hxt11 marcada con GFP usando microscopía de fluorescencia (Ejemplo 5). pDB1250 contuvo el ORF de *GAL2* (SEQ ID NO: 60) entre el promotor *HXT7* truncado y el terminador *ADH1* (para referencia de secuencia pDB1250 véase SEQ ID NO: 58. Los plásmidos se amplificaron y se mantuvieron en células DH5α siguiendo las instrucciones del
- 25 fabricante. Los plásmidos se aislaron de minicultivos de *E. coli* usando el kit GeneElute plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Los Países Bajos). Secuencias de genes / proteínas y construcciones usadas y generadas durante estos estudios se enumeran en la Tabla 12.

Tabla 11: Oligonucleótidos usados en los ejemplos

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Fin	SEQ ID NO
ActinF	GGATTCTGAGGTTGCTGCTTTGG	PCR en tiempo real	62
ActinR	GAGCTTCATCACCAACGTAGGAG	PCR en tiempo real	63
HXT1F	TGTTCTCTGTACACCGTTGACCG	PCR en tiempo real	64
HXT1R	AGATCATACAGTTACCAGCACCC	PCR en tiempo real	65
HXT2F	CTTCGCATCCACTTTCGTG	PCR en tiempo real	66
HXT2R	AATCATGACGTTACCGGCAGCC	PCR en tiempo real	67
HXT3F	GAAGCTAGAGCTGCTGGTTCAGC	PCR en tiempo real	68
HXT3R	ACAACGACATAAGGAATTGGAGCC	PCR en tiempo real	69

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Fin	SEQ ID NO
HXT4F	ATGGAGAGTTCCATTAGGTCTAGG	PCR en tiempo real	70
HXT4R	ATAACAGCTGGATCGTCTGCGC	PCR en tiempo real	71
HXT5F	TTGCTATGTCGTCTATGCCTCTG	PCR en tiempo real	72
HXT5R	AGATAAGGACATAGGCAACGGG	PCR en tiempo real	73
HXT7F	GGGTGCTGCATCCATGACTGC	PCR en tiempo real	74
HXT7R	ACAACGACATAAGGAATTGGAGCC	PCR en tiempo real	75
HXT8F	GTACTACTATCTTCAAATCTGTGCG	PCR en tiempo real	76
HXT8R	CTTGTGACGCCAACGGAGGCG	PCR en tiempo real	77
HXT9F	CCATTGAGAGGTTTGGACGCCG	PCR en tiempo real	78
HXT9R	ACACAATCATACAGTTACCGGCG	PCR en tiempo real	79
HXT10F	GGAATGCAAGACTCTTTCGAGAC	PCR en tiempo real	80
HXT10R	CTAGTGACGCCAACGGTGGCG	PCR en tiempo real	81
HXT11F	GCCACTCAATGGAGAGTCGGC	PCR en tiempo real	82
HXT11R	CAACTAGCAAGGCTGGATCGTC	PCR en tiempo real	83
HXT12F	CACCATCTTCAAATCTGTGCGTC	PCR en tiempo real	84
HXT12R	CAATCATACAGTTACCGGCACCC	PCR en tiempo real	85
HXT13F	CCCTCATGGCCAGGACGGTC	PCR en tiempo real	86
HXT13R	TTGCCATAACCAGTTGCATGCAG	PCR en tiempo real	87
HXT14F	GCCTTAGTAGTGTACTGCATCGGT	PCR en tiempo real	88
HXT14R	TGATACGTAGATACCATGGAGCC	PCR en tiempo real	89
HXT15F	GAGGCCTGTGTCTCCATCGCC	PCR en tiempo real	90
HXT15R	CACAAGAATACCTGTGATCAAACG	PCR en tiempo real	91
HXT16F	CAAGGAAGTATAGTAATACTGCGC	PCR en tiempo real	92
HXT16R	TTGGCGATGGAGACACAGGCC	PCR en tiempo real	93
HXT17F	TAACACTGCACAATGGAGAGTCC	PCR en tiempo real	94
HXT17R	TGAGTACCCATGGATCCTCTGG	PCR en tiempo real	95
GAL2F	TCAATGGAGAGTTCCATTAGGGC	PCR en tiempo real	96
GAL2R	CTGGACGGCAGGATCCTCTGG	PCR en tiempo real	97
KOP11*	AATAATCATTGCACAATTTAGTTCTAAACGCTTTTGTTA T TACTCAATATCCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAG GAGTC	KO HXT11	98
KOT11*	TCGTCAATTTTTTTTTTGTCTTTTACCAATTTACCGA AAACTAGAAGAGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAA GCAAAAAGAAAAAAGGAAAGCGCGC	KO HXT11	99

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Fin	SEQ ID NO
iHXT11F	GGCCTCTAGATCAGCTGGAAAAGAACCTCTTGTAAT TG	HXT11 inversa	100
iHXT11R	GCTAGGATCCATGTCAGGTGTTAATAATACATCCGCA AATG	HXT11 inversa	101
HXT11F	GGCCTCTAGAATGTCAGGTGTTAATAATACATCCGC	clonación	102
HXT12F	GGCCTCTAGAATGGGTTTGATTGTCTCAATATTCAAC	clonación	103
HXT11/1 2R	CGATGGATCCTCAGCTGGAAAAGAACCTCTTGTAAT TG	clonación	104
HXT1 XbaI	GCATTCTAGAATGAATTCAACTCCCGATCTAATATC	clonación	105
R HXT1 Cfr9i	TGCATCCCGGGTTATTTCTGCTAAACAACTCTTGTA	clonación	106
F HXT2 XbaI	GTCCTCTAGAATGTCTGAATTGCTACTAGCCG	clonación	107
R HXT2 Cfr9i	CATCGCCCGGGTTATTCCTCGGAAACTCTTTTTCTTT TG	clonación	108
F HXT3 XbaI	GCATTCTAGAATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCTC	clonación	109
R HXT6 Cfr91	CATCGCCCGGGTTATTTGGTGCTGAACATTCTCTTG	clonación	110
F HXT4 XbaI	GTCCTCTAGAATGTCTGAAGAAGCTGCCTATCAAG	clonación	111
R HXT4RN Cfr91	TATCGCCCGGGTTAATTAAGTACCTACTTTTTTCCGA	clonación	112
F HXT5 XbaI	GTCCTCTAGAATGTCGGAAGTTGAAAACGCTCATC	clonación	113
R HXT5 Cfr91	GCATCCCGGGTTATTTTCTTTAGTGAACATCCTTTTA TA	clonación	114
F HXT7 XbaI	GTCCTCTAGAATGTCACAAGACGCTGCTATTGCA	clonación	115
R HXT7 Cfr91	CATCGCCCGGGTTATTTGGTGCTGAACATTCTCTTG	clonación	116
*En <i>cursiva</i> la secuencia flanqueante de HXT11, y <u>subrayada</u> la secuencia de HIS3			

Extracción de ARN y síntesis de ADNc. Se aisló ARN total de células de levadura en fase exponencial por un procedimiento de rotura con perlas de vidrio / extracción con Trizol. Se mezclaron sedimentos de levadura de 2 ml de cultivo celular con 0,2 ml de perlas de vidrio (diámetro, 0,45 mm) y 0,9 ml de Trizol con 125 µl de cloroformo, y se rompieron en un Fastprep FP120 (Bio-101, Thermo Savant, California, EE.UU.) por un estallido de 45 segundos a la velocidad 6. Se usó 1 µg de ARN total para sintetizar ADNc usando el kit iScript (Bio-Rad, Veenendaal, Los Países Bajos).

PCR en tiempo real. Se realizaron las PCR en tiempo real específicas de *HXT1-HXT17* y *GAL2*, respectivamente, usando el kit SensiMix SYBR & Fluorescein (GC Biotech, Alphen aan den Rijn, Los Países Bajos) y el instrumento de PCR en tiempo real MyiQ iCYCLER (BIO-Rad, Veenendaal, Los Países Bajos). Cada reacción de 25 µl contuvo 12,5 µl de SYBR green Master Mix, 4 µl de ADNc, 0,5 µl de cada cebador (10 nM) y 7,5 µl de agua desionizada estéril. Las condiciones de PCR fueron 10 min a 95 °C seguido de 39 ciclos de amplificación (15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C). Los cebadores mostrados en la Tabla 11 se utilizaron para amplificar los fragmentos de ADNc por amplificación por PCR (SEQ ID NO 1-36).

PCR propensa a error. Se realizaron experimentos de PCR propensa a error siguiendo las indicaciones proporcionadas por ADN Taq polimerasa (Thermo Fischer) usando 10 ng de molde en 100 µl de mezcla de PCR que contenía MgCl₂ 5,5 mM y MnCl₂ 0,15 mM.

Mantenimiento, cultivo e ingeniería evolutiva de cepas. Las cepas generadas en estos estudios se enumeran en la Tabla 13. Para el almacenamiento de las cepas usadas en este trabajo (Tabla 2), se realizaron cultivos en matraces oscilantes en medio rico (YP), que consistía en 10 g l⁻¹ de extracto de levadura (Oxoid) y 20 g l⁻¹ de peptona (BD Difco), complementado con o bien 2 % de glucosa (YPD), 2 % maltosa (YPM; en caso de derivados de RN1053), o 3 % de xilosa (YPX; en caso de derivados de YD01227). Los cultivos se mantuvieron a 30 °C en un agitador orbital hasta que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria. Después de añadir glicerol al 30 % (v/v), se almacenaron las muestras de los cultivos en matraces agitados en alícuotas de 2 ml a -80 °C.

Para las caracterizaciones de cepas e ingeniería evolutiva, se realizaron cultivos usando medio mineral según Verduyn usando urea como fuente de nitrógeno (Verduyn-urea Lutik et al, 2001, J Bacteriol, 182:501-517) a pH 4,5 complementado con el azúcar deseado (mezclas). En cultivos de las cepas modelo RN1053 o YD01227, se complementó Verduyn-urea con 0,2 g l⁻¹ de histidina (Sigma-Aldrich; Verduyn-urea-his) para complementar para la auxotrofia de histidina.

Se realizaron cultivos de cepas para la caracterización de los perfiles de crecimiento y de consumo de azúcares en matraces con agitación, un lector de Bioscreen C que usa placas de pocillos en panal de abeja (Growth Curves Ltd, representado por Thermo Fisher Scientific BV, Breda, Los Países Bajos). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 30 °C. Específicamente con el fin de ingeniería evolutiva, se cultivaron cultivos de quimiostato en un biorreactor de tanque con agitación de 3 l (Applikon, Schiedam, Los Países Bajos) lleno de 500 ml de Verduyn-urea-his complementado con las fuentes de carbono requeridas a una temperatura de 30 °C. El punto de consigna del oxígeno disuelto inicial (DO) fue del 5 %, la agitación se realizó a 400 rpm y la DO600 inicial fue 0,2.

Tabla 12: Plásmidos y secuencias de genes / proteínas

<u>Plásmido/gen/proteína</u>	<u>Tipo de secuencia</u>	<u>SEQ ID NO o referencia</u>	<u>Ejemplo</u>
pRS313-P7T7 (control de vector vacío)	ADN artificial	117	7, 8, 9, 10, 11, 13, 15
pRS313-P7TA-GAL2 (pDB1250)	ADN artificial		12
pRS313-P7T7-iHXT11	ADN artificial		7
pRS313-P7T7-HXT11	ADN artificial		8, 9, 10
pRS313-P7T7-HXT12	ADN artificial		8
pRS313-P7T7-HXT2	ADN artificial		9, 10
pRS313-P7T7-HXT11-GFP	ADN artificial	57	10
pRS313-P7T7-mHXT11 (N366D)	ADN artificial		11
pRS313-P7T7-HXT36	ADN artificial		15
pRS313-P7T7-mHXT36(N367I)	ADN artificial		15
<i>HXT11</i>	ADN, <i>S. cerevisiae</i>	58	7, 8, 9, 10, 11, 12
<i>HXT2</i>	ADN, <i>S. cerevisiae</i>	59	9, 10
<i>GAL2</i>	ADN, <i>S. cerevisiae</i>	60	12
<i>HXT3-6</i>	ADN, <i>S. cerevisiae</i>	61	15
Hxt11p	Proteína, <i>S. cerevisiae</i>	62	7, 8, 9, 10, 11, 12
Hxt2p	Proteína, <i>S. cerevisiae</i>	63	9
Gal2p	Proteína, <i>S. cerevisiae</i>	64	10
Hxt36p	Proteína, <i>S. cerevisiae</i>	65	15

Tabla 13: Cepas usadas o preparadas en el presente documento

Cepa	Genotipo	Ejemplo
RN1001	<i>Mat a, ura3-52, leu2-112, gre3::loxP, loxP-Ptpi:TAL1, loxP-Ptpi::RKI1, loxP-Ptpi-TKL1, loxP-Ptpi-RPE1, delta::Padh1XKS1Tcyc1-LEU2, delta::URA3-Ptpi-xylA-Tcyc1</i>	10
RN1014	RN1001 + ingeniería <i>in vivo</i> sobre xilosa y ácido acético	Referencia
RN1041	RN1001 <i>his3::loxP</i>	WO2013081456
RN1041-vacío	RN1041, pRS313-P7T7 (control de vector vacío)	8, 11
RN1053	RN1041 <i>hxt2::loxP-kanMX-loxP, hxt367::loxP-hphMX-loxP, hxt145::loxP-natMX-loxP, gal2::loxP-zeoMX-loxP</i>	6,7
RN1053-X2	Colonia individual RN1053 seleccionada sobre YPX después de la ingeniería evolutiva en quimiostato sobre 2 % de xilosa	6,7
RN1053-X2- <i>hxt11Δ</i>	RN1053-X2, <i>hxt11::HIS3</i>	7
RN1053-vacío	RN1053, pRS313-P7T7 (control de vector vacío)	8, 9, 10, 15
RN1053-HXT2	RN1053, pRS313-P7T7-HXT2	9
RN1053-HXT3-6	RN1053, pRS13-P7T7-HXT3-6	15
RN1053-mHXT3-6(N3671)	RN1053, pRS13-P7T7-mHXT3-6(N3671)	15
RN1053-HXT11	RN1053, pRS13-P7T7-HXT11	8, 9, 10, 11, 13
RN1053-mHXT11-N366D	RN1053, pRS313-P7T7-mHXT11(N366D)	13
RN1053-iHXT11	RN1053-pRS313-P7T7-iHXT11	7
RN1053-HXT11-GFP	RN1053, pRS313-P7T7-HXT11-GFP	10
RN1053-HXT12	RN1053, pRS13-P7T7-HXT12	8
YD01227 (ori)	RN1014 <i>glk1::lox72; hxx1::loxP; hxx2::lox72; gal1::loxP; his3::loxPnatMXloxP</i>	14
YD01227-evoA, - B, y -C	YD01227, tres colonias individuales seleccionadas en placas con 1 % de xilosa + 10 % de glucosa después de series de ingeniería evolutiva en quimiostato (véase el Ejemplo 14)	14
YD01227-vacío	YD01227, pRS313-P7T7 (control de vector vacío)	13
YD01227-HXT2	YD01227, pDB1162 (pRS313-P7T7-HXT2)	12
YD01227-GAL2	YD01227, pDB1250 (pRS313-P7TA-GAL2)	12
YD01227-HXT11	YD01227, pDB1152 (pRS313-P7T7-HXT11)	12, 13
YD01227-mHXT11(N366D)	YD01227, pRS313-P7T7-mHXT11(N366D)	13

Métodos analíticos. Se monitorizó el crecimiento celular por densidad óptica (DO) a 600 nm usando espectrofotómetro de UV-visible (Novaspec PLUS). Se midieron las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol en sobrenadante de cultivos (separado del sedimento de células después de la centrifugación a 4000 rpm durante 5 min) por cromatografía líquida de alta resolución (Shimadzu, Kioto, Japón) usando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) y un detector del índice de refracción (Shimadzu, Kioto, Japón). La temperatura de la columna y el detector se mantuvo a 65 °C. La fase móvil fue H₂SO₄ 0,005 N a un caudal de 0,55 ml/min.

Medición de la captación de azúcar. Se midió la captación de xilosa radiomarcada del siguiente modo: las células se cultivaron durante 24 horas en matraces con agitación en Verduyn-urea complementado con 2 % de xilosa y 0,05 % de maltosa y se recogieron por centrifugación (3.000 rpm, 3 min, 20 °C), se lavaron y se resuspendieron en

Verduyn-urea. Se añadieron reservas de $[^{14}\text{C}]$ xilosa o $[^{14}\text{C}]$ glucosa (CAMPRO scientific, Veenendaal, Los Países Bajos) a la suspensión de células. La reacción se detuvo, para xilosa después de 1 minuto y para glucosa después de 15 segundos, mediante la adición de 5 ml de cloruro de litio 0,1 M, y la suspensión de células se filtró (filtro de membrana de HV de 0,45 μm , Millipore, Francia). Los filtros se lavaron con otros 5 ml de cloruro de litio y se

- 5 contaron con contador de centelleo líquido en un Emulsifier Scintillator Plus (Perkin-Elmer, EE.UU.). Se hicieron experimentos de captación para YD01227-ori y YD01227-evo con xilosa 0,5, 2, 6, 20, 40 mM o glucosa 0,1, 0,4, 1,5, 6, 20, 80 mM. Se realizaron estudios de competición de glucosa para RN1053-HXT3-6 y RN1053-mHXT3-6(N3671), RN1053-HXT11 y RN1053-mHXT11 (N366D) con la reserva de $[^{14}\text{C}]$ xilosa y con glucosa sin marcar. Las concentraciones de xilosa y de glucosa finales fueron 50 mM y 50-500 mM, respectivamente.
- 10 **Microscopía de fluorescencia.** Se transformó el plásmido pRS313-P7T7-HXT11-GFP (SEQ ID NO 57) en la cepa RN1053 y RN1041. Se inocularon colonias frescas en medio mínimo con xilosa o glucosa. Se sometió un cultivo celular líquido fresco tomado en la fase de crecimiento exponencial (a una densidad óptica de 10 a 600 nm) a
- 15 microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse-Ti equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 100 $\times$, un filtro para GFP y una cámara refrigerada Nikon DS-5Mc. Los presentes inventores examinaron rutinariamente al menos 100 células por muestra, y cada experimento se duplicó al menos tres veces.

Transformación automatizada y recogida de colonias. Para la generación de transformación de una biblioteca de mutagénesis de saturación en YD01227, se realizaron cultivos en matraces con agitación en o bien YPM para RN1053, o YPX para YD01227 (véase más adelante). Las células de levadura se sedimentaron y, posteriormente, se usaron en un protocolo de transformación automatizado basado en Gietz, R.D. y Woods, R.A. (Gietz, R.D. y

20 Woods, R.A. 2006, Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol. Biol.*, 313:107-120). Las mezclas de transformación se sembraron en medio de selección que consistía en base nitrogenada de levadura (Sigma-Aldrich; 6,7 g l^{-1}), agar (BD Biosciences; 15 g l^{-1}), complementado con o bien 2 % de maltosa (transformaciones de RN1053) o 3 % de xilosa (transformaciones de YD01227). Las placas de transformación se incubaron a 30 °C, y después de la formación de colonias, las colonias volvieron a sembrarse usando un proceso

25 automático que transfiere las colonias a placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP) que contienen los medios de selección anteriormente citados. Se incubaron MTP con transformantes a 30 °C hasta que se observó crecimiento claro.

Análisis de RMN. Para la cuantificación de glucosa, xilosa, glicerol, ácido acético y etanol en la muestra, se transfieren 100 μl de muestra con exactitud a un vial adecuado. Posteriormente, se añaden 100 μl de disolución de patrón interno, que contiene ácido maleico (20 g/l), EDTA (40 g/l) y cantidades traza de DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico) en D_2O , y 450 μl de D_2O .

Los espectros de RMN ^1H 1D se registran en un Bruker Avance III 700 MHz, equipado con una crio-sonda, usando un programa de pulsos con supresión de agua (potencia correspondiente a 3 Hz) a una temperatura de 27 °C.

Las concentraciones de analito se calculan basándose en las siguientes señales (δ con respecto a DSS):

- 35
- Pico de α -glucosa a 5,22 ppm (d, 0,38 H, $J = 4$ Hz),
 - Pico de α -xilosa a 5,18 ppm (d, 0,37 H, $J = 4$ Hz),
 - Pico de glicerol a 3,55 ppm (dd, 2 H, $J_{1,2} = 6$ Hz y $J_{1a,1b} = 12$ Hz)
 - Pico de ácido acético a 1,91 ppm (s, 3 H)
 - Pico de etanol a 1,17 ppm (t, 3 H, $J = 7$ Hz)
- 40
- El usuario de señal para el patrón:
 - Pico de ácido maleico a 6,05 ppm (s, 2H)

EJEMPLO 6

ELEVADA EXPRESIÓN DE HXT11 DE S. CEREVISIAE EN LA CEPA NEGATIVA DE TRANSPORTE DE XILOSA DESARROLLADA CON CAPACIDAD RESTAURADA PARA CRECER SOBRE XILOSA

45 **Cultivo en quimiostato de RN1053.** Se facilita la captación de xilosa en *Saccharomyces cerevisiae* por un subgrupo distinto de transportadores de hexosa (Hamacher et al, 2002, Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*, 148: 2783-2788). Los presentes inventores han construido una delección mutante con capacidades fermentadoras de xilosa (RN1053) que carecen de los principales transportadores de hexosa *HXT1-HXT7* y *GAL2*. Como resultado de las delecciones,

50 RN1053 no es capaz de utilizar xilosa (como se describe en el Ejemplo 1). *Saccharomyces cerevisiae* posee más genes HXT que los ocho principales (*HXT8-17*) de los cuales no se sabe mucho más que su expresión es baja o despreciable (Sedlak & Ho, 2004, Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose

during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*, 21, pp. 671-684) o que han sido conectados a funciones fisiológicas distintas del transporte de azúcar (Nourani et al 1997 Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol*, 17: 5453-5460). Por tanto, los presentes inventores se refieren a ellos como los genes *HXT* crípticos. Se hizo un intento por seleccionar posibles mutaciones espontáneas en loci *HXT* crípticos que producen la expresión mejorada o afinidad por xilosa posiblemente mejorada. Con el fin de hacer esto, se cultivó la cepa RN1053 en un cultivo en quimiostato anaerobio de xilosa limitada a una tasa de dilución de $0,05\text{ h}^{-1}$. Las cepas desarrolladas por el cultivo en quimiostato, RN1053-X2, se aislaron sobre placa de 2 % de xilosa. Se seleccionó una única colonia para cultivo en matraz con agitación aerobio en Verduyn-urea-his complementado con 2 % de xilosa durante 96 h para comparación con la cepa de RN1053 original. Las curvas de crecimiento de la cepa RN1053-X2 y RN1053 se representaron en la Fig. 12A. La cepa RN1053-X2 desarrollada fue capaz de crecer sobre 2 % de xilosa, mientras que la cepa RN1053 original no creció sobre el medio de xilosa. Un motivo podría ser que uno o más de los genes *HXT* crípticos (*HXT8-HXT17*) se reguló por incremento sobre medio de xilosa durante el cultivo en quimiostato, facilitando la captación de xilosa.

Perfil de expresión generado por RN1053-X2. Se compararon los patrones de expresión de *HXT8-HXT17* en la cepa RN1053-X2 generada y la cepa RN1053 original durante los cultivos discontinuos sobre 2 % de medio de xilosa. El nivel de transcripción de *HXT11* y *HXT12* aumentó espectacularmente hasta 8 veces en la cepa RN1053-X2 desarrollada desde el comienzo de la fase exponencial (Fig. 12B) y alcanzó un nivel máximo en el día 3, en comparación con la cepa RN1053 original. El quimiostato fue eficaz para la evolución de mutantes para potenciar el consumo de xilosa expresando genes transportadores *HXT11* y/o *HXT12* en la cepa RN1053. Sin embargo, el nivel de expresión de otros genes *HXT* (es decir, *HXT8-HXT10* y *HXT13-HXT17*) fue reprimido sobre medio de xilosa, en comparación con no mutada de RN1053.

La primera etapa limitante del metabolismo de la xilosa es su transporte a través de la membrana plasmática (Kahar P, Taku K, Tanaka S, 2011. Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 111:557-63). Se informó que la expresión de los genes transportadores *HXT* de *S. cerevisiae* estuvo regulada en respuesta a diferentes niveles de glucosa extracelular (Ozcan & Johnston, 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:554-569). Posiblemente, las mutaciones en los promotores o genes reguladores son la base de la expresión potenciada de los genes *HXT* crípticos en la cepa RN1053-X2 desarrollada en el cultivo en quimiostato sobre glucosa.

EJEMPLO 7

INACTIVACIÓN/SILENCIAMIENTO DE *HXT11* EN RN1053 GENERADA SUPRIME LA CAPACIDAD RECIENTEMENTE ADQUIRIDA PARA CRECER SOBRE XILOSA

Inactivación y silenciamiento de *HXT11* en la cepa RN1053-X2. Para la delección de la construcción de *HXT11*, se amplificó el casete de expresión P_{HIS3} -*HIS3*- T_{HIS3} del molde de plásmido pRS313-P7T7 (SEQ ID NO 117) usando los oligonucleótidos KOP11 (SEQ ID NO 98) y KOT11 (SEQ ID NO 99) que consisten en secuencias flanqueantes de *HXT11* para la integración en el locus *HXT11* y la secuencia de *HIS3* para amplificar el casete de expresión.

Con el fin de determinar si *Hxt11p* era responsable del crecimiento espontáneo sobre xilosa, los presentes inventores deleccionaron *HXT11* en la cepa RN1053-X2 desarrollada por sucesión de delección génica de una etapa complementando para el marcador *HIS3* tras la delección de *HXT11*. Niveles de ARNm de *HXT11* disminuyeron considerablemente después de que se introdujera la construcción de inactivación (Figura 13a). Cuando *HXT11* se alteró en la cepa RN1053-X2, la cepa perdió su capacidad recientemente adquirida para crecer sobre medio de xilosa (Figura 13b). Además, el nivel de expresión de *HXT11* de cepas inactivadas disminuyó al 60 %. Lo más probablemente, todavía se midieron niveles de *HXT11* ya que también expresaron transcritos de *HXT12* en la cepa RN1053-X2 aproximadamente el 98 % homólogos a *HXT11* (Figura 13a).

La técnica de ARN antisentido es muy útil para la represión de la traducción de una proteína diana secuestrando ARNm diana en microorganismos. Puede promoverse la represión de la traducción por secuencias antisentido que se hibridan con ARN mensajero. El mecanismo antisentido implica la interferencia de ribosomas, en la que el ribosoma no puede unirse a los nucleótidos del ARNm (Park et al 2001. Antisense-mediated inhibition of arginase [CAR1] gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 92:481-484). Este método es más conveniente para inhibir la expresión génica que el método de alteración de genes. Para la expresión de *HXT11* inversa (*iHXT11*), se amplificó *iHXT11* usando cebadores *iHXT11F* (SEQ ID NO: 100) y *iHXT11R* (SEQ ID NO: 101) y se clonó como el fragmento *Bam*HI-*Xba*I inversamente entre el promotor *HXT7* truncado y el terminador *HXT7* en el vector pRS313-P7T7 (Figura 13c; SEQ ID NO: 117). La construcción se introdujo en RN1053-X2 para expresar ARN antisentido de *HXT11* que evita la traducción de ARNm de *HXT11* en proteína. *iHXT11* se expresó en exceso en la cepa RN1053-X2, y la cepa perdió su capacidad para crecer sobre medio de xilosa (Figura 13d).

Estos experimentos de inactivación/silenciamiento indican claramente que la cepa RN1053-X2 desarrollada empezó a consumir xilosa debido al aumento en la expresión de *HXT11* y la probable expresión funcional de *Hxt11p* sobre la membrana de levaduras.

EJEMPLO 8**LA EXPRESIÓN EN EXCESO DE *HXT11* EN RN1053 RESTAURA EL CRECIMIENTO SOBRE XILOSA**

Expresión en exceso de *HXT11* y *HXT12* en RN1053. Para determinar si las cepas que expresan *HXT11* o *HXT12* son capaces de crecer sobre xilosa, se expresaron individualmente ambos genes *HXT* en la cepa RN1053 original que es incapaz de crecer sobre xilosa debido a la delección de los ocho transportadores de hexosa principales (*HXT1-HXT7* y *GAL2*). Para estos experimentos se usaron RN1041-vacío, RN1053-vacío, RN1053-*HXT11* y RN1053-*HXT12* (véase la Tabla 13). RN1053-*HXT11* y RN1053-*HXT12* se construyeron del siguiente modo: los marcos de lectura abiertos para los genes *HXT11* y *HXT12* fueron amplificados por PCR a partir de ADNc de RN1053 no mutada usando los cebadores *HXT11F* (SEQ ID NO: 102), *HXT12F* (SEQ ID NO: 103) y *HXT11/12R* (SEQ ID NO: 104); se secuenciaron fragmentos de PCR y se encontró que eran el 100 % homólogos a las secuencias de genes CEN.PK113-7D respectivas (Genome Database de *Saccharomyces*, www.yeastgenome.org; secuencia de *HXT11* SEQ ID NO: 119); los fragmentos de PCR se cortaron usando enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* y se clonaron en vector de expresión en levadura pRS313-P7T7 (SEQ ID NO: 117; Figura 13C; Tabla 12). La construcción de expresión de *HXT11* y *HXT12* de los transportadores se transformaron en RN1053 usando una técnica genética de levadura estándar según el método de Gietz (Gietz Y Woods 2006, Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. Methods Mol. Biol 313 pp. 107-120). Los transformantes aislados de colonias individuales produjeron las cepas RN1053-*HXT11* y RN1053-*HXT12*. Ambas cepas se inocularon en medio de maltosa, seguido de cultivos en matraz oscilante sobre medios líquidos que contenían 2 % de xilosa y/o 2 % de glucosa. Solo RN1053-*HXT11* y RN1041 presentaron un claro crecimiento en el plazo de 48 horas, mientras que RN1053-vacío y RN1053-*HXT12* presentaron difícilmente cualquier crecimiento en este periodo (Figura 14a). El crecimiento de RN1053-*HXT11* empezó antes y presentó crecimiento más rápido que el de la cepa de referencia RN1041-vacío (con ruido de fondo de *HXT* no mutada) en medio de xilosa (Figura 14b). Sin embargo, la introducción de la secuencia de *HXT12* en RN1053 no permitió el crecimiento sobre medio de xilosa. En la cepa de referencia de la base de datos del genoma de *Saccharomyces* S288C, *HXT12* se considera un pseudogén debido a una mutación de desplazamiento del marco (www.yeastgenome.org; ORF YIL170W y YIL171W).

Este experimento mostró claramente que el crecimiento espontáneo sobre xilosa de RN1053-X2 se produjo por expresión más alta de *HXT11* y que *HXT11* es un transportador de xilosa eficiente, si se expresa.

EJEMPLO 9***Hxt11p* FACILITA EL TRANSPORTE DE XILOSA CON NIVEL INTRÍNSECO MÁS ALTO DE ESPECIFICIDAD POR XILOSA QUE *Hxt2p***

Captación de xilosa por *Hxt11p*. Para determinar si *HXT11* es capaz de transportar xilosa en ausencia y presencia de glucosa, se realizaron estudios de captación usando ¹⁴C-xilosa radiomarcada. Para estos experimentos se usaron las cepas RN1053-vacío, RN1053-*HXT11* y RN1053-*HXT2* (véase la Tabla 13). *HXT2* es conocida por sus capacidades de transporte de xilosa (Saloheimo et al, 2007, Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. Appl Microbiol Biotechnol. 74:1041-1052; Sedlak y Ho, 2004, Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. Yeast, 21:671-684). La construcción de RN1053-*HXT11* fue como se ha descrito en el ejemplo previo. Se construyó RN1053-*HXT2* del siguiente modo: se amplificó por PCR *HXT2* (SEQ ID NO: 120) a partir del genoma de RN1001 (Tabla 12) usando los cebadores F *HXT2* *XbaI* (SEQ ID NO: 107) y R *HXT2* *Cfr9I* (SEQ ID NO: 108). Se verificó la secuencia del fragmento de PCR resultante y se clonó en pRS313-P7-T7 (SEQ ID NO: 117) como el fragmento *XbaI*-*Cfr9I*. RN1053 se transformó con la construcción resultante pRS313-P7T7-*HXT2* (; véase la Tabla 12) generando un transformante derivado de una única colonia llamada la cepa RN1053-*HXT2* (Tabla 13). Para determinar si *Hxt11p* aumentó la captación de xilosa en la cepa RN1053, se midió la captación de xilosa usando ¹⁴C en las células que expresan los transportadores. En presencia de glucosa, las cepas que expresan *HXT11* acumularon hasta el 50 % más de xilosa en comparación con las cepas que expresan *HXT2* en presencia de glucosa (Figura 15). Además, la captación de xilosa de RN1053-*HXT11* aumentó hasta 4,5 veces, en comparación con RN1053-*HXT2* (Figura 15). Estos experimentos muestran que *Hxt11p* es capaz de transportar xilosa a través de la membrana plasmática de levadura. Aún más, *Hxt11p* emplea una especificidad intrínseca más alta hacia xilosa que podría no ser fácilmente competida por la glucosa en comparación con los transportadores de xilosa previamente identificados del genoma de levadura tales como *Hxt2p*.

EJEMPLO 10***Hxt11p* SE EXPRESA FUNCIONALMENTE EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LEVADURA**

Expresión funcional de *HXT11* en RN1053. La detección de *Hxt11p* por análisis de inmunotransferencia no demostrará completamente la expresión funcional de la proteína. Para la expresión funcional de una proteína transportadora de hexosa, debe residir en la membrana plasmática. Con el fin de monitorizar la expresión y el direccionamiento de *Hxt11p*, se manipuló una proteína *Hxt11p*-GFP quimérica y se examinó por fluorometría y microscopía de fluorescencia. Para estos estudios, se usaron RN1053-*HXT11*-GFP, RN1041-*HXT11*-GFP, RN1053-

HXT11 y RN1053-vacío (Tabla 13). Para la construcción de cepas que expresan HXT11-GFP, se transformaron RN1053 y RN1041 con el vector de expresión que lleva esta proteína quimérica Hxt11-GFP (pRS313-P7T7-HXT11-GFP; SEQ ID NO: 118; Tabla 12). La proteína de fusión Hxt11p+GFP es un transportador de hexosa funcional: restauró el crecimiento sobre 2 % de xilosa a la cepa RN1053 (Figura 16a). Además, se localizó la fluorescencia de Hxt11p+GFP de RN1053-HXT11-GFP y RN1041-HXT11-GFP en la membrana plasmática sobre medio de xilosa o glucosa (Figura 16b). Estos experimentos muestran que Hxt11p-GFP es funcional como transportador de xilosa y que Hxt11p se expresa funcionalmente en la membrana plasmática.

EJEMPLO 11

LA EXPRESIÓN DE HXT11 EN RN1053 FACILITA LA CO-FERMENTACIÓN MÁS RÁPIDA DE GLUCOSA Y XILOSA EN CONCENTRACIONES INDUSTRIALMENTE RELEVANTES

Perfil de fermentación de RN1053-HXT11 en mezclas de glucosa-xilosa. Para determinar el comportamiento de fermentación sobre una mezcla de glucosa-xilosa de una cepa que expresa funcionalmente HXT11 en un ruido de fondo de delección de *HXT* (*hxt1-7, gal2*) en comparación con una cepa que expresa el panorama de *HXT* no mutada, se realizaron fermentaciones sobre Verduyn-urea complementado con concentraciones de glucosa-xilosa industrialmente relevantes (80 y 40 g l⁻¹, respectivamente). Para estos fermentaciones se usaron RN1053-HXT11 y RN1041-vacío (véase tabla 13).

Como se muestra en la Figura 17a, xilosa de RN1041 no se co-fermentó con glucosa; mientras que el grado de co-fermentación de glucosa-xilosa se potenció en la cepa RN1053-HXT11 como se muestra en la Figura 17b. Además, la fermentación de xilosa se agotó completamente en HXT11-RN1053, mientras que 10 g/l de xilosa quedaron todavía en RN1041 a las 40 h; además, el consumo de xilosa de RN1053-HXT11 aumentó espectacularmente al 2 % de glucosa residual, y la concentración de etanol aumentó de 63,92 g/l a 72,33 g/l al final de la fermentación (Figura 17ab).

Este ejemplo muestra que una cepa en la que están delecionados los transportadores de hexosa principales, pero que expresa *HXT11*, presenta utilización de xilosa más rápida que una cepa con un ruido de fondo de transportador de hexosa no mutada sin *HXT11*.

EJEMPLO 12

LA EXPRESIÓN DE HXT11 NO MUTADA RESPALDA EL CRECIMIENTO SOBRE XILOSA EN EL CRIBADO DE CONTADOR DE LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE DE GLUCOSA

Objetivo. Usando el cribado de contador de la actividad de transporte de glucosa (GTAC), es decir, transformación de la cepa mutante de hexocinasa YD01227 como hospedador para introducir transportadores y cribado de los transformantes resultantes en medio para el crecimiento y consumo de xilosa en presencia de una cantidad 5 veces más alta de glucosa, pueden identificarse transportadores de xilosa que presentan una capacidad mejorada para transportar xilosa en presencia de un excedente de glucosa (es decir, una afinidad por xilosa más alta que por glucosa; una reducción o más preferentemente eliminación completa de la capacidad de transporte de glucosa, mientras que se mantiene la capacidad de transporte de xilosa al menos al mismo nivel).

Transformación y recogida de colonias. Se transformó YD01227 con construcciones que llevan *GAL2* no mutada (pDB1250, EPA-29355), construcciones *HXT2* (pDB1162; véase el Ejemplo 9 para el plásmido de construcción) y *HXT11* (pRS313-P7T7-HXT11, véase para el Ejemplo 8 de construcción). Para cada transformación, 3 colonias, cuando estuvieron disponibles, se volvieron a sembrar usando recogida de colonias automatizada para placas de MTP de medio de xilosa de YNB + 3 % de agar y se cultivaron a 30 °C hasta que fue visible el crecimiento de colonias visibles en la punción de agar.

Pre-cultivo y cribado. Para el pre-cultivo, se transfirieron transformantes por proceso automatizado de MTP de medio de agar de selección a placas de pocillos semi-profundos de 96 pocillos (96HDWP) que contenían medio de selección líquido que consistía en medio mineral (según Verduyn, con urea como fuente de nitrógeno) complementado con 3 % de xilosa. Se incubaron HDWP de 96 pocillos durante 3 días (pre-cultivo) en un agitador orbital a 30 °C y 750 rpm. Posteriormente, para cada muestra, se transfirieron 20 µl de cultivo a placas de 24 pocillos profundos (24 DWPs) que contenían 2,5 ml de Verduyn-urea complementado con la mezcla de azúcares glucosa:xilosa en una relación 5:1 con las siguientes concentraciones: 10 g l⁻¹ de glucosa y 2 g l⁻¹ de xilosa (medio YD10). Para cada uno de los tres puntos de muestreo se inoculó una serie de DWP de 24 pocillos. En cada 24DWP, se inoculó un control de crecimiento de RN1001 para tener una indicación de los efectos de variación de placas entre diferentes 24DWP. Después de 24 horas, 72 horas y 96 horas se realizó el muestreo automático, transferencia a 96HDWP para la medición de DO automatizada a 600 nm de longitud de onda. Después de la última medición de DO después de 96 horas, las células se sedimentaron después de la centrifugación y se recogieron 100 µl de sobrenadante para el análisis por RMN de flujo de azúcares residuales y formación de etanol en el medio, después de la incubación (véase anteriormente para la descripción del método).

Resultados. Mientras que RN1001 presentó crecimiento de 24 horas en adelante (Figura 18a) y consumo completo de tanto glucosa como xilosa (Figura 18b, 18c), transformantes YD01227 que expresan construcciones de *GAL2*,

HXT2 y *HXT11* no consumieron glucosa (Figura 18c) debido a la delección de las actividades de hexo- y glucocinasa. Las últimas cepas también presentaron diversos perfiles de crecimiento (Figura 18a) con el tiempo y diversas concentraciones residuales de xilosa que representan su capacidad individual para consumir xilosa (Figura 18b) en presencia de glucosa. YD01227 que expresa la construcción de *HXT11* (YD01227-HXT11) presentó un claro crecimiento a las 72 horas (Figura 18a) y consumo sustancial de xilosa residiendo $4,83 \pm 1,26 \text{ g l}^{-1}$ ($n=3$) de xilosa en el medio después de 96 horas desde $22,7 \pm 0,12 \text{ g l}^{-1}$ ($n=43$) presente en el medio al principio del experimento; YD01227-GAL2 y YD01227-HXT2 presentaron difícilmente cualquier crecimiento y no se consumió mucha xilosa en comparación con YD01227-HXT11, residiendo respectivamente $18,34 \pm 0,39$ y $21,29 \pm 0,32 \text{ g l}^{-1}$ de xilosa en el medio después de 96 horas de incubación (Figura 18b).

Este ejemplo muestra que *HXT11* respalda la considerable formación de biomasa y el consumo de xilosa en presencia de glucosa que indica que la expresión de *HXT11* en el mutante de hexocinasa YD01227 permite un componente más específico de xilosa en el transporte de azúcar que el ejercido por la expresión de *GAL2* o *HXT2*, ambos transportadores de xilosa demostrados en el transportoma de *S. cerevisiae* (Saloheimo et al, 2007, Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. Appl Microbiol Biotechnol., 74:1041-1052; Sedlak and Ho, 2004, Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. Yeast 21:671-684; Hamacher et al, 2002, Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. Microbiology, 148:2783-2788).

EJEMPLO 13

MUTANTE DE HXT11 MEJORADO OBTENIDO DE LA BIBLIOTECA PROPENSA A ERROR DE HXT11 CRIBADA EN YD01227

Para mejorar la captación de xilosa en presencia de glucosa, se realizó PCR propensa a error para generar una biblioteca de mutantes *HXT11* que codificaban variantes de *Hxt11p* que se cribaron para el transporte de xilosa competitivo en presencia de glucosa en la cepa YD01227 (véase la Tabla 3 en el presente documento). La concentración de Mn^{2+} en la mezcla de reacción de PCR fue $0,15 \text{ mM}$, y se añadió siguiendo el protocolo de PCR propensa a error estándar (Cirino, P.C et al. 2003. Generating mutant libraries using error-prone PCR. Methods Mol. Biol., 231, pp. 3-9) usando los cebadores HXT11F (SEQ ID NO: 41) y HXT11/12R (SEQ ID NO: 43). La biblioteca se clonó en pRS313-P7T7 como fragmentos *XbaI-BamHI*. La cepa YD01227 se transformó con la biblioteca de *HXT11* y se cribaron tres mil transformantes sobre medio de Verduyn-urea complementado con una relación 1:15 de xilosa (1 %) y glucosa (15 %) en formato de placa de 96 pocillos usando Synergy MX (BioTek Instruments, Inc., EE.UU.). De estos 3000 mutantes, se obtuvieron ocho mutantes que superaron a *Hxt11p* no mutada en el medio de cribado. Se mostró un clon representativo en la Figura 19a. Los plásmidos se aislaron de YD01227 usando el protocolo según Chowdhury (Chowdhury, K. 1991. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. Nucl. Acids Res 19, pp. 2792), y se re-secuenció. Se encontró que los ocho mutantes llevaban un plásmido que llevaba secuencias mutantes que se tradujeron en una proteína que contenía la misma mutación en *Hxt11* (secuencia de aminoácidos no mutada *Hxt11p* SEQ ID NO: 62) que condujo a cambio de aminoácidos en la posición 366 Asn (N) en Asp (D). En experimentos en matraces oscilantes, el mutante N366D (YD01227-mHXT11[N366D]; véase la Tabla 13) también presentó crecimiento más rápido en el medio de cribado en comparación con YD01227-HXT11, como se muestra en la Figura 19a. La construcción pRS313-P7T7-mHXT11(N366D) se re-transformó en RN1053 produciendo RN1053-mHXT11(N366D). RN1053 que expresa el mutante *HXT11*-N366D no estuvo afectada con respecto a la utilización de xilosa sobre 2 % de medio de xilosa, en comparación con RN1053 que expresa el gen *HXT11* no mutado, ya que se observaron curvas de crecimiento similares (Figura 19b).

Captación de azúcar de la cepa RN1053 con *Hxt11* y mutante de N366D. Se determinaron la cinética de transporte de xilosa y glucosa en la cepa de *S. cerevisiae* que utiliza xilosa RN1053 que expresa los transportadores *Hxt11* y mHxt11p-(N366D). Se representó la tasa de transporte de xilosa medida frente a la concentración de glucosa o xilosa. La afinidad por glucosa de RN1053-mHXT11(N366D) disminuyó fuertemente hasta 2 veces en comparación con RN1053-HXT11, mientras que la afinidad por xilosa de RN1053-mHXT11(N366D) también disminuyó ligeramente hasta 1,2 veces, en comparación con RN1053-HXT11 (Figura 19c, 19d). Además, en presencia de concentraciones crecientes de cepas de glucosa que expresan el mutante N366D, se acumuló hasta el 75 % más de xilosa en comparación con cepas que expresan *Hxt11* (Figura 19e).

Fermentación de xilosa en presencia de glucosa. Se realizaron experimentos de fermentación de mezclas de azúcares comparando RN1053-mHXT11(N366D) con RN1053-HXT11 y RN1041-vacío.

En un primer experimento sobre Verduyn-urea complementado con 100 g/l de glucosa y 60 g/l de xilosa, como se muestra en la Figura 19f, 19g, 19h y 19i, se retrasaron la utilización de glucosa, formación de biomasa (DO600) y producción de etanol de RN1053-mHXT11(N366D) durante la fermentación, en comparación con RN1041 y RN1053-HXT11. Parece que el consumo de glucosa por RN1053-mHXT11(N366D) fue fuertemente reducido en la fase exponencial temprana en comparación con RN1053-HXT11 (Figura 19g). Además, el consumo de xilosa de RN1053-mHXT11 (N366D) no disminuyó (Figura 19h), aunque la densidad celular de RN1053-mHXT11(N366D) fue más baja que la de RN1041 y RN1053-HXT11 (Figura 19f).

En un segundo experimento de fermentación sobre Verduyn-urea complementado con concentraciones de azúcar más bajas (80 g l^{-1} de glucosa y 40 g l^{-1} de xilosa) que comparaban RN1053-mHXT11 (N366D) con RN1053-HXT11, se observó una clara diferencia en el perfil de consumo de azúcar (Figura 19j, 19k, 19l). Mientras que el perfil de consumo de glucosa presentó una tasa de consumo de glucosa más rápida durante la fase en la que la glucosa está disminuyendo rápidamente (entre 0 y 35 horas; $q_{\text{gluc}}(\text{RN1053-HXT11})$ 2,22 g/l/h frente a $q_{\text{gluc}}(\text{RN1053-mHXT11[N366D]})$ 2,04 g/l/h, disminución del 8,5 % en q_{gluc}), mientras que la tasa de consumo de xilosa ha aumentado enormemente durante la misma ventana de tiempo ($q_{\text{xil}}(\text{RN1053-HXT11})$ de 0,23 g/l/h frente a $q_{\text{xil}}(\text{RN1053-mHXT11[N366D]})$ de 0,38 g/l/h, pendiente del 65 % en q_{xil}). Durante la fase en la que se fermentó principalmente xilosa (35-73 h), las tasas de consumo de xilosa fueron casi idénticas ($q_{\text{xil}}(\text{RN1053-HXT11})$ de 0,36 g/l/h frente a $q_{\text{xil}}(\text{RN1053-mHXT11[N366D]})$ de 0,37 g/l/h). La tasa de consumo de xilosa máxima fue más alta y se alcanzó antes en la fermentación para RN1053-mHXT11(N366D) (0,65 g/l/h a 23 h) que para RN1053-HXT11 (0,50 g/l/h a 35 h). Al final de la serie de fermentación (periodo de 72 h típico para fermentaciones industriales), RN1053-HXT11 consumió el 51 % de xilosa, mientras que RN1053-mHXT11(N366D) consumió el 63 %. Los títulos de etanol medidos al final de la fermentación fueron el 4,4 % más altos para RN1053 que expresa el mutante de N366D que para RN1053 que expresa *HXT11* no mutada. Considerando que la entrada de azúcares en la fermentación fue casi idéntica, podría imaginarse que se obtuvieron rendimientos más altos de esta mezcla de glucosa-xilosa con concentraciones de azúcar típicas para fermentaciones discontinuas industrialmente relevantes, y más específicamente rendimientos más altos de la fracción de xilosa.

Estos experimentos de fermentación indican que, en comparación con su secuencia de referencia no mutada, la presencia de una variante de transportador específica de xilosa manipulada del transportador de hexosa de *HXT11* de *S. cerevisiae* sobre la membrana aumenta la tasa de consumo de xilosa durante la fase de glucosa, donde la tasa de consumo de glucosa disminuyó algo, y que se obtuvieron rendimientos de etanol más altos finales en una mezcla de glucosa-xilosa típica de hidrolizados relevantes industrialmente relevantes.

EJEMPLO 14

LA HEXOCINASA MUTANTE DESARROLLADA CONSUME XILOSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA

Ingeniería evolutiva de la cepa YD01227. Para la ingeniería evolutiva, se usó la cepa YD01227 para la ingeniería evolutiva sobre mezclas de glucosa-xilosa para desarrollar la asimilación de xilosa en presencia de glucosa que tiene como objetivo aislar mutantes espontáneos en el transporte de hexosa o la regulación de la expresión y/o actividad del transporte de hexosa.

Se inoculó YD01227 durante 16 horas en matraz oscilante con Verduyn-urea-his complementado con 2 % de xilosa. Al comienzo de la ingeniería evolutiva, se diluyó YD01227 a una DO600 de 0,2 y punto de consigna de DO al 5 % en Verduyn-urea-his que contenía 1 % de xilosa, 3 % de glucosa. Se monitorizó el flujo de salida de dióxido de carbono. En diversos momentos de tiempo se tomaron muestras para el análisis de las concentraciones de glucosa y xilosa. Se determinó si la cepa YD01227 estaba creciendo únicamente sobre xilosa o sobre ambas, glucosa y xilosa. La relación de glucosa con respecto a xilosa, al comienzo de la ingeniería evolutiva, se mantuvo baja a una relación (glucosa 3 %, xilosa 1 %), que todavía permitió el crecimiento de YD01227 al principio del experimento. Sin embargo, esto fue a tasas de crecimiento significativamente más bajas si se compara con el crecimiento en solo 1 % de xilosa. En esta configuración, la cepa consume la xilosa que conduce a relaciones de glucosa:xilosa más altas y, por tanto, una disminución en la tasa de crecimiento. Cuando disminuyó la producción de CO_2 , se añadió xilosa adicional (5 ml de 50 % de xilosa a 500 ml de volumen de fermentador) para mantener el crecimiento. A una DO600 de 20, que se alcanzó en promedio después de 5-6 días, el cultivo se diluyó en Verduyn-urea-his fresco en una relación de glucosa con respecto a xilosa más alta, si las tasas de crecimiento habían mejorado significativamente en el ciclo previo. En total, en un periodo de tiempo de 27 días, la cepa se diluyó en serie 5 veces en 1 % de Xil/3 % de Glc (1:3), 1,5 % de Xil/9 % de Glc (1:6), 1 % de Xil/8 % de Glc (1:8), 1 % de Xil/10 % de Glc (1:10) y 0,57 % de Xil/10 % de Glc (1:15), respectivamente. Antes de la inoculación en 1 % de xilosa y 8 % de glucosa, el punto de consigna para DO se redujo al 0 % (crecimiento anaerobio) con el fin de mantener una tasa de crecimiento más baja. En la Figura 20 se da el esquema para la relación de glucosa/xilosa en el medio Verduyn-urea-his durante el cultivo en quimiostato (días) de YD01227. Después de 27 días, se tomaron las muestras de la cepa YD01227 desarrollada y se sembraron en 1 % de xilosa y 10 % de glucosa con YD01227 original como control negativo. Mientras que YD01227 original mostró solo pequeñas colonias, las colonias de la cepa YD01227 desarrollada fueron 10-15 veces mayores.

Crecimiento de xilosa y captación de xilosa con/sin competición de glucosa. Después de volver a extender la cepa YD01227 desarrollada sobre una placa de 1 % de xilosa y 10 % de glucosa, se analizaron tres colonias (EvoA, EvoB y EvoC) para el crecimiento en matraces con agitación sobre 1 % de xilosa en presencia de, respectivamente, 0 %, 3 %, 6 % y 10 % de glucosa. YD01227 EvoB tuvo la tasa de crecimiento más alta sobre xilosa al 6 % en 10 % de glucosa y se comparó con la cepa YD01227 original (Figura 21a, 21b). En la cepa YD01227 original (YD01227 ORI en la Figura 21b), la tasa de crecimiento ya está parcialmente inhibida al 3 % de glucosa y completamente inhibida al 6 % y 10 % de glucosa, sin embargo, la cepa YD01227 EvoB muestra solo inhibición menor en la tasa de crecimiento a todas las concentraciones de glucosa y esto parece no estar relacionado con la cantidad de glucosa añadida (Figura 21a). Se usaron las dos mismas cepas en un experimento de captación de ^{14}C xilosa (50 mM) en el que la captación de xilosa se inhibe por glucosa (Figura 21c). La captación de xilosa sin la adición de glucosa en ambas cepas es la misma, sin embargo, tan pronto como la glucosa se añadió a ambas cepas, la captación de xilosa

en la cepa YD01227 EvoB no fue tan inhibida como la captación en la cepa YD01227 original. En una relación 1:10 la captación de xilosa en la cepa YD01227 original se suprime completamente, mientras que en la cepa YD01227 EvoB todavía se recogen 5 nmol/mgDW.min.

EJEMPLO 15

5 EL POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN LA QUIMERA DE HXT3-6 PERMITE EL CONSUMO DE XILOSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA EN EL MUTANTE DE HEXOCINASA DESARROLLADO

Expresión de HXT en la cepa YD01227 desarrollada. Se compararon los niveles de expresión de *HXT1-17* y *GAL2* en las cepas YD01227 EvoB desarrollada y YD01227 original durante cultivos discontinuos en Verduyn-urea-his que contenían 1 % de xilosa y 3 % de glucosa (Figura 22a). Se usaron cebadores (SEQ ID NO: 2-37) en la caracterización de PCR en tiempo real de la expresión de HXT en YD01227 y derivado desarrollado. Además, los niveles de expresión en la cepa YD01227 EvoB también se analizaron en Verduyn-urea-his que contenía 1 % de xilosa y 10 % de glucosa. Los valores de C(t) absolutos (datos no mostrados) muestran que los genes *HXT1-7* son los únicos genes *HXT* que son intermedia o altamente expresados de los que la quimera *HXT3-6* (deleción específica en las secuencias de *HXT3* y *HXT6* intragénicas e intergénicas de linaje de cepa que produce una secuencia quimérica de *HXT36*) tiene los niveles de expresión más altos. Ninguno de los transportadores de azúcar analizados está regulado por incremento en la cepa YD01227 EvoB en comparación con la cepa YD01227 original. La regulación por incremento observada en el gen *HXT1* en YD01227 EvoB en 1 % de xilosa y 10 % de glucosa se produjo por la alta concentración de glucosa en esta muestra que es muy bien conocida (Ozcan & Johnston, 1995, Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. Mol Cell Biol 15, pp. 1564-1572). Esta alta concentración de glucosa también conduce a la regulación por disminución de *HXT2* y *HXT7* en YD01227 EvoB. Tanto la regulación por incremento en *HXT1* como la regulación por disminución de *HXT2* y *HXT7* se describen en la bibliografía (Boles & Hollenberger 1997, Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression, FEMS Microbiol Rev 21, pp. 85-111).

Secuenciación de los genes HXT altamente expresados. Se amplificaron *HXT1-7* de ADNc que se aisló del cultivo de YD01227 EvoB en 1 % de xilosa y 3 % de glucosa usando los cebadores SEQ ID NO: 49-60. Se secuenciaron los productos de PCR de estos genes. No se revelaron mutaciones en *HXT1*, *HXT2* y *HXT4*, una mutación silenciosa en *HXT5* y *HXT7* y una mutación que condujo a cambio de aminoácido en la posición 367 (Asn en Ile; N367I) en la quimera *HXT3-6*. En algún sitio en el linaje de la cepa YD01227 se produjo una deleción entre los loci vecinos de *HXT3* y *HXT6* en los que se delecionaron secuencias intragénicas e intergénicas (parte de la parte 3' de ORF de *HXT3*, terminador *HXT3*, promotor *HXT6*, ORF de *HXT6*) produciendo una secuencia quimérica de *HXT36* que está en marco y puede expresarse como ARNm y se tradujo en proteína funcional. La proteína quimérica traducida Hxt3-6p de la que los primeros 438 aminoácidos son idénticos a la secuencia de aminoácidos de CEN.PK Hxt3p, mientras que los 130 aminoácidos hacia el extremo C son idénticos a Hxt6p en CEN.PK. Se han documentado reordenamientos genómicos en el locus *HXT3-6-7* en el pasado, por ejemplo secuencias quiméricas de *HXT6/7* resultantes de cultivos en quimiostato a bajas concentraciones de glucosa, y se propone que se producen por recombinación homóloga debido a los estiramientos altamente homólogos de secuencias en esta agrupación de transportadores de hexosa (Brown et al 1998. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. Mol Biol Evol 15:931-942). La mutación puntual N367I se localiza en el dominio transmembrana (TMD) 8 que se sabe que contiene restos responsables de la afinidad por glucosa (Kasahara & Kasahara, 2003. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *S. cerevisiae* Hxt2 transporter. Biochem J. 372:247-252, reconfirmado por la presente solicitud de patente).

EJEMPLOS 16-18

MÉTODOS

Métodos no mencionados en la sección de los Ejemplos 16 y 17 fueron ya descritos en la Ejemplos 6-15 de la sección. Oligonucleótidos usados en los estudios descritos en el Ejemplo 16 y 17 se representan en la Tabla 14. Se hizo la mutagénesis saturada de la posición N367 en *HXT36* usando PCR con Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix con tampón HF usando los pares de cebadores F *HXT36 BcuI* (SEQ ID NO 127)/R *HXT36 367NNN* (SEQ ID NO 128) y F *HXT36 367NNN* (SEQ ID NO 129)/R *HXT36 BamHI* (SEQ ID NO 130). Se usaron posteriormente fragmentos de 1119 y 623 pares de bases en una PCR de solapamiento usando los cebadores externos F *HXT36 BcuI* y R *HXT36 BamHI* y se clonaron en pRS313P7T7 usando *BcuI* y *BamHI*. La secuenciación de 48 clones de *E. coli* dio N367S (tcc), N367P (ccc), N367G (ggg), N367Y (tac), N367A (gcc), N367H (cac), N367R (agg), N367F (ttt), N367E (gag) y N367V (gtg). Se amplificaron los 8 aminoácidos restantes en la posición 367 y se clonaron con PCR de solapamiento usando cebadores específicos en los que NNN se sustituyó por tta (L), tgt (C), tgg (W), atg (M), act (T), aag (K), gat (D) y cag (Q).

Se hicieron fusiones de GFP del extremo carboxilo con mutante *HXT36* y *HXT36-N367I* por amplificación de los genes correspondientes con Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (tampón HF) usando los cebadores F *HXT36 BcuI* (SEQ ID NO 127) y R *HXT36 BamHI-stop* (SEQ ID NO 131). El propio GFP se amplificó con F GFP *BamHI* (SEQ ID NO 132) y R GFP *Clal* (SEQ ID NO 133). Se digirieron *HXT36* y *HXT36-N367I* con las enzimas de

restricción *BcuI* y *BamHI* y GFP se digirió con *BamHI* y *Clal*. Los genes *HXT36* se ligaron por separado en una ligación de dos fragmentos juntos con GFP en pRS313-P7T7 que se cortó con *BcuI* y *Clal*.

Para las fermentaciones del Ejemplo 18, se cultivaron las cepas, por duplicado, en botellas Schott de 50 ml llenas hasta el borde con 68 ml de medio de fermentación que contenía 0,5 % de D-glucosa y 0,5 % de D-xilosa y se mantuvieron completamente cerradas a 30 °C en un baño de agua. La velocidad de agitación, con un agitador de imán, fue 200 rpm y las cepas se inocularon a una DO600 inicial de aproximadamente 8,0. A intervalos regulares se tomaron muestras para las mismas mediciones de DO600 y análisis de HPLC.

Tabla 14. Oligonucleótidos usados en la clonación y secuenciación.

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5' → 3')
127	F HXT36 <i>BcuI</i>	GCATACTAGTATGAATTCAACTCCAGATTTAATATCC
128	R HXT36 367NNN	CAACAAGTAGAGAAGAAAnnnGACGACACCG
129	F HXT36 367NNN	CGGTGTCGTCnnnTTCTTCTCTACTTGTTG
130	R HXT36 <i>BamHI</i>	ACGTGGATCCTTATTTGGTGCTGAACATTCTCTTGT
131	R HXT36 <i>BamHI</i> -stop	CCATGGATCCTTTGGTGCTGAACATTCTCTGTAC
132	F GFP <i>BamHI</i>	AAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
133	R GFP <i>Clal</i>	AAAATCGATTTACTTGTACAGCTCGTCC

EJEMPLO 16

LA DISMINUCIÓN DE $V_{\text{máx}}$ DE HXT3-6 N367I NO ES EL RESULTADO DE LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MUTANTE COMO SE MUESTRA POR ESTUDIOS DE MARCADO DE GFP

Para garantizar que esta $V_{\text{máx}}$ más baja no es debida a una disminución en la expresión, se prepararon quimeras en las que GFP se fusionó con el extremo C de HXT36 y el mutante HXT36-N367I. Ambas fusiones se transformaron en la cepa RN1053, y la obtención de imágenes de fluorescencia reveló que las proteínas estaban uniformemente distribuidas sobre la membrana plasmática (Fig. 23A y 23B). Como se registraron los mismos niveles de GFP, se expresan Hxt36p y Hxt36p-N367I a grados similares (Fig. 23C).

EJEMPLO 17

LA MUTAGÉNESIS DE SATURACIÓN EN LA POSICIÓN ASPARAGINA-367 EN LA QUIMERA DE HXT3-6 PARA LA EXPLORACIÓN DEL ESPACIO DE SECUENCIA REVELA LA ALANINA COMO UN RESTO POTENTE EN EL TRANSPORTADOR POTENCIADO CON CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE XILOSA POTENCIADA

Para explorar el espacio de secuencia de la posición N367 (correspondiente a la posición N376 en SEQ ID NO: 59), todas las sustituciones de aminoácidos se introdujeron individualmente en el gen *HXT36*. Los mutantes HXT36-N367X individuales se transformaron en la cepa de delección de hexocinasa YD01227 y se probaron para el crecimiento sobre medio mínimo que contenía 1 % de D-xilosa y 10 % de D-glucosa. El transformante que lleva el mutante HXT36-N367I original mostró una DO_{600} de 0,56 después de 24 h, mientras que HXT36 no mutada fue incapaz de crecer bajo estas condiciones (Fig. 24). El transformante de crecimiento más rápido poseyó el mutante Hxt36p-N367A, que alcanzó una DO_{600} de casi 2. También los transformantes que expresan los mutantes HXT36 las otras sustituciones de aminoácidos alifáticos no polares (glicina, valina, leucina y metionina) fueron capaces de crecer sobre D-xilosa en presencia de 10 % de D-glucosa. Por otra parte, los mutantes de fenilalanina e histidina mostraron una tasa de crecimiento reducida mientras que las fuertes sustituciones polares y cargadas de aminoácidos no soportaron el crecimiento (Fig. 24). Estos datos muestran que N367 (correspondientes a N376 en Gal2p y N366 en Hxt11p) es un resto crítico en determinar la especificidad de Hxt36p por glucosa frente a xilosa.

Se analizaron los mutantes de Hxt36p N367A y N367I adicionalmente para determinar su cinética de transportador. En el presente documento, los transportadores se expresaron en la cepa RN1053 que está equipada con una baja actividad de ruido de fondo de transporte de glucosa. K_m y $V_{\text{máx}}$ para la captación de D-glucosa por HXT36 fue aproximadamente 6 mM y 32 nmol/mgDW.min, respectivamente (Tabla 15 y Fig. 25). Sorprendentemente, el mutante Hxt36p-N367I fue completamente defectuoso en la captación de D-glucosa, mientras que la afinidad por la captación de D-xilosa mejoró 2,7 veces (es decir, de 108 a 40 mM) en comparación con Hxt36p (Tabla 15). La mutación, sin embargo, también causó una disminución de casi 3 veces en la $V_{\text{máx}}$ para la captación de D-xilosa.

También se examinó la actividad de transporte del mutante de Hxt36p-N367A que mostró el crecimiento más rápido sobre D-xilosa. Este transportador todavía mostró alguna captación de glucosa, aunque con una K_m muy pobre

(171 mM frente a 6 mM). En comparación con el mutante N367I, la mutación N367A causó tanto una mejora de los valores de K_m como de $V_{m\acute{a}x}$ para la captación de D-xilosa a 25 mM y 15,3 nmol/mgDW.min, respectivamente.

EJEMPLO 18

CO-FERMENTACIÓN DE D-GLUCOSA Y D-XILOS A POR UNA CEPA DE *S. CEREVISIAE* MANIPULADA CON CARACTERÍSTICAS DE TRANSPORTE ALTERADAS

Con el fin de investigar la co-fermentación de D-glucosa y D-xilosa, se cultivaron la cepa RN1053 que aloja Hxt36, Hxt36-N367I y Hxt36p-N367A no mutada, sobre 5 g l⁻¹ de D-glucosa/ 5 g l⁻¹ de D-xilosa a una DO₆₀₀ inicial industrialmente relevante más alta de aproximadamente 8,0. El consumo de azúcar y las concentraciones de etanol fueron seguidos con el tiempo (Fig. 26). La cepa que contiene el transportador Hxt36-N367I crece sobre D-xilosa, pero debido al grave defecto de captación de D-glucosa (Fig. 26B), solo muestra algún nivel de ruido de fondo de consumo de D-glucosa que es similar al de la cepa RN1053 original sin ningún transportador reintroducido (datos no mostrados). La cepa que aloja el mutante de Hxt36-N367A mostró un co-consumo de D-glucosa y D-xilosa mejorado (Fig. 26C) en comparación con la cepa que contiene el transportador no mutado de Hxt36 (Fig. 26A). Además, también aumentó el consumo de azúcar total debido al co-consumo de glucosa y xilosa por RN1053 que expresa Hxt36p-N367A, dando una concentración de etanol más alta (2,83 g l⁻¹) que RN1053 que expresa Hxt36p no mutada (2,67 g l⁻¹) después de 9 horas de fermentación.

Tabla 15. Valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para la captación de D-glucosa y D-xilosa por transportadores de Hxt36p expresados en la cepa RN1053.

	K_m (mM)		$V_{m\acute{a}x}$ (nmol/mgDW.min)	
	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
HXT36	6,13 ± 0,02	107,9 ± 12,1	31,7 ± 0,07	32,9 ± 3,1
HXT36-N367I	- ^a	39,8 ± 5,6	- ^a	12,1 ± 1,63
HXT36-N367A	170,7 ± 37,8	24,9 ± 3,4	37,2 ± 4,4	15,3 ± 0,2

^a No pudo determinarse

EJEMPLOS 19 y 20

Material y métodos

Métodos no mencionados en la sección de los Ejemplos 19 y 20 fueron ya descritos en secciones de los Ejemplos 6-18. Los oligonucleótidos usados en los estudios descritos en el Ejemplo 19 y 20 se representan en la Tabla 16.

Mutagénesis de N366X. Se hizo la mutagénesis saturada de la posición N366 en HXT11 usando PCR con Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix con tampón HF usando los pares de cebadores F HXT11 XbaI/R HXT11 366NNN y F HXT11 366NNN/R HXT11 BamHI (véase la Tabla 16). Los fragmentos de 1113 y 591 pares de bases se usaron posteriormente en una PCR de solapamiento usando los cebadores externos F HXT11 XbaI y R HXT11 BamHI y clonados en pRS313P7T7 usando XbaI y BamHI. La secuenciación de 48 clones de *E. coli* dio N367S (tct), N367P (cca), N367G (ggt), N367A (gcc), N367H (cac), N367R (cgc), N367L (ttg), N367C (tgt), N367T (acg), N367D (gat), N367Q (caa) y N367V (gtg). Se amplificaron los 6 aminoácidos restantes en la posición 366 y se clonaron como se ha mencionado anteriormente con PCR de solapamiento usando cebadores específicos en los que NNN se sustituyó por ttt (F), gag (E), tgg (W), atg (M), aaa (K) y N367Y (tat).

Usando las secuencias de variante de HXT11 generadas generadas por la PCR de mutagénesis de saturación, se prepararon construcciones de fusión HXT11-N366x-GFP para estudiar la localización celular de variantes de HXT11 similarmente (con oligonucleótidos, sitios de restricción y vector de esqueleto de pRS313-P7T7-GFP) como se describe en los métodos para el Ejemplo 10 (p. 96).

Experimentos de fermentación. Se pre-cultivaron cultivos de levadura en medio mineral que contenía 2 % de maltosa. Se recogieron las células en la fase exponencial media y se inocularon después de lavar dos veces con agua esterilizada. Los experimentos de fermentación se realizaron usando 100 ml de medio mineral que contenía 7 % de glucosa y 4 % de xilosa en botella de 120 ml a 30 °C con una DO₆₀₀ inicial de 5 en condiciones de oxígeno limitado. La velocidad de agitación, con un agitador magnético, fue 200 rpm. Todos los experimentos de fermentación en botella se repitieron independientemente.

Tabla 16. Cebadores usados para la mutagénesis de saturación de HXT11 de *S. cerevisiae*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
F HXT11 XbaI	GGCCTCTAGAATGTCAGGTGTTAATAATACATCCGC
R HXT11 BamHI	CGATGGATCCTCAGCTGGAAAAGAACCTCTTGTAATTG
F HXT11 366NNN	CGGTGTGGTnnnTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 366NNN	GAATGAAGAGAAAAA nnnAACCACACCG
F HXT11 N366F	CGGTGTGGTtttTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366F	GAATGAAGAGAAAAAaaaAACCACACCG
F HXT11 N366E	CGGTGTGGTgagTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366E	GAATGAAGAGAAAAAActcAACCACACCG
F HXT11 N366K	CGGTGTGGTtaaTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366K	GAATGAAGAGAAAAAAttaAACCACACCG
F HXT11 N366M	CGGTGTGGTtatTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366M	GAATGAAGAGAAAAAcatAACCACACCG
F HXT11 N366W	CGGTGTGGTtggTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366W	GAATGAAGAGAAAAAaccaAACCACACCG
F HXT11 N366Y	CGGTGTGGTtatTTTTTCTCTTCATTC
R HXT11 N366Y	GAATGAAGAGAAAAAataAACCACACCG

n es cualquier nucleótido

EJEMPLO 19**MUTACIONES N366 EN HXT11 MEJORAN LA UTILIZACIÓN DE XILOSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA.**

- 5 La mutación N366D en Hxt11 mejoró la captación de xilosa en presencia de glucosa debido a una reducción en la afinidad de transporte de glucosa. Con el fin de evaluar la importancia de esta posición, se sustituyó N366 con cada uno de los otros 19 aminoácidos para generar una serie de mutantes N366X. Los genes correspondientes se expresaron en la cepa YD01227 y se evaluaron para su capacidad para utilizar 1 % de xilosa en presencia de 10 % de glucosa usando placas de 96 pocillos. Aquí, se usó 10 % de glucosa en lugar de 15 % para aumentar la
- 10 sensibilidad del ensayo con el fin de discriminar entre el rendimiento de los diversos mutantes. Las tasas de crecimiento sobre xilosa en presencia de un exceso de 10 veces de glucosa mejoraron cuando N366 se sustituyó por un resto de metionina (M) o treonina (T) (Figura 27A), y fue hasta 3 veces superior que la sustitución de N366D. Aminoácidos con una cadena lateral hidrófoba de carga positiva o voluminosa no respaldaron el crecimiento sobre xilosa en la condición de cribado. Los mutantes también se probaron para crecimiento sobre glucosa y se
- 15 expresaron en la cepa RN1053. Los mutantes N366M y N366T-Hxt11 mostraron crecimiento similar sobre glucosa o en comparación con Hxt11 no mutada (Figura 27B y 27C). Además, el nivel de expresión de todos los mutantes individuales se determinó usando proteínas Hxt11 marcadas con GFP (Figura 28). Todas las proteínas Hxt11-GFP se expresaron altamente en la membrana, excepto aquellas con las proteínas N366W y N366Y Hxt11 marcadas con GFP, parece evidente una localización citosólica y probablemente vacuolar. Esto sugiere plegamiento erróneo de proteína y direccionamiento defectuoso a la membrana por estos mutantes que explican la baja actividad en los
- 20 experimentos de crecimiento con xilosa y glucosa. Sin embargo, la proteína no mutada y el mutante N366M y N366T-Hxt11 se localizó en la membrana plasmática. En general, estos datos indican que N366 es un resto crítico en determinar la especificidad de Hxt11 para xilosa frente a glucosa.

- 25 Se determinó la cinética de transporte de xilosa y glucosa mediante Hxt11 y los mutantes N366T y N366M-Hxt11 para los genes expresados en la xilosa que utiliza la cepa RN1053 de *S. cerevisiae*. En comparación con Hxt11 no mutada, la afinidad por el transporte de glucosa por N366T y N366M-Hxt11 se redujo hasta 5 y 4 veces, respectivamente. A diferencia, la afinidad por xilosa por estos mutantes mejoró hasta 2 veces (Tabla 17) con respecto a Hxt11. La $V_{\text{máx}}$ para la captación de glucosa por el mutante de N366T Hxt11 aumentó aproximadamente el 40 % en comparación con Hxt11 no mutada, mientras que $V_{\text{máx}}$ no cambió para la proteína N366M Hxt11. Y, lo

que es más importante, la $V_{\text{máx}}$ para xilosa de los mutantes siguió siendo ampliamente invariable en comparación con Hxt11.

Tabla 17. Valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ para la captación de D-glucosa y D-xilosa por transportadores de Hxt11 expresados en la cepa RN1053.

	K_m (mM)		$V_{\text{máx}}$ (nmol/mg DW.min)	
	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
Hxt11	33,4 ± 2,1	84,2 ± 10,0	82,3 ± 3,8	44,5 ± 1,7
Hxt11-N366D	87,0 ± 6,4	106,7 ± 21,7	98,9 ± 5,7	45,5 ± 1,0
Hxt11-N366T	194,4 ± 47,9	46,7 ± 2,7	125,6 ± 3,7	40,1 ± 2,4
Hxt11-N366M	144,9 ± 36,0	50,1 ± 9,7	75,3 ± 8,6	34,2 ± 3,4
Hxt2	n.d.	51,2 ± 0,1	n.d.	12,5 ± 0,2
n.d., no determinado				

5

EJEMPLO 20

CO-FERMENTACIÓN DE D-GLUCOSA Y D-XILOSA POR CEPAS DE *S. CEREVISIAE* MANIPULADAS QUE EXPRESAN VARIANTES DE HXT11

Debido a los marcados efectos de las mutaciones N366 en Hxt11 sobre el transporte de glucosa sin interferir con el transporte de xilosa, los mutantes se examinaron adicionalmente para su capacidad para co-metabolizar xilosa y glucosa en condiciones industriales, es decir, 7 % de glucosa y 4 % de xilosa, respectivamente. En el presente documento, los mutantes se expresaron en la cepa RN1053, y el crecimiento se comparó con Hxt11 no mutada y la cepa RN1001 que contiene un complemento completo de los transportadores endógenos. Los dos mutantes respaldaron un co-consumo próximo a perfecto de glucosa y xilosa (Figura 29A y 29B) a diferencia de la cepa RN1001 (Figura 29C) y Hxt11 no mutada de RN1053 (Figura 29D) y que mostraron consumo de xilosa retardado. Estos datos demuestran que la mutagénesis de la posición N366 de Hxt11 da mutantes que median en una captación equilibrada de glucosa y xilosa respaldando así el co-consumo de los azúcares hexosa y pentosa. Se obtuvieron los mejores resultados para HXT11 mutante de N366T.

Co-consumo

El co-consumo de una célula se cuantifica en el presente documento y se expresa como el índice de co-consumo. El índice de co-consumo era en el presente documento el índice de co-consumo para glucosa y xilosa y se calculó como la suma durante el intervalo de tiempo de 0-24 horas (se midió a 0, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas) de la diferencia absoluta de la tasa de captación de glucosa (Qg) y la tasa de captación de xilosa (Qx), expresada como gramos de azúcar consumidos por unidad de tiempo. La fermentación fue una fermentación en cultivo discontinuo anaerobio a 1,0 g/l de brea de levadura seca, 30 °C de temperatura y en la que el medio de fermentación contiene 71,8 gramos de glucosa por litro y 40,0 gramos de xilosa por litro, al comienzo de la fermentación. Un bajo valor para el índice de consumo indica alto co-consumo, una alto valor menos co-consumo.

Estos datos y cálculos de fermentación para las cepas RN1001, RN1053 HXT11, RN1053 HXT11 (N366M) y RN1053 HXT11 (N366T) se dan en la Tabla 18.

Tabla 18: Datos de fermentación y cálculo del índice de co-consumo para las cepas RN1001, RN1053 HXT11, RN1053 HXT11 (N366M) y RN1053 HXT11 (N366T)

DS68616										
Tiempo	Promedio									
	Glucosa	Xilosa		Qg (g/h)	Qx (g/h)		abs(Qg-Qx)	suma(abs(Qg-Qx))		corr(glucosa, xilosa)
0	71,8	39,9								
8	46,9	39,8		3,12	0,02		3,10	29,1		0,69
12	31,0	38,7		3,97	0,27		3,70			

ES 2 663 480 T3

14	18,4	37,8		6,31	0,46		5,85			
16	5,42	35,9		6,47	0,94		5,53			
18	0	29,1		2,71	3,39		0,68			
20	0	20,7		0	4,25		4,25			
22	0	15,4		0	2,632		2,63			
24	0	8,60		0	3,40		3,40			
HXT11										
	Promedio									
	Glucosa	Xilosa		Qg (g/h)	Qx (g/h)		abs(Qg-Qx)	suma(abs(Qg-Qx))		corr(glucosa, xilosa)
0	71,8	39,9								
8	55,4	40,0		2,06	0,00		2,06	25,0		0,84
12	41,1	38,6		3,55	0,345		3,21			
14	25,5	35,2		7,84	1,70		6,15			
16	12,5	32,3		6,49	1,47		5,02			
18	2,85	26,0		4,82	3,12		1,70			
20	0	19,4		1,42	3,34		1,91			
22	0	14,3		0	2,51		2,51			
24	0	9,44		0	2,45		2,45			
HXT11 (N366M)										
	Promedio									
	Glucosa	Xilosa		Qg (g/h)	Qx (g/h)		abs(Qg-Qx)	suma(abs(Qg-Qx))		corr(glucosa, xilosa)
0	71,8	39,9								
8	60,2	38,2		1,45	0,220		1,23	11,2		0,977
12	52,5	35,6		1,93	0,644		1,29			
14	42,7	31,3		4,87	2,15		2,72			
16	35,6	28,8		3,55	1,23		2,32			
18	29,4	26,0		3,09	1,44		1,66			
20	23,3	22,3		3,05	1,82		1,24			
22	18,5	18,7		2,42	1,83		0,592			
24	14,1	14,5		2,18	2,07		0,117			

HXT11 (N366T)										
	Promedio									
	Glucosa	Xilosa		Qg (g/h)	Qx (g/h)		abs(Qg-Qx)	suma(abs(Qg-Qx))		corr(glucosa, xilosa)
0	71,8	39,9								
8	59,1	36,7		1,59	0,409		1,18	11,8		0,977
12	47,7	33,5		2,84	0,798		2,05			
14	37,5	28,6		5,13	2,41		2,71			
16	28,6	24,7		4,42	1,99		2,43			
18	21,3	20,7		3,68	1,97		1,72			
20	14,2	15,9		3,55	2,44		1,11			
22	8,87	11,1		2,65	2,38		0,268			
24	4,94	6,56		1,96	2,26		0,3			

El índice de co-consumo de las cepas RN1001, RN1053 HXT11, RN1053 HXT11 (N366M) y RN1053 HXT11 (N366T) se determinó como en la Tabla 18. En resumen, los resultados para el índice de co-consumo se dan en la Tabla 19.

5

Tabla 19: Índice de co-consumo de las cepas

Cepa	Índice de co-consumo (suma abs (Qg*-Qx*) (g/h))
RN1001	29,1
RN1053 HXT11	25,0
RN1053 HXT11 (N366M)	11,2
RN1053 HXT11 (N366T)	11,8

REFERENCIAS

- Ausubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- 10 Becker J, Boles E. 2003 A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol.* 69: 4144-4150.
- Hamacher T, Becker J, Gárdonyi M, Hahn-Hägerdal B, Boles E. 2002 Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* 148: 2783-2788.
- 15 Kasahara T, Kasahara M. 2000 Three aromatic amino acid residues critical for galactose transport in yeast Gal2 transporter. *J Biol Chem.* 275: 4422-4428.
- Kasahara T, Maeda M, Boles E, Kasahara M. 2009 Identification of a key residue determining substrate affinity in the human glucose transporter GLUT1. *Biochim Biophys Acta.* 1788: 1051-1055.
- Kasahara T, Kasahara M. 2010 Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7: a two-dimensional comprehensive study. *J Biol Chem.* 285: 26263-26268.
- 20 Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT 2005 Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research* 5: 399-409.

Luttik MA, Kötter P, Salomons FA, van der Klei IJ, van Dijken JP, Pronk JT 2000 The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. *Journal of Bacteriology* 182: 7007-7013.

5 Nelissen B, De Wachter R, Goffeau A. 1997 Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 21: 113-134.

Sambrook et al. 1989 *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*

Schiestl RH and Gietz RD 1989 High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16: 339-346.

10 Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E 1999 Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464: 123-128.

Young E, Poucher A, Comer A, Bailey A, Alper H. 2011 Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3311-3319

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE PERMEASA

20 <130>29382-WO-PCT

<150> EP13170644.2

<151>06-26- 2013

25 <150> EP13197988.2

<151> 18-12-2013

<150> EP14160772.1

<151> 19-03-2014

30

<150> EP13170646.7

<151> 05-06-2013

<150> EP14164270.2

35 <151> 10-04-2014

<150> EP13170648.3

<151> 05-06-2013

<160> 149

40

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..20

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5034-kanf" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 1

aagcttgct cgtccccgcc 20

15

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<222> 1..20

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5035-kanr" /tipo_mol="ADN no asignado"

25

<400> 2

gtcgacactg gatggcggcg 20

<210> 3

30 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

<222> 1..60

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5116-lf2" /tipo_mol="ADN no asignado"

ES 2 663 480 T3

<400> 3
attctagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcgcccta agctgcctc gtccccgccg 60

5 <210> 4
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..56
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5118-lr2" /tipo_mol="ADN no asignado"

15 <400> 4
catacattat acgaagttat gcgcgctcta gatatcgtcg aactggatg gcggcg 56

<210> 5
<211> 65

20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

25 <222> 1..65
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5115-lf1" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 5
atccggacgt acgtataact tcgtatagca tacattatac gaagttattc tagtaacggc 60
cgcca 65

30 <210> 6
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente

ES 2 663 480 T3

<222> 1..60

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 5117-lr1" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 6

5 tcatgacgtc tcgaggccta taacttcgta tagcatacat tatacgaagt tatgcgcgct 60

<210> 7

<211> 5082

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..5082

15 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN201; TOPO-BLUNT-loxP-kanMX-loxP" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 7

ES 2 663 480 T3

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	60
acgacagggt tccccactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat	240
ttagggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcgatcca	300
ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttatcc ggacgtacgt ataacttcgt	360
atagcataca ttatacgaag ttattctagt aacggccgcc agtgtgctgg aattcgcct	420
taagcttgcc tgcgtcccg cgggtcaccc gccagcgac atggaggccc agaataccct	480
ccttgacagt cttgacgtgc gcagctcagg ggcatgatgt gactgtcgcc cgtacattta	540
gccatacat ccccatgtat aatcatttgc atccatacat tttgatggcc gcacggcgcg	600
aagcaaaaat tacggctcct cgctgcagac ctgcgagcag ggaaacgctc ccctcacaga	660
cgcgttgaat tgtccccacg ccgcgcccct gtagagaaat ataaaagggt aggatttgcc	720
actgagggttc ttctttcata tacttccttt taaaatcttg ctaggatata gttctcacat	780
cacatccgaa cataaacaac catgggtaag gaaaagactc acgtttcgag gccgcgatta	840
aattccaaca tggatgctga tttatatggg tataaatggg ctgcgataa tgcgggcaa	900
tcagggtgca caatctatcg attgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa	960
catggcaaag gtagcgttgc caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg	1020
acggaattta tgctcttcc gaccatcaag cattttatcc gtactcctga tgatgcattg	1080
ttactcacca ctgcgatccc cggcaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat	1140
tcagggtgaaa atattgttga tgcgctggca gtgttctgc gccggttgca ttcgattcct	1200
gtttgtaatt gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga	1260
atgaataacg gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctggt	1320
gaacaagtct ggaaagaaat gcataagctt ttgccattct caccgattc agtcgtcact	1380
catggtgatt tctcacttga taaccttatt ttgacgagg ggaaattaat aggttgatt	1440
gatgttgac gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc	1500
ctcggtgagt tttctcttc attacagaaa cggttttttc aaaaatatgg tattgataat	1560
cctgatatga ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagtactg	1620

ES 2 663 480 T3

acaataaaaa gattcttgtt ttcaagaact tgtcatttgt atagtttttt tatattgtag	1680
ttgttctatt ttaatcaaat gtttagcgtga tttatatattt ttttcgcctc gacatcatct	1740
gccagatgc agttaagtgc gcagaaagta atatcatgcy tcaatcgtat gtgaatgctg	1800
gtcgctatac tgctgtcgat tcgatactaa cgcgcgccatc cagtgtcgac gatattctaga	1860
gcgcgcataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat aggcctcgag acgtcatgaa	1920
agggcgaatt ctgagatata catcacactg gcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc	1980
caattcgccc tatagttagt cgtattacaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga	2040
ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag	2100
ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctata	2160
cgtacggcag ttttaaggttt acacctataa aagagagagc cgttatcgtc tgtttgtgga	2220
tgtacagagt gatattattg acacgccggg gcgaaggatg gtgatcccc tggccagtgc	2280
acgtctgctg tcagataaag tctcccgta actttaccgc gtggtgcata tcggggatga	2340
aagctggcgc atgatgacca ccgatatggc cagtgtgccg gtctccgtta tcggggaaga	2400
agtggctgat ctcagccacc gcgaaaatga catcaaaaac gccattaacc tgatgttctg	2460
gggaatataa atgtcaggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttcac	2520
gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat	2580
ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgacagt ggcttacatg	2640
gcgatagcta gactgggccc ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc	2700
gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaaactg atggctttct cgcgcgcaag	2760
gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat	2820
gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	2880
ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	2940
gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	3000
agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct	3060
cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga	3120
tctcctgtca tctcaccttg ctccctgcga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	3180
gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	3240
cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga	3300
gcatacgggg ctccgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca tgcccagcgg	3360
cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg	3420
ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat	3480

ES 2 663 480 T3

```

agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt 3540
cgtgcttttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcata gccttctata gccttcttga 3600
cgagttcttc tgaattatta acgcttacaa tttcctgatg cggatatttc tccttacgca 3660
tctgtgcggg atttcacacc gcatacaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 3720
cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc 3780
tgataaatgc ttcaataata gcacgtgagg agggccacca tggccaagtt gaccagtgcc 3840
gttccgggtg tcaccgcgcg cgacgtcgcc ggagcggtcg agttctggac cgaccggctc 3900
gggttctccc gggacttcgt ggaggacgac ttgcgcgggt tggtcgggga cgacgtgacc 3960
ctgttcatca gcgcgggtcca ggaccagggt gtgcgcggaca acaccctggc ctgggtgtgg 4020
gtgcgcggcc tggacgagct gtacgccgag tggtcggagg tcgtgtccac gaacttcggg 4080
gacgcctccg ggccggccat gaccgagatc ggcgagcagc cgtgggggcg ggagttcgcc 4140
ctgcgcgacc cgcccgcaa ctgcgtgcac ttcgtggccg aggagcagga ctgacacgtg 4200
ctaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 4260
acaaaaatcc cttaacgtga gttttcggtc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc 4320
aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 4380
ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag 4440
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta 4500
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 4560
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag 4620
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggtgtg acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg 4680
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcggcacg 4740
cttccogaag ggagaaaggc ggacagggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag 4800
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 4860
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 4920
aacgccagca acgcggcctt tttacgggtc ctgggctttt gctggccttt tgctcacatg 4980
ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgaagct 5040
gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt ca 5082

```

<210> 8

<211> 5352

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10

<222> 1..5352

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN251; TOPO-BLUNT-loxP-hphMX-loxP" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 8

5

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttgcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat      240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtaaccgag ctcggtacca      300
ctagtaacgg cgcgcagtgt gctggaattc gccctttcat gacgtctcga ggctataaac      360
ttcgtatagc atacattata cgaagttatg cgcgctctag atatcgtcga gcggccgcca      420
gtgtgatgga tatcatcgat gaattcgagc tcgttttcga cactggatgg cggcgtagt      480
atcgaatcga cagcagtata gcgaccagca ttcacatacg attgacgcat gatattactt      540
tctgcgcact taacttcgca tctgggcaga tgatgtcgag gcgaaaaaa atataaatca      600
cgctaacatt tgattaaaat agaacaacta caatataaaa aaactataca aatgacaagt      660
tcttgaaaac aagaatcttt ttattgtcag tactgattat tcctttgcc tcggacgagt      720
gctggggcgt cggtttccac tatcggcgag tacttctaca cagccatcgg tccagacggc      780
cgcgcttctg cgggcgattt gtgtacgccc gacagtcccg gctccggatc ggacgattgc      840
gtcgcacgca ccctgcgccc aagctgcac atcgaaattg ccgtcaacca agctctgata      900
gagttggtca agaccaatgc ggagcatata cgcccgagc cgcggcgatc ctgcaagctc      960
cggatgcctc cgctcgaagt agcgcgtctg ctgctccata caagccaacc acggcctcca     1020
gaagaagatg ttggcgacct cgtattggga atccccgaac atcgccctcg tccagtcaat     1080
gaccgctgtt atgcggccat tgtccgtcag gacattgttg gagccgaaat ccgcgtgcac     1140
gaggtgccgg acttcggggc agtcctcggc ccaaagcatc agctcatcga gagcctgcgc     1200
gacggacgca ctgacggtgt cgtccatcac agtttgccag tgatacacat ggggatcagc     1260
aatcgcgcat atgaaatcac gccatgtagt gtattgaccg attccttgcg gtccgaatgg     1320
gccgaaccgg ctgctctggc taagatcggc cgcagcgatc gcatccatgg cctccggagc     1380
cggctgcaga acagcgggca gttcggtttc aggcaggtct tgcaacgtga caccctgtgc     1440
acggcgggag atgcaatagg tcaggctctc gctgaattcc ccaatgtcaa gcaattccgg     1500
aatcgggagc gcggccgatg caaagtgccg ataaacataa cgatctttgt agaaaccatc     1560
ggcgcagcta ttaccgcga ggacatatcc acgccctcct acatcgaagc tgaaagcacg     1620
agattcttcg ccctccgaga gctgcatcag gtcggagacg ctgtcgaact ttctgatcag     1680
aaacttctcg acagacgtcg cggtgagttc aggcctttta cccatggttg ttatgttcg     1740

```

ES 2 663 480 T3

gatgtgatgt gagaactgta tcctagcaag atttttaaag gaagtatatg aaagaagaac	1800
ctcagtggca aatcctaacc ttttatattt ctctacaggg gcgcggcgtg gggacaattc	1860
acgcgtctgt gaggggagcg tttccctgct cgcaggctctg cagcaggagg ccgtaatttt	1920
tgcttcgcgc cgtgcggcca tcaaaatgta tggatgcaaa tgattatata tggggatgta	1980
tgggctaagt gtacgggcga cagtcacatc atgccctga gctgcgcacg tcaagactgt	2040
caaggagggg attctgggcc tccatgtcgc tggccgggtg acccggcggg gacgaggcaa	2100
gcttaagggc gaattccagc aactggcgg cggttactag aataacttcg tataatgtat	2160
gctatacgaa gttatacgta cgtccggata agggcgaatt ctgagatata catcacactg	2220
gcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc caattcgccc tatagtgagt cgtattacaa	2280
ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa	2340
tgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga	2400
tgcctctcc caacagttgc gcagcctata cgtacggcag ttttaaggttt acacctataa	2460
aagagagagc cgttatcgtc tgtttgtgga tgtacagagt gatattattg acacgccggg	2520
gcgacggatg gtgatcccc tggccagtgc acgtctgctg tcagataaag tctcccgta	2580
actttaccgg gtgggtgcata tcggggatga aagctggcgc atgatgacca ccgatatggc	2640
cagtgtgccg gtctccgtta tcggggaaga agtggctgat ctcagccacc gcgaaaatga	2700
catcaaaaac gccattaacc tgatgttctg gggaatataa atgtcaggca tgagattatc	2760
aaaaaggatc ttcacctaga tccttttcac gtagaaagcc agtccgcaga aacggtgctg	2820
accccgatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag	2880
aaagcaggta gcttgcaagt ggcttacatg gcgatagcta gactgggcgg ttttatggac	2940
agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt aaggttggga agccctgcaa	3000
agtaaaactg atggctttct cgcgcccaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga	3060
tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc	3120
tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg	3180
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac	3240
cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc	3300
cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg	3360
gctgctattg ggcgaagtgc cggggcaggga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga	3420
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg	3480
ccatttcgac caccaagcga aacatcgcac cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg	3540
tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcacagggg ctgcgccag ccgaactgtt	3600
cgccaggctc aaggcgagca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc	3660

ES 2 663 480 T3

```

ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 3720
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 3780
gcttgccggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc 3840
gcagcgcata gccttctatc gccttcttga cgagtcttct tgaattatta acgcttacia 3900
tttctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatacaggt 3960
ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca 4020
aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata gcacgtgagg 4080
agggccacca tggccaagtt gaccagtgcc gttccgggtc tcaccgcgcg cgacgtcgcc 4140
ggagcggctg agttctggac cgaccggctc gggttctccc gggacttcgt ggagacgac 4200
ttcgccgggt tgggtccgga cgacgtgacc ctgttcatca gcgcggtcca ggaccagggt 4260
gtgccggaca acaccctggc ctgggtgtgg gtgcgcggcc tggacgagct gtacgccgag 4320
tggtcggagg tcgtgtccac gaacttcggg gacgcctccg ggccggccat gaccgagatc 4380
ggcgagcagc cgtggggggc ggagttcgcc ctgcgcgacc cggccggcaa ctgcgtgcac 4440
ttcgtggccg aggagcagga ctgacacgtg ctaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 4500
taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcggtc 4560
cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 4620
cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg 4680
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 4740
aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 4800
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 4860
tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 4920
acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 4980
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacagggtat 5040
ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 5100
tggtatcttt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 5160
tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 5220
ctgggctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 5280
gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataaccgct gccgcagccg aacgaccgag 5340
cgcagcaggt ca 5352

```

<210> 9

<211> 4847

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..4847

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN365; TOPO-BLUNT-loxP-natMX-loxP" /tipo_mol="ADN no asignado"

5

<400> 9

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat      240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcggatcca      300
ctagtaacgg cgcgcagtgt gctggaattc gcccttatcc ggacgtacgt ataacttcgt      360
atagcataca ttatacgaag ttattctagt aacggccgcc agtgtgctgg aattcgccct      420
taagcttgcc tcgtccccgc cgggtcaccc ggccagcgac atggaggccc agaataccct      480
ccttgacagt cttgacgtgc gcagctcagg ggcagtgatg gactgtcgcc cgtacattta      540
gcccatacat ccccatgtat aatcatttgc atccatacat ttgatggcc gcacggcgcg      600
aagcaaaaat tacggctcct cgctgcagac ctgcgagcag ggaaacgctc ccctcacaga      660
cgcgttgaat tgtccccacg ccgcgcccct gtagagaaat ataaaagggt aggatttgcc      720
actgagggtt ttctttcata tacttccttt taaaatcttg ctaggatata gttctcacat      780
cacatccgaa cataaacaac catgtaaaat gaccactctt gacgacacgg cttaccggta      840
ccgcaccagt gtcccggggg acgcccaggc catcgaggca ctggatgggt ccttcaccac      900
cgacaccgtc ttccgcgtca ccgccaccgg ggacggcttc accctgcggg aggtgcgggt      960
ggaccggccc ctgaccaagg tgttccccga cgacgaatcg gacgacgaat cggacgcccg      1020
ggaggacggc gaccgggact ccgggacgtt cgtcgcgtag ggggacgacg gcgacctggc      1080
gggcttcgtg gtcgtctcgt actccggtg gaaccggcgg ctgaccgtcg aggacatcga      1140
ggtcgccccg gagcaccggg ggcacggggg cgggcgcgcg ttgatggggc tcgcgacgga      1200
gttcgccccg gagcggggcg ccggggcacc ctggctggag gtcaccaacg tcaacgcacc      1260
ggcgatccac gcgtaccggc ggatgggggt caccctctgc ggcctggaca ccgccctgta      1320
cgacggcacc gcctcggaag gcgagcaggc gctctacatg agcatgccct gccctagta      1380
ctgacaataa aaagattctt gttttcaaga acttgtcatt tgtatagttt ttttatattg      1440
tagttgttct attttaatca aatgttagcg tgatttatat tttttttcgc ctcgacatca      1500
tctgcccaga tgcgaagtta agtgcgcaga aagtaatatc atgcgtcaat cgtatgtgaa      1560
tgctggtcgc tatactgctg tcgattcgat actaacgccg ccatccagtg tcgacgatat      1620

```

ES 2 663 480 T3

ctagagcgcg cataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttataggcc tcgagacgtc	1680
atgaaagggc gaattctgag atatccatca cactggcggc cgctcgagca tgcattctaga	1740
gggccaatt cgccctatag tgagtcgtat tacaattcac tggccgtcgt ttacaacgt	1800
cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc	1860
gccagctggc gtaatagcga agaggcccg accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc	1920
ctatacgtag ggcagtttaa ggtttacacc tataaaagag agagccgtta tcgtctgttt	1980
gtggatgtac agagtgatat tattgacacg ccggggcgac ggatggtgat ccccctggcc	2040
agtgcacgtc tgctgtcaga taaagtctcc cgtgaacttt acccggtggt gcatatcggg	2100
gatgaaagct ggcgcagat gaccaccgat atggccagtg tgccggtctc cgttatcggg	2160
gaagaagtgg ctgatctcag ccaccgcgaa aatgacatca aaaacgccat taacctgatg	2220
ttctggggaa tataaatgtc aggcattgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctgattcctt	2280
ttcacgtaga aagccagtc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg	2340
gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt	2400
acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct	2460
ggggcgccct ctggttaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttctcgccg	2520
ccaaggatct gatggcgag gggatcaagc tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt	2580
cgcattgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttggtt ggagaggcta	2640
ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg	2700
tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa	2760
ctgcaagaag aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct	2820
gtgctcgagc ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg	2880
caggatctcc tgcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca	2940
atgcggcggc tgcatacgct tgatccggt acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat	3000
cgcattcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac	3060
gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgccc	3120
gacggcgagg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa	3180
aatggccgct tttctggatt catcgactgt gcccggtcgg gtgtggcgga ccgctatcag	3240
gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc	3300
ttcctcgtgc tttacgggat cgccgctccc gattcgagc gcacgcctt ctatcgctt	3360
cttgacgagt tcttctgaat tattaacgt tacaatttcc tgatgcggta ttttctcctt	3420
acgcattctgt gcggtatttc acaccgcata caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg	3480

ES 2 663 480 T3

```

gaaccacctat ttgtttatTT ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat 3540
aaccctgata aatgcttcaa taatagcacg tgaggagggc caccatggcc aagttgacca 3600
gtgccgttcc ggtgctcacc gcgcgcgacg tcgccggagc ggtcgagtcc tggaccgacc 3660
ggctcggggt ctcgccggac ttctgtggagg acgacttcgc cgggtgtggc cgggacgacg 3720
tgacctgtt catcagcgcg gtccaggacc aggtggtgcc ggacaacacc ctggcctggg 3780
tgtgggtgcg cggcctggac gagctgtacg ccgagtggtc ggaggtcgtg tccacgaact 3840
tcggggacgc ctcggggccg gccatgaccg agatcggcga gcagccgtgg gggcgggagt 3900
tcgccctgcg cgaccgggcc ggcaactgcg tgcacttcgt ggccgaggag caggactgac 3960
acgtgctaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc 4020
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 4080
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia 4140
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 4200
cgaaggtaac tggtttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 4260
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaattc 4320
tgttaccagt ggtgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 4380
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 4440
gcttgagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 4500
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 4560
gagagcgcac gaggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 4620
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 4680
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggg cttttgctgg ccttttgctc 4740
acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 4800
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtca 4847

```

<210> 10

<211> 32

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10

<222> 1..32

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 115-natf" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 10

acatgtaaaa tgaccactct tgacgacacg gc 32

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 116-natr" /tipo_mol="ADN no asignado"
 10
 <400> 11
 cagtactagg ggccaggga tgctc 25
 <210> 12
 15 <211> 4254
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..4254
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN447; TOPO-BLUNT-loxP-zeoMX-loxP" /tipo_mol="ADN no asignado"
 25 <400> 12

ES 2 663 480 T3

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat	240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcggtacca	300
ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttatcc ggacgtacgt ataacttcgt	360
atagcataca ttatacgaag ttattctagt aacggccgcc agtgtgctgg aattcgccct	420
taagcttgcc tcgtccccgc cgggtcaccc ggccagcgac atggaggccc agaataccct	480
ccttgacagt cttgacgtgc gcagctcagg ggcagtgatg gactgtcgcc cgtacattta	540
gcccatacat ccccatgtat aatcatttgc atccatacat ttgatggcc gcacggcgcg	600
aagcaaaaat tacggctcct cgtgcagac ctgcgagcag ggaaacgctc ccctcacaga	660
cgcgttgaat tgtccccacg ccgcgcccct gtagagaaat ataaaaggtt aggatttgcc	720
actgagggtc ttctttcata tacttccttt taaaatcttg ctaggataca gttctcacat	780
cacatccgaa cataaacaac catggccaag ttgaccagtg ccgttccggt gctcaccgcg	840
cgcgacgtcg ccggagcggc cgagttcttg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc	900
gtggaggacg acttcgccgg tgtggtccgg gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc	960
caggaccagg tgggtgccga caacaccctg gcctgggtgt ggggtgcgcgg cctggacgag	1020

ES 2 663 480 T3

ctgtacgccg	agtggtcgga	ggtcgtgtcc	acgaacttcc	gggacgcctc	cgggccggcc	1080
atgaccgaga	tcggcgagca	gccgtggggg	cgggagttcg	ccctgcgcga	cccggccggc	1140
aactgcgtgc	acttcgtggc	cgaggagcag	gactgacaca	ctgacaataa	aaagattctt	1200
gttttcaaga	acttgtcatt	tgtatagttt	ttttatattg	tagttgttct	attttaatca	1260
aatgttagcg	tgatttatat	tttttttcgc	ctcgacatca	tctgcccaga	tgcgaaagtta	1320
agtgcgcaga	aagtaatatc	atgcgtcaat	cgtatgtgaa	tgctggtcgc	tatactgctg	1380
tcgattcgat	actaacgccg	ccatccagtg	tcgacgatat	ctagagcgcg	cataacttcg	1440
tataatgtat	gctatacgaa	gttataggcc	tcgagacgtc	atgaaagggc	gaattctgag	1500
atatccatca	cactggcggc	cgctcgagca	tgcatctaga	gggccaatt	cgccctatag	1560
tgagtcgtat	tacaattcac	tgcccgtcgt	tttacaacgt	cgtgactggg	aaaaccctgg	1620
cgttaccocaa	cttaatcgcc	ttgcagcaca	tcccccttcc	gccagctggc	gtaatagcga	1680
agaggccdcg	accgatcgcc	cttcccaaca	gttgcgcagc	ctatacgtac	ggcagtttaa	1740
ggtttacacc	tataaaagag	agagccgtta	tcgtctgttt	gtggatgtac	agagtgatat	1800
tattgacacg	ccggggcgac	ggatggtgat	ccccctggcc	agtgcacgtc	tgctgtcaga	1860
taaagtctcc	cgtgaacttt	accgggtggt	gcatactggg	gatgaaagct	ggcgcatgat	1920
gaccacgat	atggccagtg	tgccggtctc	cgttatcggg	gaagaagtgg	ctgatctcag	1980
ccaccgcgaa	aatgacatca	aaaacgccat	taacctgatg	ttctggggaa	tataaatgtc	2040
aggcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttcacgtaga	aagccagtcc	2100
gcagaaaacg	tgctgacccc	ggatgaatgt	cagctactgg	gctatctgga	caagggaana	2160
cgcaagcgca	aagagaaaag	aggtagcttg	cagtgggctt	acatggcgat	agctagactg	2220
ggcgggtttta	tggacagcaa	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	ctggttaaggt	2280
tgggaagccc	tgcaaagtaa	actggatggc	tttctcggcg	ccaaggatct	gatggcgag	2340
gggatcaagc	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	cgcattgattg	aacaagatgg	2400
attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttggtg	ggagaggcta	ttcggtatg	actgggcaca	2460
acagacaatc	ggctgctctg	atgccgcggt	gttcgggctg	tcagcgagag	ggcgcccggg	2520
tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccggtgc	cctgaatgaa	ctgcaagacg	aggcagcgcg	2580
gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	gtgctcgacg	ttgtcactga	2640
agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgcggggg	caggatctcc	tgtcatctca	2700
ccttgctcct	gccgagaaaag	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	tgcatacgct	2760
tgatccggct	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaacat	cgcacgagc	gagcacgtac	2820
tcggatggaa	gccggtcttg	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	aggggctcgc	2880
gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gagcatgccc	gacggcgagg	atctcgtcgt	2940

ES 2 663 480 T3

```

gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 3000
catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg 3060
tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 3120
cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgaat 3180
tattaacgct tacaatttcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 3240
acaccgcata caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt 3300
ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa 3360
taatagcacg tgctaaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt 3420
gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 3480
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgccgcgtaat ctgctgcttg 3540
caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttggttgc cggatcaaga gctaccaact 3600
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt 3660
tagccgtagt tagggcacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgcctcg 3720
ctaactcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 3780
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 3840
cagcccagct tggagcgaaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 3900
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaa cggcagggtc 3960
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaacg cctggtatct ttatagtcct 4020
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg 4080
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctgggctt ttgctggcct 4140
tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc 4200
tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtca 4254

```

<210> 13

<211> 45

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..45

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 28-H3f" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 13

tgatcatccg gaattctaga ttggtgagcg ctaggagtca ctgcc 45

15

<210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 29-H3r" /tipo_mol="ADN no asignado"
 10
 <400> 14
 ctcgagtatt tcacaccgca tatgatccgt cg 32
 <210> 15
 15 <211> 6000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..6000
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN247 (TOPO- BLUNT-HIS3::loxPkanMXloxP)"
 /tipo_mol="ADN no asignado"
 25 <400> 15

ES 2 663 480 T3

ggccgccaga ttttccggat ggctcgagtt tttcagcaag atcgcgagta tttcacaccg	60
catatgatcc gtcgagttca agagaaaaaa aaagaaaaag caaaaagaaa aaaggaaagc	120
gcgcctcggt cagaatgaca cgtatagaat gatgcattac cttgtcatct tcagtatcat	180
actgttcgta tacatactta ctgacattca taggtataca tatatacaca tgtatatata	240
tcgtatgctg cagctttaa taatcgggtg cactacataa gaacaccttt ggtggaggga	300
acatcggttg taccattggg cgaggtggct tctcttatgg caaccgcaag agccttgaac	360
gcactctcac tacgggtgatg atcattcttg cctcgagac aatcaacgtg gagggtaatt	420
ctgctagcct ctgcaaagct ttcaagaaaa tgcgggatca tctcgcaaga gagatctcct	480
actttctccc ttgcaaacc aagttcgaca actgcgtacg tataacttcg tatagcatac	540
attatacgaa gttattctag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc ttaagcttgc	600
ctcgtccccg ccgggtcacc cggccagcga catggaggcc cagaataccc tccttgacag	660
tcttgacgtg cgcagctcag gggcatgatg tgactgtcgc ccgtacattt agcccataca	720
tccccatgta taatcatttg catccataca ttttgatggc cgcacggcgc gaagcaaaaa	780
ttacggctcc tcgctgcaga cctgcgagca gggaaacgct cccctcacag acgcgttgaa	840
ttgtccccac gccgcgcccc tgtagagaaa tataaaagggt taggatttgc cactgagggt	900
cttctttcat atacttcctt ttaaaatctt gctaggatac agttctcaca tcacatccga	960
acataaacia ccatgggtaa ggaaaagact cacgtttcga ggccgcgatt aaattccaac	1020
atggatgctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata atgtcgggca atcagggtgcg	1080

ES 2 663 480 T3

acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa	1140
ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac taaactggct gacggaattt	1200
atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc	1260
actgcgatcc ccggcaaaac agcattccag gtattagaag aatatcctga ttcaggtgaa	1320
aatattgttg atgcgctggc agtgttcctg cgcgggttg attcgattcc tgtttgtaat	1380
tgtcctttta acagcgatcg cgtatttcgt ctgcgtcagg cgcaatcacg aatgaataac	1440
ggtttggttg atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc	1500
tggaaagaaa tgcataagct tttgccattc tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat	1560
ttctcacttg ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa taggttgat tgatgttga	1620
cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat cttgccatcc tatggaactg cctcggtgag	1680
ttttctcctt cattacagaa acggcttttt caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg	1740
aataaattgc agtttcattt gatgctcgat gagtttttct aatcagtact gacaataaaa	1800
agattcttgt tttcaagaac ttgtcatttg tatagttttt ttatatgtga gttgttctat	1860
tttaatcaaa tgttagcgtg atttatatat tttttcgcct cgacatcatc tgcccagatg	1920
cgaagttaag tgcgcagaaa gtaatatcat gcgtcaatcg tatgtgaatg ctggctcgta	1980
tactgctgtc gattcgatac taacgccgcc atccagtgtc gacgatatct agagcgcgca	2040
taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tataggaaag agatcgcaat ctgaatcttg	2100
gtttcatttg taatacgctt tactagggct ttctgctctg tcactcttgc cttcgtttat	2160
cttgcctgct catttttttag tatattcttc gaagaaatca cattacttta tataatgtat	2220
aattcattat gtgataatgc caatcgctaa gaaaaaaaa gagtcatccg ctaggtggaa	2280
aaaaaaaaat gaaatcatt accgaggcat aaaaaatat agagtgtact agaggaggcc	2340
aagagtaata gaaaaagaaa attgcgggaa aggactgtgt tatgacttcc ctgactaatg	2400
ccgtgttcaa acgatacctg gcagtgactc ctagcgctca ccaatctaga attccggatg	2460
tacaatcttt ctagaagatc tcctacaata ttctcagctg ctttaagggcg aattctgaga	2520
tatccatcac actggcggcc gctcgagcat gcatctagag ggccaattc gccctatagt	2580
gagtcgtatt acaattcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc	2640
gttaccacac ttaatcgctt tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa	2700
gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tatacgtacg gcagtttaag	2760
gtttacacct ataaaagaga gagccgttat cgtctgtttg tggatgtaca gagtgatatt	2820
attgacacgc cggggcgacg gatggatgat cccctggcca gtgcacgtct gctgtcagat	2880
aaagtctccc gtgaacttta cccgggtgtg catatcgggg atgaaagctg gcgcatgatg	2940

ES 2 663 480 T3

accaccgata	tggccagtgt	gccggtctcc	gttatcgggg	aagaagtggc	tgatctcagc	3000
caccgcgaaa	atgacatcaa	aaacgccatt	aacctgatgt	tctggggaat	ataaatgtca	3060
ggcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	tcacgtagaa	agccagtcgg	3120
cagaaaacgt	gctgaccccg	gatgaatgtc	agctactggg	ctatctggac	aagggaanaa	3180
gcaagcgcaa	agagaaaagc	ggtagcttgc	agtgggctta	catggcgata	gctagactgg	3240
gcggttttat	ggacagcaag	cgaaccggaa	ttgccagctg	gggcgccttc	tggttaagggt	3300
gggaagccct	gcaaagtaaa	ctggatggct	ttctcgcgcg	caaggatctg	atggcgaggg	3360
ggatcaagct	ctgatcaaga	gacaggatga	ggatcgtttc	gcatgattga	acaagatgga	3420
ttgcacgcag	gttctccggc	cgcttggttg	gagaggctat	tcggctatga	ctgggcacaa	3480
cagacaatcg	gctgctctga	tgccgccttg	ttccggctgt	cagcgagggg	gcgcccgggt	3540
ctttttgtca	agaccgacct	gtccgggtgc	ctgaatgaac	tgcaagacga	ggcagcgccg	3600
ctatcgtggc	tggccacgac	ggcggttcc	tgccgagctg	tgctcgacgt	tgtcactgaa	3660
gcgggaaggg	actggctgct	attgggcgaa	gtgccggggc	aggatctcct	gtcatctcac	3720
cttgctcctg	ccgagaaaag	atccatcatg	gctgatgcaa	tgccggggct	gcatacgcct	3780
gatccggcta	cctgccatt	cgaaccacaa	gcgaaacatc	gcatcgagcg	agcacgtact	3840
cggatggaag	ccggtcttgt	cgatcaggat	gatctggacg	aagagcatca	ggggctcgcg	3900
ccagccgaac	tggttcgccag	gctcaaggcg	agcatgcccg	acggcgagga	tctcgtcgtg	3960
acccatggcg	atgcctgctt	gccgaatata	atggtggaaa	atggccgctt	ttctggattc	4020
atcgactgtg	gccggctggg	tgtggcgagc	cgtatcagg	acatagcgtt	ggctaccctg	4080
gatattgctg	aagagcttgg	cggcgaatgg	gctgaccgct	tcctcgtgct	ttacgggtatc	4140
gccgctcccg	attcgacgag	catcgcttcc	tatcgcttcc	ttgacgagtt	cttctgaatt	4200
attaacgcct	acaatttcc	gatgcggtat	ttctctctta	cgcactctgt	cggatatttca	4260
caccgcatac	aggtggcaact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatatt	4320
tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	acctgataa	atgcttcaat	4380
aatagcacgt	gaggaggggc	accatggcca	agttgaccag	tgccgttccg	gtgctcaccg	4440
cgcgcgacgt	cgcgggagcg	gtcgagttct	ggaccgaccg	gctcgggttc	tccggggact	4500
tcgtggagga	cgacttcgcc	ggtgtggtcc	gggacgacgt	gacctgttc	atcagcgcg	4560
tccaggacca	ggtggtgccg	gacaacaccc	tggcctgggt	gtgggtgcgc	ggcctggacg	4620
agctgtacgc	cgaagtgtcg	gaggtcgtgt	ccacgaactt	ccgggacgcc	tccgggccc	4680
ccatgaccga	gatcggcgag	cagccgtggg	ggcgggagtt	cgcctgcgc	gaccgggccc	4740
gcaactcgtg	gcacttcgtg	gccgaggagc	aggactgaca	cgtgctaaaa	cttcattttt	4800
aattttaaag	gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	4860

ES 2 663 480 T3

gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 4920
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 4980
tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 5040
gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 5100
actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagtg gctgctgcca 5160
gtggcgataa gtctgtctct accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 5220
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca 5280
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa 5340
aggcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacag agagcgcacg agggagcttc 5400
cagggggaaa cgctgtgtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 5460
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 5520
cctttttacg gttcctgggc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 5580
ccccgtattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagt agctgatacc gctcgcgcga 5640
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 5700
ttggccgatt cattaatgca gctggcacga cagggttccc gactggaaag cgggcagtga 5760
gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggctt tacactttat 5820
gcttcgggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag 5880
ctatgaccat gattacgcca agctatttag gtgacactat agaatactca agctatgcat 5940
caagcttggt accgagctcg gatccactag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc 6000

<210> 16

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..35

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 201-Hx2uf" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 16

gactagtacc ggtgtttca aaacctagca acccc 35

15

<210> 17

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..43

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 202-Hx2ur" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 17

10 cgtacgcgtc ttccggaagg gtaccatcag atttcattg acc 43

<210> 18

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<222> 1..40

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 203-Hx2df" /tipo_mol="ADN no asignado"

20 <400> 18

gaagacactc gagacgtcct ttgtctgtga aaccaagggc 40

<210> 19

25 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

<222> 1..39

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 204-Hx2dr" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 19

35 gtcgacgggc ccttatgttg gtcttgttta gtatggccg 39

<210> 20

<211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..48
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 205-Hx3uf" /tipo_mol="ADN no asignado"

10 <400> 20
 aagcggccgc actagtaccg gtgaacaac tcaataacga tgtgggac 48

<210> 21
 <211> 38

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

20 <222> 1..38
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 206-
 Hx3urATCCGGACGTCTTCCTCAAGAAATCAGTTTGGGCGACG" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 21

25 atccggacgt cttcctcaag aaatcagttt gggcgacg 38

<210> 22
 <211> 44
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..44

35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 210-Hx4df" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 22

ES 2 663 480 T3

agaagacgct cgagacgtcc cttatgggaa gaagggtgtt tgcc 44

<210> 23

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..34

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 211-Hx4dr" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 23

atggatccta ggggttcttg cagagtaaac tgcg 34

15

<210> 24

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<222> 1..46

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 212-Hx5uf" /tipo_mol="ADN no asignado"

25

<400> 24

aagcggccgc actagtacat gtgaactga aaacgctcat caaggc 46

<210> 25

30 <211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

<222> 1..43

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 213-Hx5ur" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 25
 ttctgacgcg tcttccggag taacatgaaa ccagagtacc acg 43

5 <210> 26
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..42
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 229-Hx7df" /tipo_mol="ADN no asignado"

15 <400> 26
 agaagaccct cgagacgtcc gacgctgaag aaatgactca cg 42

20 <210> 27
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..42
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 230-Hx7dr" /tipo_mol="ADN no asignado"

30 <400> 27
 agtcgacgga tccgtaattt ttcttctttt aagtgacggg cg 42

35 <210> 28
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..44

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 243-Gal2ufn" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 28

aagcggccgc actagtaccg gtgatctata ttcgaaaggg gcgg 44

5

<210> 29

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<222> 1..43

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 244-Gal2urn" /tipo_mol="ADN no asignado"

15

<400> 29

aacgtacgc cgatcatta gaatacttt gagattgtgc gct 43

<210> 30

20

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<221> fuente

<222> 1..43

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 233-Ga2df" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 30

30

agaagaccct cgagacgtct tacctggaa atctgaaggc tgg 43

<210> 31

<211> 36

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 234-Ga2dr" /tipo_mol="ADN no asignado"

5 <400> 31
 gtggatccta ggtaaaacgg tacgagaaaa gctccg 36

<210> 32
 <211> 5959
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <222> 1..5959
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN485; TOPO-BLUNT-GAL2::loxPzeoMXloxP"
 /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 32
 20

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 acgacagggt tcccgaactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
 tcaactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180

ES 2 663 480 T3

ttgtgagcgg	ataacaat	ttt	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaaagctat	240
ttaggtgaca	ctatagaata	ctcaagctat	gcatcaagct	tggtaccgag	ctcggatcca		300
ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	gcccttgtgg	atcctaggaa	tggtatgatg		360
taaaacggta	cgagaaaagc	tccgagacgt	tgaattgaat	attaataggt	tgcaggttga		420
tataaaagaa	ataaaggaaa	tgcttgttac	actgataaac	aaatgactga	aaaaagcaac		480
tcctggatcg	ttcgaacatt	ctcactccat	taattgtatg	ttagctcagg	aattcaactg		540
gaagaaagtc	caggcaagta	cctgacttat	tttctagagg	acccccaga	gataagtctg		600
gtgatgtggt	cotttaataa	tttcataggg	acaattcatt	ttgcgttttt	aattttgctc		660
ggtgaacaaa	ggatggcaga	gcatgttata	gttttctttt	ttttttcctg	tttttagagaa		720
aaaggttata	tatgtaataa	tactctgata	tatgtacaca	aataataggt	ttaggtaagg		780
aatttatata	atcgtaagga	tatcattgat	aagggaatt	tttttttttt	tttttcaaac		840
aaatactatg	ataattaaaa	tgaagaaaaa	acgtcagtca	tgaaaaatta	agagagatga		900
tggagcgtct	cacttcaaac	gcattattct	agcatggcct	tgtaccacgg	tttgtcgtca		960
tgttgtaaat	cctctaaatc	gtaattatta	cctcttctgg	atgaaggaat	ccagccttca		1020
gattttccaa	gtaagacgtc	tcgaggccta	taacttcgta	tagcatacat	tatacgaagt		1080
tatgcgcgct	ctagatatcg	tcgacactgg	atggcggcgt	tagtatcgaa	tcgacagcag		1140
tatagcgacc	agcattcaca	tacgattgac	gcatgatatt	actttctgcg	cacttaactt		1200
cgcactctgg	cagatgatgt	cgaggcgaaa	aaaaatataa	atcacgctaa	catttgatta		1260
aaatagaaca	actacaatat	aaaaaaacta	tacaaatgac	aagttcttga	aaacaagaat		1320
ctttttattg	tcagtgtgtc	agtcctgtct	ctcggccacg	aagtgcacgc	agttgccggc		1380
cgggtcgcgc	agggcgaaact	cccgcccca	cggctgtctg	ccgatctcgg	tcatggccgg		1440
cccgaggcgc	tcccggaagt	tcgtggacac	gacctccgac	cactcggcgt	acagctcgtc		1500
caggccgcgc	accacacccc	aggccagggt	gttgtccggc	accacctggg	cctggaccgc		1560
gctgatgaac	agggtcacgt	cgtcccggac	cacaccggcg	aagtctgtct	ccacgaagtc		1620
ccgggagaac	ccgagccggt	cgggtccagaa	ctcgaccgct	ccggcgacgt	cgcgcgcggt		1680
gagcacccga	acggcactgg	tcaacttggc	catggttgtt	tatgttcgga	tgtgatgtga		1740
gaactgtatc	ctagcaagat	tttaaaagga	agtatatgaa	agaagaacct	cagtggcaaa		1800
tcctaaccct	ttatatttct	ctacaggggc	gcggcgtggg	gacaattcaa	cgcgtctgtg		1860
aggggagcgt	ttccctgtct	gcaggtctgc	agcgaggagc	cgtaatTTTT	gcttcgcgcc		1920
gtgcggccat	caaaatgtat	ggatgcaaat	gattatacat	ggggatgtat	gggctaaatg		1980
tacgggcgac	agtcacatca	tgcctctgag	ctgcgcacgt	caagactgtc	aaggagggtta		2040
ttctgggcct	ccatgtcgtc	ggccgggtga	cccgccgggg	acgaggcaag	cttaaggggc		2100

ES 2 663 480 T3

aattccagca cactggcggc cgttactaga ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag	2160
ttatacgtac gtccggatca ttagaatact tttgagattg tgcgcttaa tgggaatctt	2220
tactgagtga agagatcacg tcttcaccag cttgggggtg ctgtgaaaca acaggcatat	2280
tgttctcctc aactgccatt atgaaagaat tatttttttt attatgttaa tcttgtgttt	2340
acttaactat tactattctt gatgataatt gaataagggtg cataatgaag agcaattcac	2400
aacaccaaatt tttcaatcca attactgatt gtttatatat gtctacaaa cttatcctat	2460
ctccacattt tagcctgcga aatgtttgtt ttttgaacaa tagctctcca gaatgttgta	2520
taattttaaga atatgtgcac agttaacttt ctagcaggag tataatgcca tttgctcccc	2580
atcttgagat ggggaagggt taactaatct cggttcggag tgatccgccc cgatactgcc	2640
ttctgcctta atatcgtcca aggcacatgg acccctgaac ggcgcagata tctccgcacg	2700
gacgaaagac cgccggtgcc ttcctgaggc aaccgcccct ttcgaatata gatcaccggt	2760
actagtgcgg ccgcttaagg gcgaattctg cagatatcca tcacactggc ggccgctcga	2820
gcatgcatct agagggccca attcgcctta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt	2880
cgttttacia cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc	2940
acatccccct ttcgccagct ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca	3000
acagttgcgc agcctatacg tacggcagtt taagggttac acctataaaa gagagagccg	3060
ttatcgtctg tttgtggatg tacagagtga tattattgac acgccggggc gacggatggt	3120
gatccccctg gccagtgcac gtctgctgtc agataaagtc tcccgtgaac tttaccgggt	3180
ggtgcatatc ggggatgaaa gctggcgcat gatgaccacc gatatggcca gtgtgccggt	3240
ctccgttatc ggggaagaag tggctgatct cagccaccgc gaaaatgaca tcaaaaacgc	3300
cattaacctg atgttctggg gaataataat gtcaggcatg agattatcaa aaaggatctt	3360
cacctagatc cttttcacgt agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa	3420
tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc	3480
ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc	3540
ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat	3600
ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgatc aagagacagg	3660
atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg	3720
ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc	3780
cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg	3840
tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt	3900
tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg	3960

ES 2 663 480 T3

cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	4020
catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	4080
ccaagcga	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	4140
ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	4200
ggcgagcatg	cccgaaggcg	aggatctcgt	cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	4260
tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	4320
ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	4380
atgggctgac	cgttctctcg	tgttttacgg	tatcgccgct	ccgattcgc	agcgcatcgc	4440
cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	aattattaac	gcttacaatt	tcctgatgcg	4500
gtattttctc	cttacgcatac	tgtgcggtat	ttcacaccgc	atacaggtgg	cacttttccg	4560
ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	4620
ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatagc	acgtgaggag	ggccaccatg	4680
gccaagttag	ccagtgcctg	tccgggtgctc	accgcgcgcg	acgtcgccgg	agcggtcgag	4740
ttctggaccg	accggctcgg	gttctcccgg	gacttcgtgg	aggacgactt	cgcgggtgtg	4800
gtccgggacg	acgtgaccct	gttcatacagc	gcgggtccagg	accaggtggt	gccggacaac	4860
accctggcct	gggtgtgggt	gcgcggcctg	gacgagctgt	acgccgagtg	gtcggagggtc	4920
gtgtccacga	acttcoggga	cgcctccggg	ccggccatga	ccgagatcgg	cgagcagccg	4980
tggggcgggg	agttcgccct	gcgcgacccg	gccggcaact	gcgtgcactt	cgtggccgag	5040
gagcaggact	gacacgtgct	aaaaattcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	5100
ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcggtcca	ctgagcgtca	5160
gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	5220
tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	gcgggtggtt	gtttgccgga	tcaagagcta	5280
ccaactcttt	ttccgaagg	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	5340
ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	5400
gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	5460
ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgcagcgg	cgggctgaac	gggggggttcg	5520
tgcacacagc	ccagcttgga	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	5580
ctatgagaaa	gcgccacgct	tccgaagg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggttaagcggc	5640
agggtcggaa	caggagagcg	cacgagggag	cttcaggggg	gaaacgcctg	gtatctttat	5700
agtcctgtcg	ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	5760
gggcggagcc	tatggaaaaa	cgcagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	gggcttttgc	5820
tggccttttg	ctcacatggt	ctttctcgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	5880
accgcctttg	agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcaggtca	5940
gtgagcgagg	aagcggaag					5959

<210> 33

5

<211> 6384

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..6384

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN566; TOPO-BLUNT-HXT367::loxP-hphMX-loxP"
/tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 33

10

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat      240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcggatcca      300
ctagtaccgg tgaacaact caataacgat gtgggacatt gggggccac tcaaaaaatc      360
tgaggactat atcccagag aatttctcca gaagagaaga aaagtcaaag ttttttttcg      420
cttgggggtt gcatataaat acaggcgtg ttttatcttc agcatgaata ttccataatt      480
ttacttaata gcttttcata aataatagaa tcacaaacaa aatttacatc tgagttaaac      540
aatcatgaat tcaactccag atttaatatc tcacaaaag tcaagtgaga attcgaatgc      600
tgacctgcct tcgaatagct ctgagtaat gaacatgcct gaagaaaaag gtgttcaaga      660
tgatttccaa gctgaggccg accaagtact taccaaccca aatacaggta aagggtcata      720
tgtcaactgt tctatctgtt gtgttatggt tgccctcggt ggtttcggtt tcggttggga      780
tactggtacc atttctggtt tcgtcgccca aactgatttc ttgaggaaga cgtccggacg      840
tacgtataac ttcgtatagc atacattata cgaagttatt ctagtaacgg ccgccagtgt      900
gctggaattc gcccttaagc ttgcctcgtc cccgccgggt caccggcca gcgacatgga      960
ggcccagaat accctccttg acagtcttga cgtgcgcagc tcaggggcat gatgtgactg     1020
tcgcccgtac atttagccca tacatcccca tgtataatca ttgcatcca tacattttga     1080
tgccgcacg gcggaagca aaaattacgg ctccctcgctg cagacctgcg agcagggaaa     1140
cgctcccctc acagacggt gaattgtccc cagccgcgc ccctgtagag aaatataaaa     1200
ggttaggatt tgccactgag gttcttcttt catatacttc cttttaaaat cttgctagga     1260
tacagttctc acatcacatc cgaacataaa caaccatggg taaaaagcct gaactcaccg     1320

```

ES 2 663 480 T3

cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	cgtctccgac	ctgatgcagc	1380
tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	aggagggcgt	ggatatgtcc	1440
tgcgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	ttatgtttat	cggcactttg	1500
catcgccgc	gtcccgatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	ggaattcagc	gagagcctga	1560
cctattgcat	ctcccgccgt	gcacagggtg	tcacgttgca	agacctgcct	gaaaccgaac	1620
tgcccgctgt	tctgcagccg	gtcgcggagg	ccatggatgc	gatcgctgcg	gccgatctta	1680
gccagacgag	cggtttcggc	ccattcggac	cgcaaggaat	cggccaatac	actacatggc	1740
gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	ctggcaaact	gtgatggacg	1800
acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgcaggctc	tcgatgagct	gatgcttttg	gccgaggact	1860
gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atttcggctc	caacaatgtc	ctgacggaca	1920
atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	gttcggggat	tcccaatacg	1980
aggtcgcaa	catctttctc	tggaggccgt	ggttggcttg	tatggagcag	cagacgcgct	2040
acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgacg	gatcgccgcg	gctccggggc	tatatgctcc	2100
gcatttggct	tgaccaactc	tatcagagct	tgttgacgg	caatttcgat	gatgcagctt	2160
gggcgcaggg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	cgggactgtc	gggcgtacac	2220
aaatcgccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	tgtagaagta	ctcgcgcgata	2280
gtggaaaacc	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaagga	ataatcagta	ctgacaataa	2340
aaagattctt	gttttcaaga	acttgtcatt	tgtatagttt	ttttatattg	tagttgttct	2400
attttaata	aatgttagcg	tgatttatat	tttttttcgc	ctcgacatca	tctgcccaga	2460
tgcgaaagta	agtgcgcaga	aagtaatatc	atgcgtcaat	cgtatgtgaa	tgctggctgc	2520
tatactgctg	tcgattcgat	actaacgcgc	ccatccagtg	tcgaaaacga	gctcgaattc	2580
atcgatgata	tccatcacac	tggcggccgc	tcgacgatat	ctagagcgcg	cataacttcg	2640
tataatgtat	gctatacgaa	gttataggcc	tcgagacgtc	cgacgctgaa	gaaatgactc	2700
acgatgacaa	gccattgtac	aagagaatgt	tcagcaccaa	ataatttgcg	aacactttta	2760
ttaattcatg	atcacgctct	aatttgtgca	tttgaaatgt	actctaattc	taattttata	2820
tttttaatga	tatcttgaaa	agtaaatacg	tttttaatat	atacaaaata	atacagttta	2880
attttcaagt	ttttgatcat	ttgttctcag	aaagttgagt	gggacggaga	caaagaaact	2940
ttaaagagaa	atgcaaagtg	ggaagaagtc	agttgtttac	cgaccgcact	gttattcaca	3000
aatattccaa	ttttgcctgc	agaccacgct	ctacaaaatt	tggttagttt	ggtaaatggt	3060
aaggatatag	tagagccttt	ttgaaatggg	aaatatcttc	tttttctgta	tcccgccttc	3120
aaaagtgtct	aatgagtcag	ttatttcttt	cttactcacc	gcccgtcact	taaaagaaga	3180
aaaattacgg	atccgtcgac	taagggcgaa	ttctgcagat	atccatcaca	ctggcggccg	3240

ES 2 663 480 T3

ctcgagcatg catctagagg gcccaattcg ccctatagtg agtcgtatta caattcactg	3300
gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact taatcgctt	3360
gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgac cgatcgccct	3420
toccaacagt tgcgcagcct atacgtacgg cagtttaagg tttaacaccta taaaagagag	3480
agccgttatc gtctgtttgt ggatgtacag agtgatatta ttgacacgcc ggggcgacgg	3540
atgggtgatcc ccttggccag tgcacgtctg ctgtcagata aagtctcccg tgaactttac	3600
ccggtggtgc atatacgggga tgaaagctgg cgcgatgatga ccaccgatat ggccagtgtg	3660
ccggtctccg ttatcgggga agaagtggct gatctcagcc accgcgaaaa tgacatcaaa	3720
aacgccatta acctgatgtt ctggggaata taaatgtcag gcatgagatt atcaaaaagg	3780
atcttcacot agatcctttt cacgtagaaa gccagtcgcg agaaacggtg ctgaccccg	3840
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag	3900
gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctgactggg cggttttatg gacagcaagc	3960
gaaccggaat tgccagctgg ggcgcctctt ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac	4020
tggatggctt tctcgccgcc aaggatctga tggcgacagg gatcaagctc tgatcaagag	4080
acaggatgag gatcgtttct catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc	4140
gcttggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat	4200
gccgcctgtt tccgctgtc agcgacgggg cgcctcggtt tttttgtcaa gaccgacctg	4260
tccggtgccc tgaatgaact gcaagacgag gcagcgccgc tctcgtggct ggccacgacg	4320
ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta	4380
ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta	4440
tccatcatgg ctgatgcaat gggcggtg catagcctt atccggctac ctgccattc	4500
gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc	4560
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gtccgccagg	4620
ctcaaggcga gcatgcccga cggcgaggat ctcgctcgtga cccatggcga tgcctgcttg	4680
ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tgcactgtgg ccggctgggt	4740
gtggcggaac gctatcagga catagcgtt gctaccctg atattgctga agagcttggc	4800
ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttccgacgc	4860
atcgccttct atcgcttct tgacgagttc ttctgaatta ttaacgctta caatttcctg	4920
atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcataca ggtggcactt	4980
ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt	5040
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atagcacgtg aggagggcca	5100

ES 2 663 480 T3

```

ccatggccaa gttgaccagt gccgttccgg tgcacaccgc gcgcgacgtc gccggagcgg 5160
tcgagttctg gaccgaccgg ctccgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg 5220
gtgtggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt ccaggaccag gtggtgccgg 5280
acaacaccct ggctggtgtg tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtgtcgg 5340
aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct ccgggccggc catgaccgag atcggcgagc 5400
agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg caactgcgtg cacttcgtgg 5460
ccgaggagca ggactgacac gtgctaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga 5520
agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag 5580
cgtcagaccc cgtagaaaaa atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 5640
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag 5700
agtaccaaac tctttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 5760
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 5820
acctcgctct gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 5880
ccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 5940
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 6000
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggccgacagg tatccggtaa 6060
gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 6120
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 6180
cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcc gcaacggcg ctttttacgg ttcctgggct 6240
tttctgggcc ttttgcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc 6300
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgacgcg 6360
agtcagttag cgaggaagcg gaag 6384

```

<210> 34

<211> 6073

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10

<222> 1..6073

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN569: TOPO-BLUNT-HXT514::loxP-natMX-loxP"
/tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 34

15

ES 2 663 480 T3

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgettcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagctat      240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcgatcca      300
ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttatgg atcctagggg ttcttgcala      360
gtaaaactcg attcttcaga taaactatcc cgaacatatt gaccactttt caggtaggtc      420
attcaaaget ttttgattga cggtagatca aagttgtgtt ctacgtattt acgtcttttt      480
tgtcgtattt attgatgacc ttttgccatc gttaagtggg gaattcggcc tattcctaac      540
ctcttcacaga actttgaaac aaaaaacata attcaaaatt gtagtttgat aaagtattat      600
ctataaacta ttaaatcata aatatatatt tcatagagcg ttaaaaattg aagatcaaatt      660
attattttta ttcttgaag gaagtctata ttatttaatt aactgaccta cttttttccg      720
aacatcttct tgtaaaatgg ttgatcatca tgcattagat catcagcgtt gtagtcagta      780
cctctcttgt ttggtggaac ccaagaaggt gatttccatg gcaaaacacc ttcttcccat      840
aagggaagtc tcgaggccta taacttcgta tagcatatcat tacaagaagt tatgcgcgct      900
ctagatatcg tcgacactgg atggcggcgt tagtatcgaa tcgacagcag tatagcgacc      960
agcattcaca tacgattgac gcatgatatt actttctcgc cacttaactt cgcactctggg      1020
cagatgatgt cgaggcgaaa aaaaatataa atcacgctaa catttgatta aaatagaaca      1080
actacaatat aaaaaaacta tacaaatgac aagttcttga aaacaagaat cttttttattg      1140
tcagtactag gggcagggca tgctcatgta gagcgcctgc tcgccgtccg aggcgggtgcc      1200
gtcgtacagg gcggtgtcca ggccgcagag ggtgaacccc atccgccggt acgcgtggat      1260
cgccggtgcg ttgacgttgg tgacctccag ccagaggtgc ccggcgcccc gctcgggggc      1320
gaactccgtc gcgagcccca tcaacgcgcg ccgcaccccg tgcccccggt gctccggggc      1380
gacctcgatg tcctcgacgg tcagccggcg gttccagccg gtagtagaga cgaccacgaa      1440
gcccgccagg tcgcgctcgt ccccgtaacg gacgaacgtc cgggagtcgg ggtcgcgctc      1500
ctccccggcg tccgattcgt cgtccgattc gtcgtcgggg aacaccttgg tcaggggcgg      1560
gtccacoggc acctcccgca ggggtgaagcc gtccccgggt gcggtgacgc ggaagacggt      1620
gtcgggtggtg aaggacccat ccagtgcctc gatggcctcg gcgtcccccg ggacactggt      1680
gcggtacggg taagccgtgt cgtcaagagt ggtcatttta catggttggt tatgttcgga      1740
tgtgatgtga gaactgtatc ctagcaagat tttaaaagga agtatatgaa agaagaacct      1800
cagtggaata tcctaacctt ttatatttct ctacaggggc gcggcgtggg gacaattcaa      1860
cgcgctctgt aggggagcgt ttccctgctc gcaggtctgc agcgaggagc cgtaattttt      1920
gcttcgcgcc gtgcggccat caaaatgtat ggatgcaaat gattatacat ggggatgtat      1980
gggctaaatg tacgggcgac agtcacatca tgccctgag ctgcgcacgt caagactgtc      2040

```

aaggagggtta	ttctgggcct	ccatgtcgct	ggccgggtga	cccggcggg	acgaggcaag	2100
cttaaggggcg	aattccagca	cactggcggc	cgttactaga	ataacttcgt	ataatgtatg	2160
ctatacgaag	ttatacgtac	gtccggagta	acatgaaacc	agagtaccac	gcaactgctt	2220
aggcgacact	tcagaaatta	gcataggcgc	caaaactgta	ataccaccaa	cgccagtcct	2280
tgagatgatt	cttccaatga	aattattgata	ccatttgtca	atggaggcga	tttgatgat	2340
gatcccaatt	gagtaaatga	cgacaacagt	catcagacca	atcttacgtc	catacatatc	2400
accgagcttt	gacaaaaacta	tacctccgat	agcgcagccg	atgttgaaaa	tagaaaccat	2460
caaaccgggt	ctgacatcgg	aaagataggt	agtcccgttt	gcacgggtgc	tgccaaatcg	2520
cctaataag	tctgtttgcc	tgacaaaacc	agatatagta	ccagtatccc	acccaaacac	2580
gaaccacca	aaagcaacca	tcaaacagca	gacggataca	aatagtaa	atccgacttcga	2640
tttcttctct	agttggttgt	caacctcctt	ctgaagctct	tccagttcgt	ctttgggagg	2700
gccttcatgg	gaaatgtaac	ttgagacggg	tttagcttgt	gccaaattat	cgttgtaacc	2760
ggcggtagca	ggagcagtcg	agtttcctga	cttctcgttg	tatgagttag	aatttgctgt	2820
cacagtagca	gaccttcca	aggggccttg	atgagcgttt	tcaagttcac	atgtactagt	2880
gcgccgcgtt	aagggcgaat	tctgcagata	tccatcacac	tgccggccgc	tccagcatgc	2940
atctagaggg	cccaattcgc	cctatagtga	gtcgtattac	aattcactgg	cgcgtcgttt	3000
acaacgtcgt	gactgggaaa	accctggcgt	tacccaactt	aatcgccttg	cagcacatcc	3060
ccctttcgc	agctggcgta	atagcgaaga	ggccgcgacc	gatcgcctt	cccaacagtt	3120
gcgcgacct	tacgtacggc	agtttaaggt	ttacacctat	aaaagagaga	gccgttatcg	3180
tctgtttgtg	gatgtacaga	gtgatattat	tgacacgcgc	ggcgacgga	tggtgatccc	3240
cctggccagt	gcacgtctgc	tgtcagataa	agtctccgt	gaactttacc	cgggtgtgca	3300
tatcggggat	gaaagctggc	gcatgatgac	caccgatatg	gccagtgtgc	cggctcctgt	3360
tatcggggaa	gaagtggctg	atctcagcca	ccgcgaaaat	gacatcaaaa	acgccattaa	3420
cctgatgttc	tggggaatat	aaatgtcagg	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcacct	3480
gatccttttc	acgtagaaag	ccagtccgca	gaaacgggtgc	tgaccccgga	tgaatgtcag	3540
ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	aagcgcgaaag	agaaagcagg	tagcttgacg	3600
tggtgcttaca	tggtgatagc	tagactgggc	ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	3660
gccagctggg	gcgccctctg	gtaaggttgg	gaagccctgc	aaagtaaaact	ggatggcttt	3720
ctcgcgcgca	aggatctgat	ggcgagggg	atcaagctct	gatcaagaga	caggatgagg	3780
atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	3840
gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	gacaatcggc	tgtctgatg	cgcctgtgtt	3900
ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	cgggtgcctt	3960

ES 2 663 480 T3

gaatgaactg caagacgagg cagcgcggt atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg	4020
cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc gggaaggagc tggctgctat tgggcgaagt	4080
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgcctcctgc gagaaagtat ccatcatggc	4140
tgatgcaatg cggcggtgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc	4200
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga	4260
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgag	4320
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat	4380
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg	4440
ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc	4500
tgaccgcttc ctctgctttt acggtatcgc cgtcccgat tcgcagcgca tcgccttcta	4560
tcgccttctt gacgagttct tctgaattat taacgcttac aatttcctga tgcggtattt	4620
tctccttaag catctgtgag gtatttcaca ccgcatacag gtggcacttt tcggggaaat	4680
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg	4740
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tagcacgtga ggagggccac catggccaag	4800
ttgaccagtg ccgttcgggt gctcaccgag cgcgacgtcg ccggagcggg cgagttctgg	4860
accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgccgg tgtggtccgg	4920
gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tgggtgccga caacaccctg	4980
gcctgggtgt ggggtgcgag cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga ggtcgtgtcc	5040
acgaacttcc gggagcctc cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg	5100
cgggagttcg ccctgcgca cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag	5160
gactgacagc tgctaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctagtgaa gatcctttt	5220
gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc	5280
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgccgctaata ctgctgcttg	5340
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact	5400
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt	5460
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg	5520
ctaactcctg taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgagc	5580
tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca	5640
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga	5700
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc	5760
ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct	5820
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg	5880
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctgggctt ttgctggcct	5940
tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc	6000
tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgagcga gtcagttagc	6060
gaggaagcgg aag	6073

<210> 35

<211> 6189

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<221> fuente

<222> 1..6189

10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN635; TOPO-BLUNT-HXT2::loxP-kanMX-loxP"
/tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 35

```

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc      60
acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcggaa cgcaattaat gtgagttagc      120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa      180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctat      240
ttaggtgaca ctatagaata ctcaagctat gcatcaagct tggtagcgag ctcggtacca      300
ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc gcccttgact agtagcggtg ttttcaaaac      360
ctagcaaccc ccacaaaact tgtcatcggt cccggattca caaatgatat aaaaagcgat      420
tacaattcta cattctaacc agatttgaga ttctctcttt ctcaattcct cttatattag      480
attataagaa caacaaatta aattacaaaa agacttataa agcaacataa tgtctgaatt      540
cgctactagc cgcgttgaaa gtggctctca acaaacttct atccactcta ctccgatagt      600
gcagaaatta gagacggatg aatctcctat tcaaaccaaa tctgaataca ctaacgctga      660
actcccagca aagccaatcg ccgcatattg gactgttatc tgtttatgtc taatgattgc      720
atttggtggg tttgtctttg gttgggatac tggtagctac tctggttttg ttaatcaaac      780
cgatttcaaa agaagatttg gtcaaatgaa atctgatggt accttccgga agacgcgtac      840
gtataacttc gtatagcata cattatacga agttattcta gtaacggccg ccagtgtgct      900
ggaattcgcc cttaagcttg cctcgtcccc gccgggtcac ccggccagcg acatggaggc      960
ccagaatacc ctcttgaca gtcttgacgt gcgcagctca ggggcatgat gtgactgtcg     1020
ccgtacatt tagcccatat atccccatgt ataatcattt gcatccatac attttgatgg     1080
ccgcacggcg cgaagcaaaa attacggctc ctgcgtgcag acctgcgagc agggaaacgc     1140
tcccctcaca gacgcgttga attgtcccca cgcgcgcccc ctgtagagaa atataaaagg     1200

```

ES 2 663 480 T3

ttaggatttg	ccactgaggt	tcttctttca	tatacttcct	tttaaaatct	tgctaggata	1260
cagttctcac	atcacatccg	aacataaaca	accatgggta	aggaaaagac	tcacgtttcg	1320
aggccgcgat	taaattccaa	catggatgct	gatttatatg	ggtataaatg	ggctcgcgat	1380
aatgtcgggc	aatcaggtgc	gacaatctat	cgattgtatg	ggaagcccg	tgccgagag	1440
ttgtttctga	aacatggcaa	aggtagcgtt	gccaatgatg	ttacagatga	gatggtcaga	1500
ctaaactggc	tgacggaatt	tatgcctctt	ccgaccatca	agcattttat	cgtactcct	1560
gatgatgcat	ggttactcac	cactgcgatc	cccggcaaaa	cagcattcca	ggtattagaa	1620
gaatatcctg	attcaggtga	aaatattggt	gatgcgctgg	cagtgttctt	gcgcgggttg	1680
cattcgattc	ctgtttgtaa	ttgtcctttt	aacagcgatc	gcgtatttcg	tctcgtcag	1740
gcgcaatcac	gaatgaataa	cggtttggtt	gatgcgagtg	attttgatga	cgagcgtaat	1800
ggctggcctg	ttgaacaagt	ctggaaagaa	atgcataagc	ttttgccatt	ctcaccggat	1860
tcagtcgtca	ctcatggtga	tttctcactt	gataacctta	tttttgacga	ggggaaatta	1920
ataggttgta	ttgatgttgg	acgagtcgga	atcgcagacc	gataccagga	tcttgccatc	1980
ctatggaact	gcctcgggtga	gttttctcct	tcattacaga	aacggctttt	tcaaaaatat	2040
ggtattgata	atcctgatat	gaataaattg	cagtttcatt	tgatgctcga	tgagtttttc	2100
taatcagtac	tgacaataaa	aagattcttg	ttttcaagaa	cttgtcattt	gtatagtttt	2160
tttatattgt	agttgttcta	ttttaatcaa	atgttagcgt	gatttatatt	ttttttcgcc	2220
tcgacatcat	ctgccagat	gcgaagttaa	gtgcgcagaa	agtaatatca	tgcgtaatc	2280
gtatgtgaat	gctggctcgt	atactgctgt	cgattcgata	ctaacgcgcg	catccagtgt	2340
cgacgatatc	tagagcgcgc	ataacttcgt	ataatgtatg	ctatacgaag	ttataggcct	2400
cgagacgtcc	ttgtctgtg	aaaccaaggg	cttaacatta	gaggaaagta	atgaaatgta	2460
tgttgaagg	gtcaaaccat	ggaaatctgg	tagctggatc	tcaaaagaaa	aaagagtttc	2520
cgaggaataa	gagattatac	ttaaactagc	actgattttt	ttaaggctaa	tggtactactaa	2580
tactttaata	gatgatcttc	atactttttt	atttaacgat	ttttaatgat	gtttttat	2640
gtaccactca	tttatctaga	ttttttta	actgatcaaa	tcttacggac	tcgacgttaa	2700
aaagttccta	catacgtctg	gtacttgaaa	cgctgcttcg	aggtattgac	actataagaa	2760
tacgatccaa	atacttacac	cgcatgtaaa	aatatgccga	caatatgaat	acttggtgat	2820
gaatgatatt	tgattttaat	ccggcaattt	acctccttta	tataatccaa	taattgttga	2880
taattagtgg	ttaggttgca	gtactaataa	gaattaagac	aaatattctt	ctactatata	2940
aaaggtgcaa	acaaaacaca	cgccgatcgg	ccatactaaa	caagaccaac	ataagggcc	3000
gtcgacaagg	gcgaattctg	cagatatcca	tcacactggc	ggccgctcga	gcatgcatct	3060

ES 2 663 480 T3

agagggccca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgttttacia	3120
cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgacgc acatccccct	3180
ttcgccagct ggcgtaatac cgaagaggcc cgcaccgacg gcccttccca acagttggcg	3240
agcctatacg tacggcagtt taaggtttac acctataaaa gagagagccg ttatcgtctg	3300
tttgtggatg tacagagtga tattattgac acgcgggggc gacggatggt gatccccctg	3360
gccagtgcac gtctgctgtc agataaagtc tcccgtgaac tttaccgggt ggtgcatatc	3420
ggggatgaaa gctggcgcat gatgaccacc gatatggcca gtgtgccgggt ctccgttata	3480
ggggaagaag tggctgatct cagccaccgc gaaaatgaca tcaaaaacgc cattaacctg	3540
atgttctggg gaataataat gtcaggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc	3600
cttttcacgt agaaagccag tccgcagaaa cgtgctgac ccgggatgaa tgtcagctac	3660
tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg	3720
cttacatggc gatagctaga ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca	3780
gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag cctgcgaag taaactggat ggctttctcg	3840
ccgccaaagg tctgatggcg caggggatca agctctgac aagagacagg atgaggatcg	3900
tttcgcatga ttgaacaaga tggattgacg gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg	3960
ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg	4020
ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat	4080
gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgcggggcgt tccttgcgca	4140
gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgetattggg cgaagtgccg	4200
gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgcg cctgccgaga aagtatccat catggctgat	4260
gcaatcgggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa	4320
catcgcatcg agcgagcacg tactcgcatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg	4380
gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg	4440
cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg	4500
gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat	4560
caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac	4620
cgttccctcg tgctttacgg tategccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc	4680
cttcttgacg agttctcttg aattattaac gcttacaatt tcctgatgag gtattttctc	4740
cttacgcata tgtgcggtat ttacacccgc atacaggtgg cacttttcgg ggaatgtgc	4800
gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac	4860
aataaccctg ataaatgctt caataatagc acgtgaggag ggccaccatg gccaaagtga	4920
ccagtgcgct tccggtgctc accgcgcgcg acgtgcggcg agcggctcag ttctggaccg	4980

ES 2 663 480 T3

```

accggctcgg gttctcccgg gacttcgtgg aggaacgactt cgccgggtgtg gtccggggacg 5040
acgtgaccct gttcatcagc gcggtccagg accaggtggt gccggacaac accctggcct 5100
gggtgtgggt gcgcgccctg gacgagctgt acgccgagtg gtcggaggtc gtgtccacga 5160
acttccggga cgcctccggg ccggccatga ccgagatcgg cgagcagccg tgggggaggg 5220
agttcgccct gcgcgacccg gccggcaact gcgtgcactt cgtggccgag gagcaggact 5280
gacacgtgct aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5340
atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 5400
aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcy cgtaatctgc tgcttgcaaa 5460
caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt 5520
ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc 5580
cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa 5640
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 5700
gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 5760
ccagcttga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa 5820
gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 5880
caggagagcg caccagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 5940
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc 6000
tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct gggcttttgc tggccttttg 6060
ctcacatgtt ctttctcgcy ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 6120
agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 6180
aagcgggaag 6189

```

<210> 36

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..24

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 281-Hx3inr2" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 36

gctcttttca cggagaaatt cggg 24

15

<210> 37

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 323-Hx7inr1" /tipo_mol="ADN no asignado"

10

<400> 37
 gatgagaatc cttggcaacc gc 22

<210> 38
 <211> 25

15

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

20

<222> 1..25
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador Hx4inr2" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 38
 ccatactatt tgtcgactca agcgc 25

25

<210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador Hx5inr" /tipo_mol="ADN no asignado"

35

<400> 39
 ggggtaatta gtttagggg cacgg 25

<210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 324-Ga2inf1" /tipo_mol="ADN no asignado"
 10
 <400> 40
 tcaattcgga aagcttcctt ccgg 24
 <210> 41
 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 325-Ga2inr1" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 41
 25
 cagtgatagt ttggttcgag cgg 23
 <210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 289-Hx2inf" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 42

ES 2 663 480 T3

tcttcgggaa ctagataggt ggc 23

<210> 43
<211> 23
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..23
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 290-Hx2inr" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 43
gaagtaatca gccacaatac gcc 23
15

<210> 44
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20

<220>
<221> fuente
<222> 1..73
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 838-Glk1-psuc227f" /tipo_mol="ADN no asignado"
25

<400> 44

atgtcattcg acgacttaca caaagccact gagagagcgg tcatccaggc ccgtcgacct 60
cgagtaccgt tcg 73

<210> 45
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <221> fuente

<222> 1..73

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 834- Hxk2-psuc227f" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 45

5

gccagaaagg gttccatggc cgatgtgcc aaggaattga tgcaacaaat ccgtcgacct 60
cgagtaccgt tcg 73

<210> 46

<211> 21

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15

<222> 1..21

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 645-pSUC227r" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 46

gcaatttcgg ctatcgtaa c 21

20

<210> 47

<211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<222> 1..73

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 839-Glk1-psuc225r" /tipo_mol="ADN no asignado"

30

<400> 47

caatcttcaa gtgcaccttc ctctaccct cggcacccaa gggtgacaag ccggatccta 60
ccgttcgtat agc 73

35

<210> 48

<211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente

<222> 1..73

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 835-Hxk2-psuc225r" /tipo mol="ADN no asignado"

10 <400> 48

gccagaaagg gttccatggc cgatgtgcca aaggaattga tgcaacaaat ccgtcgacct 60

cgagtaccgt tcg 73

<210> 49

15 $\langle 211 \rangle$ 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

20 <221> fuente

<222> 1..21

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 646-pSUC225f" /tipo mol="ADN no asignado"

<400> 49

25 cgttcactca tggaaaatag c 21

<210> 50

<211> 72

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..72

35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 846-Hxk1_loxP_f" /tipo_mol="ADN no asignado"

ES 2 663 480 T3

<400> 50

```
atggttcatt taggtccaaa gaaaccacag gctagaaagg gttccatggc cggatccact 60
agcataactt cg 72
```

5 <210> 51

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<222> 1..72

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 847-Hxk1_loxP_r" /tipo_mol="ADN no asignado"

15 <400> 51

```
atggttcatt taggtccaaa gaaaccacag gctagaaagg gttccatggc cggatccact 60
agcataactt cg 72
```

<210> 52

20 <211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<222> 1..72

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 848-Gal1_loxP_f" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 52

```
atgactaaat ctcatcaga agaagtgatt gtacctgagt tcaattctag cggatccact 60
agcataactt cg 72
```

<210> 53

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<222> 1..70

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador 849-Gal1_loxP_r" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 53

10

```
ttataattca tatagacagc tgcccaatgc tggtttagag acgatgatag ttgggccgcc      60
agtgtgatgg                                     70
```

<210> 54

<211> 5250

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

20 <222> 1..5250

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN774; TOPO-BLUNT-loxP-hphMX-loxP (sitios loxP en orientación opuesta)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 54

25

```
gcttcgggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag      60
ctatgaccat gattacgcca agctattttag gtgacactat agaataactca agctatgcat     120
caagcttggt accgagctcg gatccactag cataaacttcg tataatgtat gctatacgaa     180
gttattctag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc ttaagctttg cctcgtcccc     240
gccgggtcac cgggccagcg acatggaggc ccagaatacc ctccctgaca gtcttgacgt      300
gcgcagctca ggggcatgat gtgactgtcg cccgtacatt tagcccatat atccccatgt      360
ataatcattt gcatccatag attttgatgg ccgcacggcg cgaagcaaaa attacggctc     420
ctcgtctgag acctgcgagc agggaaacgc tcccctcaca gacgcgtgaa ttgtccccac     480
```

ES 2 663 480 T3

gccgcgcccc tgtagagaaa tataaaagggt taggatttgc cactgagggtt cttctttcat 540
 atacttccctt ttaaaatctt gctaggatac agttctcaca tcacatccga acataaacia 600
 ccatgggttaa aaagcctgaa ctcaccgcga cgtctgtcga gaagtttctg atcgaaaagt 660
 tcgacagcgt ctcgcacctg atgcagctct cggagggcga agaactctgt gctttcagct 720
 tcgatgtagg agggcgtgga tatgtcctgc gggtaaatac ctgcgccgat ggtttctaca 780
 aagatcggtt tgtttatcgg cactttgcat cggccgcgct cccgattccg gaagtgcctg 840
 acattgggga attcagcgag agcctgacct attgcatctc ccgcctgca cagggtgtca 900
 cgttgcaaga cctgcctgaa accgaactgc ccgctgttct gcagccggtc gcggaggcca 960
 tggatgcgat cgctgcggcc gatcttagcc agacgagcgg gttcggccca ttcggaccgc 1020
 aaggaatcgg tcaatacact acatggcgtg atttcatatg cgcgattgct gatccccatg 1080
 tgtatcaact gcaaaactgt atggacgaca ccgtcagtgc gtccgtcggc caggctctcg 1140
 atgagctgat gctttgggcc gaggactgcc ccgaagtccg gcacctcgtg caccgggatt 1200
 tcggctccaa caatgtcctg acggacaatg gccgcataac agcggtcatt gactggagcg 1260
 aggcgatgtt cggggattcc caatacgagg tcgccaaact cttcttctgg aggcctgtgt 1320
 tggcttgtat ggagcagcag acgcgtactc tcgagcggag gcacccggag cttgcaggat 1380
 cgcgcgggct ccgggcgtat atgctccgca ttgggtcttga ccaactctat cagagcttgg 1440
 ttgacggcaa tttcgatgat gcagcttggg cgcagggtcg atgcgacgca atcgtccgat 1500
 ccggagccgg gactgtcggg cgtacacaaa tcgcccgag aagcgcggcc gtctggaccg 1560
 atggctgtgt agaagtactc gccgatagtg gaaaccgacg ccccgagcact cgtccgaggg 1620
 caaaggaata atcagtactg acaataaaaa gattcttgtt ttcaagaact tgtcatttgt 1680
 atagtttttt tatattgtag ttgttctatt ttaatcaaat gttagcgtga tttatatttt 1740
 ttttcgcctc gacatcatct gccagatgc gaagttaagt gcgcagaaaag taatatcatg 1800
 cgtcaatcgt atgtgaatgc tggtcgctat actgctgtcg attcgatact aacgcgcga 1860
 tccagtgtcg aaaacgagct cgaattcacc gatgatatcc atcacactgg cggccgctcg 1920
 acgatatacta gagcgcgcat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt ataggatcca 1980
 tcacactggc ggcccaattc gccctatagt gagtctgatt acaattcact ggccgtcgtt 2040
 ttacaacgct gtgactggga aaacctggc gttacccaac ttaatcgctc tgcagcacat 2100
 ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggccgca ccgatcgccc ttcccaacag 2160
 ttgcgcagcc tatacgtacg gcagtttaag gtttacacct ataaaagaga gagccgttat 2220
 cgtctgtttg tggatgtaca gagtgatatt attgacacgc cggggcgacg gatggtgatc 2280
 cccctggcca gtgcacgtct gctgtcagat aaagtctccc gtgaacttta cccggtggtg 2340
 catatcgggg atgaaagctg gcgcagatg accaccgata tggccagtgt gccggtctcc 2400

ES 2 663 480 T3

gttatcgggg aagaagtggc tgatctcagc caccgcgaaa atgacatcaa aaacgccatt	2460
aacctgatgt tctggggaat ataatgtca ggcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc	2520
tagatccttt tcacgtagaa agccagtcgc cagaaacggt gctgaccccg gatgaatgtc	2580
agctactggg ctatctggac aagggaaaac gcaagcgcaa agagaaagca ggtagcttgc	2640
agtgggctta catggcgata gctagactgg gcggttttat ggacagcaag cgaaccggaa	2700
ttgccagctg gggcgccctc tggtaagggt gggaagccct gcaaagtaa ctggatggct	2760
ttctcgccgc caaggatctg atggcgagg ggatcaagct ctgatcaaga gacaggatga	2820
ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg	2880
gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg	2940
ttccggctgt cagcgcaggg gcgccgggt ctttttgtca agaccgacct gtccggtgcc	3000
ctgaatgaac tgcaagacga ggcagcgcg ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct	3060
tgccgagctg tgctcgacgt tgtactgaa gcgggaagg actggctgct attgggcgaa	3120
gtgccggggc aggatctcct gtcatctcac ctgctcctg ccgagaaagt atccatcatg	3180
gctgatgcaa tgccggcgct gcatacgctt gatccggcta cctgcccatt cgaccaccaa	3240
gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat	3300
gatctggacg aagagcatca ggggctcgc ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg	3360
agcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt gccgaatac	3420
atggtggaat atggccgctt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg tgtggcgac	3480
cgctatcagg acatagcgtt ggctaccgt gatattgctg aagagcttg cggcgaatgg	3540
gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc	3600
tatcgccttc ttgacgagtt cttctgaatt attaacgctt acaatttcct gatgcggtat	3660
tttctcctta cgcactctgt cggatattca caccgcatac aggtggcact tttcggggaa	3720
atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatatt tctaaatata ttcaaatatg tatccgctca	3780
tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatagcacgt gaggagggcc accatggcca	3840
agttgaccag tgccgttcg gtgctcaccg cgcgcgacgt cgcggagcg gtcgagttct	3900
ggaccgaccg gctcgggttc tcccgggact tcgtggagga cgacttcgcc ggtgtggtcc	3960
gggacgacgt gaccctgttc atcagcgcg tccaggacca ggtggtgcc gacaacaccc	4020
tgccctgggt gtgggtgcgc ggcctggacg agctgtacgc cgagtggctg gaggtcgtgt	4080
ccacgaactt ccgggacgcc tccgggccgg ccatgaccga gatcggcgag cagccgtggg	4140
ggcgggagtt cgcctgcgc gaccggccg gcaactgcgt gcacttcgtg gccgaggagc	4200
aggactgaca cgtgctaaaa cttcatTTTT aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt	4260

ES 2 663 480 T3

```

ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc 4320
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct 4380
tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa 4440
ctcttttttc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag 4500
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc 4560
tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 4620
actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca 4680
cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 4740
gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcaggg 4800
tcggaacagg agagcgacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc 4860
ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc 4920
ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg gttcctgggc ttttgcgggc 4980
cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 5040
cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaagcg 5100
cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga 5160
caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac 5220
tcattaggca ccccaggctt tacactttat 5250

```

<210> 55

<211> 4744

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..4744

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN775; TOPO-BLUNT-loxP-natMX-loxP (sitios loxP en orientación opuesta)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 55

15

ES 2 663 480 T3

gcttcoggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag	60
ctatgaccat gattacgcca agctathtag gtgacactat agaatactca agctatgcat	120
caagcttggt accgagctcg gatccactag cataacttcg tataatgtat gctatacgaa	180
gttattctag taacggccgc cagtgtgctg gaattcgccc ttaagcttgc ctcgccccg	240
ccgggtcacc cggccagcga catggaggcc cagaataccc tccttgacag tcttgacgtg	300
cgcagctcag gggcatgatg tgactgtcgc ccgtacattt agcccataca tccccatga	360
taatcatttg catccataca ttttgatggc cgcacggcgc gaagcaaaaa ttacggctcc	420

ES 2 663 480 T3

tcgctgcaga cctgcgagca gggaaacgct cccctcacag acgcgttgaa ttgtccccac	480
gccgcgcccc tgtagagaaa tataaaaggt taggatttgc cactgagggt cttctttcat	540
atacttcctt ttaaaatctt gctaggatac agttctcaca tcacatccga acataaacia	600
ccatgtaaaa tgaccactct tgacgacacg gcttaccggt accgcaccag tgtcccgagg	660
gacgcccagg ccatcgaggc actggatggg tccttcacca ccgacaccgt cttccgcgtc	720
accgccaccg gggacggctt caccctgcgg gaggtgccgg tggacccgcc cctgaccaag	780
gtgttccccg acgacgaatc ggacgacgaa tcggagcccg gggaggacgg cgaccggac	840
tcccggacgt tcgtcgcgta cggggacgac ggcgacctgg cgggcttcgt ggtcgtctcg	900
tactccggct ggaaccgcgg gctgaccgtc gaggacatcg aggtcgcccc ggagcaccgg	960
gggcacgggg tcgggcgcgc gttgatgggg ctgcgcgacg agttcgcccc cgagcggggc	1020
gccgggcacc tctggctgga ggtcaccaac gtcaacgcac cggcgatcca cgcgtaccgg	1080
cggatgggggt tcaccctctg cggcctggac accgcctctgt acgacggcac cgcctcggac	1140
ggcgagcagg cgctctacat gagcatgccc tgcccctagt actgacaata aaaagattct	1200
tgttttcaag aacttgctcat ttgtatagtt tttttatatt gtagttgttc tattttaatc	1260
aaatgttagc gtgatttata tttttttctg cctcgacatc atctgccag atgcgaagtt	1320
aagtgcgcag aaagtaatat catgcgtcaa tcgtatgtga atgctggctg ctatactgct	1380
gtcgattcga tactaacgcc gccatccagt gtcgacgata tctagagcgc gcataacttc	1440
gtataatgta tgctatacga agttatagga tccatcacac tggcggccca attcgcccta	1500
tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgttttaca cgtcgtgact gggaaaacc	1560
tggcgttacc caacttaatc gccttgccgc acatccccct ttccgcagct ggcgtaatag	1620
cgaagaggcc cgcaccgacg gcccttccca acagttgcgc agcctatacg tacggcagtt	1680
taaggtttac acctataaaa gagagagccg ttatcgtctg tttgtggatg tacagagtga	1740
tattattgac acgcgggggc gacggatggg gatccccctg gccagtgcac gtctgctgtc	1800
agataaagtc tcccgtaac tttaccgggt ggtgcataac ggggatgaaa gctggcgcac	1860
gatgaccacc gatatggcca gtgtgccggg ctccgttatc ggggaagaag tggctgatct	1920
cagccaccgc gaaaatgaca tcaaaaacgc cattaacctg atgttctggg gaatataaat	1980
gtcaggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttcacgt agaaagccag	2040
tccgcagaaa cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga	2100
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatacctaga	2160
ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgccg gctggggcgc cctctggtaa	2220
ggttggaag cctgcaaag taaactggat ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg	2280
caggggatca agctctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga	2340

ES 2 663 480 T3

tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	2400
acaacagaca	atcggttgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggccc	2460
ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcaag	acgaggcagc	2520
gcggctatcg	tggttgcca	cgacggcggt	tccttgccga	gctgtgctcg	acgttgtcac	2580
tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	2640
tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggtgtcatac	2700
gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	2760
tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	2820
cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgagcatg	cccgaaggcg	aggatctcgt	2880
cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggt	gaaaatggcc	gcttttctgg	2940
attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	3000
ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttcctcg	tgctttacgg	3060
tatcgccgct	cccgatccgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	3120
aattattaac	gcttacaatt	tcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcatac	tgtgcggtat	3180
ttcacaccgc	atacaggtgg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	3240
tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	3300
caataatagc	acgtgaggag	ggccaccatg	gccaaagtga	ccagtgcctg	tccgggtgctc	3360
accgcgcgcg	acgtcgccgg	agcggtcgag	ttctggaccg	accggctcgg	gttctcccgg	3420
gacttcgtgg	aggacgactt	cgcgggtgtg	gtccgggacg	acgtgacct	gttcatcagc	3480
gcgggtccagg	accaggtggt	gccggacaac	accctggcct	gggtgtgggt	gcgcggcctg	3540
gacgagctgt	acgccgagtg	gtcggaggtc	gtgtccacga	acttccggga	cgcctccggg	3600
ccggccatga	ccgagatcgg	cgagcagccg	tgggggcggg	agttcgccct	gcgcgacccg	3660
gccggcaact	gcgtgcactt	cgtggccgag	gagcaggact	gacacgtgct	aaaacttcat	3720
ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatac	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	3780
taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	3840
tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	3900
gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaagg	aactggcttc	3960
agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	4020
aagaactctg	tagcacccgc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	4080
gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	4140
gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttcg	tgacacacagc	ccagcttgga	gcgaacgacc	4200

ES 2 663 480 T3

```

tacacogaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gggccacgct tccogaaggg 4260
agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 4320
cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 4380
gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 4440
gcggcctttt tacggttcct gggcttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 4500
ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 4560
cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg 4620
cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca 4680
gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagtttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact 4740
ttat 4744

```

<210> 56

<211> 1725

5 <212> ADN

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1725

<223> /organismo="Saccharomyces cerevisiae" /nota="WT-GAL2 secuencia de ADN " /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 56

15

ES 2 663 480 T3

```

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aacccaagc tggggaagac      60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat      120
gatgaattga aagccggtga gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata      180
cccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttgtg tgttgccttc      240
ggcggcttca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttgttgt ccaaacagac      300
tttttgagaa ggtttggtat gaaacataag gatggtaccc actatttgtc aaacgtcaga      360
acagggttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggtat tatactttcc      420
aaagggtgag atatgtatgg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata      480
gttgggtatta tcattcaaat tgcctctatc aacaagtggg accaatatct cattggtaga      540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcatc gccgtcttat gtccatgtt gatctctgaa      600
attgctcaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattactgca      660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcagttcaa      720
tggagagttc cattagggct atgtttcgct tgggcattat ttatgattgg cgctttgacg      780
ttagttcctg aatccccacg ttatttatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt      840
tcatttgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagttagat      900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta      960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatttgt tcaaatgttc     1020
caacaattaa ccgtaacaa ttattttttc tactacggta ccgttatttt caagtcagtt     1080
ggcctggatg attccttga aacatccatt gtcattggtg tagtcaactt tgctccact     1140
ttcttttagt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtcgta aatgtttact tttgggcgct     1200
gccactatga tggcttgat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatatcct     1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccggtaact gtatgattgt ctttacctgt     1320
ttttatattt tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa     1380
tcattccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta     1440
tgggggttct tgattgcatt tttcaccca ttcatcacat ctgccattaa cttctactac     1500
ggttatgtct tcatgggctg tttggttgc atgttttttt atgtcttttt ctttgttcca     1560
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat gggaagaag tgttttacct     1620
tggaaatctg aaggctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tttagaggat     1680
ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa                       1725

```

<210> 57

5

<211> 7392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..7392

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN993 " /tipo_mol="ADN no asignado"

5

<400> 57

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cgcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataattc cgttttaaga gcttggtgag cgctaggagt cactgccagg tatcgtttga	240
acacggcatt agtcaggga gtcataacac agtcctttcc cgcaattttc tttttctatt	300
actcttgcc tcctctagta cactctatat ttttttatgc ctcggtaatg attttcattt	360
ttttttttcc acctagcgga tgactctttt tttttcttag cgattggcat tatcacataa	420
tgaattatac attatataaa gtaatgtgat ttcttcgaag aatatactaa aaaatgagca	480
ggcaagataa acgaaggcaa agatgacaga gcagaaagcc ctagtaaagc gtattacaaa	540
tgaaaccaag attcagattg cgatctcttt aaagggtggt cccctagcga tagagcactc	600

ES 2 663 480 T3

gatcttccca	gaaaaagagg	cagaagcagt	agcagaacag	gccacacaat	cgcaagtgat	660
taacgtccac	acaggtatag	ggtttctgga	ccatatgata	catgctctgg	ccaagcattc	720
cggctggtcg	ctaatacgtt	agtgcattgg	tgaacttacac	atagacgacc	atcacaccac	780
tgaagactgc	gggattgctc	tcggtcaagc	ttttaaagag	gccctactgg	cgcgtggagt	840
aaaaagggtt	ggatcaggat	ttgcgccttt	ggatgaggca	ctttccagag	cggtggtaga	900
tctttcgaac	aggccgtacg	cagttgtcga	acttggtttg	caaagggaga	aagtaggaga	960
tctctcttgc	gagatgatcc	cgcattttct	tgaagccttt	gcagaggcta	gcagaattac	1020
cctccacggt	gattgtctgc	gaggcaagaa	tgatcatcac	cgtagtgaga	gtgcgttcaa	1080
ggctcttgcg	gttgccataa	gagaagccac	ctcgcccaat	ggtaccaacg	atgttccttc	1140
caccaaagg	gttcttatgt	agtgcacccg	attattttaa	gctgcagcat	acgatataata	1200
tacatgtgta	tatatgtata	cctatgaatg	tcagtaagta	tgtatacgaa	cagtatgata	1260
ctgaagatga	caaggtaatg	catcattcta	tacgtgtcat	tctgaacgag	gcgcgatcgc	1320
gctttccttt	tttctttttg	ctttttcttt	ttttttctct	tgaactcgac	ggatcatatg	1380
cgggtgtgaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	gcatcaggaa	attgtaaacg	1440
ttaatatctt	gttaaaaattc	gcgttaaatt	ttgtttaa	cagctcattt	tttaaccaat	1500
aggccgaaat	cggcaaaatc	ccttataaat	caaaagaata	gaccgagata	gggttgagtg	1560
ttgttccagt	ttggaacaag	agtccactat	taaagaacgt	ggactccaac	gtcaaagggc	1620
gaaaaaccgt	ctatcagggc	gatggccca	tacgtgaacc	atcacccctaa	tcaagttttt	1680
tggggctcgag	gtgccgtaaa	gcactaaatc	ggaaccctaa	agggagcccc	cgatttagag	1740
cttgacgggg	aaagccggcg	aacgtggcga	gaaaggaagg	gaagaaagcg	aaggagcggg	1800
cgtatggggc	ctggcaagt	tagcggtcac	gctgcgcgta	accaccacac	ccgccgcgct	1860
taatgcgccg	ctacagggcg	cgtcgcgcca	ttcgccattc	aggtcgcgca	actgttggga	1920
agggcgatcg	gtgcgggcct	cttcgctatt	acgccagctg	gcgaaggggg	gatgtgctgc	1980
aaggcgatta	agttgggtaa	cgccagggtt	ttccagtc	cgacgttgta	aaacgacggc	2040
cagtgaattg	taatacgact	cactataggg	cgaattggag	ctccaccgcg	gtggcggccg	2100
cggctaacttc	tcgtaggaac	aatttcgggc	ccctgcgtgt	tcttctgagg	ttcatctttt	2160
acatttgctt	ctgctggata	attttcagag	gcaacaagga	aaaattagat	ggcaaaaagt	2220
cgtctttcaa	ggaaaaatcc	ccaccatctt	tcgagatccc	ctgtaactta	ttggcaactg	2280
aaagaatgaa	aaggaggaaa	atacaaaata	tactagaact	gaaaaaaaaa	aagtataaat	2340
agagacgata	tatgccaaata	cttcacaatg	ttcgaatcta	ttcttcattt	gcagctattg	2400
taaaataata	aaacatcaag	aacaaacaag	ctcaacttgt	cttttctaag	aacaaagaat	2460
aaacacaaaa	acaaaaagtt	tttttaattc	tcgagatctc	tagaaaatgg	cagttgagga	2520

ES 2 663 480 T3

gaacaatatg cctgttggtt cacagcaacc ccaagctggt gaagacgtga tctcttcact	2580
cagtaaagat tcccatttaa gcgcacaatc tcaaaagtat tctaattgat aattgaaagc	2640
cggtgagtca gggctctgaag gctcccaaag tgttcctata gagataccca agaagcccat	2700
gtctgaatat gttaccgttt ccttgctttg tttgtgtgtt gccttcggcg gcttcatgtt	2760
tggctgggat accggtacta tttctgggtt tgttgtcaa acagactttt tgagaaggtt	2820
tggatgaaa cataaggatg gtaccacta tttgtcaaac gtcagaacag gtttaatcgt	2880
cgccattttc aatattggct gtgcctttgg tggattata ctttccaaag gtggagatat	2940
gtatggccgt aaaaagggc tttcgattgt cgtctcggtt tatatagttg gtattatcat	3000
tcaaattgcc tctatcaaca agtggtagca atatttcatt ggtagaatca tatctggttt	3060
gggtgtcggc ggcacgccc tcttatgtcc tatgttgatc tctgaaattg ctccaaagca	3120
cttgagaggc acactagttt cttgttatca gctgatgatt actgcaggta tctttttggg	3180
ctactgtact aattacggta caaagagcta ttcgaactca gttcaatgga gagttccatt	3240
agggctatgt ttcgcttggc cattatttat gattggcgct ttgacgttag ttcctgaatc	3300
cccacgttat ttatgtgagg tgaataaggt agaagacgcc aagcgttcca ttgctaagtc	3360
taacaagggtg tcaccagagg atcctgccgt ccaggcagag ttagatctga tcatggccgg	3420
tatagaagct gaaaaactgg ctggcaatgc gtccctgggg gaattatttt ccaccaagac	3480
caaagtattt caacgtttgt tgatgggtgt gtttgttcaa atgttccaac aattaaccgg	3540
taacaattat ttttctact accgtaccgt tattttcaag tcagttggcc tggatgattc	3600
ctttgaaaca tccattgtca ttggtgtagt caactttgcc tccactttct ttagtttgtg	3660
gactgtcgaa aacttgggac atcgtaaatg tttacttttg ggcgctgcca ctatgatggc	3720
ttgtatggtc atctacgcct ctgttggtgt tactagatta tatcctcacg gtaaaagcca	3780
gccatcttct aaagggtccg gtaactgtat gattgtcttt acctgttttt atattttctg	3840
ttatgccaca acctgggcgc cagttgcctg ggcatcaca gcagaatcat tcccactgag	3900
agtcaagtgc aaatgtatgg cgttggcctc tgcctccaat tgggtatggg ggttcttgat	3960
tgcatttttc acccatttca tcacatctgc cattaaactc tactacgggt atgtcttcat	4020
gggctgtttg gttgccatgt ttttttatgt ctttttcttt gttccagaaa ctaaaggcct	4080
atcgtagtaa gaaattcaag aattatggga agaagggtgt ttaccttga aatctgaagg	4140
ctggattcct tcatccagaa gaggtaataa ttacgattta gaggatttac aacatgacga	4200
caaaccgtgg tacaaggcca tgctagaata agcttgcgcg cgaattttct atgatttatg	4260
atttttatta ttaaataagt tataaaaaaa ataagtgtat acaaatttta aagtgactct	4320
taggttttaa aacgaaaatt cttattcttg agtaactctt tcctgtaggt caggttgctt	4380

ES 2 663 480 T3

tctcaggat	agcatgaggt	cgtctcttatt	gaccacacct	ctaccggcat	gccgagcaaa	4440
tgctgcaaa	tcgctcccca	tttcacccaa	ttgtagatat	gctaactcca	gcaatgagtt	4500
gatgaatctc	ggtgtgtatt	ttatgtcctc	agaggacaac	acctgttgta	atcgttcttc	4560
cacacgtacg	aagcttatcg	ataccgtcga	ggggggggccc	ggtaccacgc	ttttgttccc	4620
tttagtgagg	gttaattccg	agcttgccgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	4680
attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	taggagcccg	aagcataaag	tgtaaagcct	4740
ggggtgccta	atgagtgagg	taactcacat	taattgcgtt	gcgtcactg	cccgtttccc	4800
agtcgggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	4860
gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttcct	cgctcactga	ctcgtcgcgc	tcggtcgttc	4920
ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	4980
gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	5040
aggccgcggt	gctggcgctt	ttccataggc	tgggcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	5100
gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	gcgttcccc	5160
ctggaagctc	cctcgtcgcg	tctcctgttc	cgacctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	5220
cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcaatgctc	acgctgtagg	tatctcagtt	5280
cgggtgtaggt	cgcttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	accccccggt	cagcccgacc	5340
gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agccaacccc	ggtaagacac	gacttatcgc	5400
cactggcagc	agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	5460
agttcttgaa	gtgggtggcct	aactacggct	acaactagaag	gacagtatct	ggtatctgcg	5520
ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaacaa	5580
ccaccgctgg	tagcggtggt	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	5640
gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	5700
cacgttaagg	gatttttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	5760
attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaaacttg	tctgacagtt	5820
accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatctcgt	tcattccatag	5880
ttgcctgact	gcccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	5940
gtgctgcaat	gataccgcga	gaccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	6000
agccagccgg	aaggggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	6060
ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	6120
ttggtgccat	tgtacacagg	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttgggtatg	gcttcattca	6180
gctccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtga	aaaaaagcgg	6240
ttagctcctt	cggtcctccg	atcgttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	6300

ES 2 663 480 T3

```

tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 6360
tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct 6420
cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca 6480
tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 6540
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccacgt 6600
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 6660
gaaatgttga atactcatat tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6720
ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggggttcc 6780
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctgg gtccttttca tcacgtgcta taaaataat 6840
tataatttaa attttttaat ataaatatat aaattaaaaa tagaaagtaa aaaaagaaat 6900
taaagaaaaa atagtttttg ttttcgaag atgtaaaaga ctctaggggg atcgccaaca 6960
aatactacct tttatcttgc tcttcctgct ctcagggtatt aatgccgaat tgtttcatct 7020
tgtctgtgta gaagaccaca cagcaaatc ctgtgatttt acattttact tatcgtaaat 7080
cgaatgtata tctatttaat ctgcttttct tgtctaataa atatatatgt aaagtacgct 7140
ttttgttgaa atttttttaa cctttgttta ttttttttc ttcatccgt aactcttcta 7200
ccttctttat ttactttcta aaatccaaat acaaaacata aaaataaata aacacagagt 7260
aaattcccaa attattccat cattaaaaga tacgaggcgc gtgtaagtta caggcaagcg 7320
atccgtccta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7380
ggccctttcg tc 7392

```

<210> 58

<211> 7389

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10

<222> 1..7389

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pDB1250; WT-GAL2 vector de expresión para cribar" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 58

15

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataattc cgttttaaga gcttggtgag cgctaggagt cactgccagg tatcgtttga	240
acacggcatt agtcaggga gtcataacac agtcctttcc cgcaattttc tttttctatt	300
actcttgccc tctctagta cactctatat ttttttatgc ctcggtaatg attttcattt	360
ttttttttcc acctagcgga tgactctttt tttttcttag cgattggcat tatcacataa	420
tgaattatac attatataaa gtaatgtgat ttcttcgaag aatatactaa aaaatgagca	480
ggcaagataa acgaaggcaa agatgacaga gcagaaagcc ctagtaaagc gtattacaaa	540
tgaaccaag attcagattg cgatctcttt aaagggtggt cccctagcga tagagcactc	600
gatcttccca gaaaaagagg cagaagcagt agcagaacag gccacacaat cgcaagtgat	660
taacgtccac acaggtatag ggtttctgga ccatatgata catgctctgg ccaagcattc	720
cggctggtcg ctaatcggtg agtgcattgg tgacttacac atagacgacc atcacaccac	780
tgaagactgc gggattgctc tcggtcaagc ttttaaagag gccctactgg cgcgtggagt	840
aaaaaggttt ggatcaggat ttgcgccttt ggatgaggca ctttccagag cggtggtaga	900
tctttcgaac aggcctgacg cagttgtcga acttggtttg caaagggaga aagtaggaga	960
tctctcttgc gagatgatcc cgcattttct tgaaagcttt gcagaggcta gcagaattac	1020
cctccacgtt gattgtctgc gaggcaagaa tgatcatcac cgtagtgaga gtgcgttcaa	1080
ggctcttgcg gttgccataa gagaagccac ctgcgccaat ggtaccaacg atgttcctc	1140
caccaaggt gttcttatgt agtgacaccg attatttaaa gctgcagcat acgatataa	1200
tacatgtgta tatatgtata cctatgaatg tcagtaagta tgtatacgaa cagtatgata	1260
ctgaagatga caaggtaatg catcattcta tacgtgtcat tctgaacgag gcgcgatcgc	1320
gctttccttt tttctttttg ctttttcttt ttttttctct tgaactcgac ggatcatatg	1380
cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggaa attgtaaacg	1440
ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt ttttaaccaat	1500
aggccgaaat cggcaaaatc ccttataaat caaaagaata gaccgagata ggggtgagt	1560
ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc	1620
gaaaaaccgt ctatcagggc gatggccac tacgtgaacc atcacccata tcaagttttt	1680
tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag	1740
cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaagggaag gaagaaagcg aaggagcggg	1800
cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta accaccacac ccgcccgcgt	1860
taatgcgccg ctacagggcg cgtcgcgcca ttgcgcattc aggtgcgca actgttggga	1920
agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaggggg gatgtgctgc	1980
aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc	2040
cagtgaattg taatacgact cactataggg cgaattggag ctccaccgcg gtggcggccg	2100
cggctacttc tcgtaggaac aatttcgggc cctgcgtgt tcttctgagg ttcatctttt	2160
acatttgctt ctgctggata attttcagag gcaacaagga aaaattagat ggcaaaaagt	2220

ES 2 663 480 T3

cgtctttcaa ggaaaaatcc ccaccatctt tcgagatccc ctgtaactta ttggcaactg	2280
aaagaatgaa aaggaggaaa atacaaaata tactagaact gaaaaaaaaa aagtataaat	2340
agagacgata tatgccataa cttcacaaatg ttccaatcta ttcttcattt gcagctattg	2400
taaaataata aaacatcaag aacaaacaag ctcaacttgt cttttctaag aacaaagaat	2460
aaacacaaaa acaaaaagtt tttttaattc tgcagatctc tagaaaaatg gcagttgagg	2520
agaacaatat gcctgttggt tcacagcaac cccaagctgg tgaagacgtg atctcttcac	2580
tcagtaaaga ttcccattta agcgcacaaat ctcaaaagta ttccaatgat gaattgaaa	2640
ccgggtgagtc agggcctgaa ggctcccaaa gtgttcctat agagataccc aagaagccca	2700
tgtctgaata tgttaccgtt tccttgcttt gtttgtgtgt tgccttcggc ggcttcattg	2760
ttggctggga taccggtact atttctgggt ttgttgtcca aacagacttt ttgagaaggt	2820
ttggtatgaa acataaggat ggtacccact atttgtcaaa cgtcagaaca ggtttaatcg	2880
tcgccatttt caatattggc tgtgcctttg gtggtattat actttccaaa ggtggagata	2940
tgtatggcgg taaaaagggt ctttcgattg tcgtctcggg ttatatagtt ggtattatca	3000
ttcaaattgc ctctatcaac aagtggtagc aatatttcat tggtagaatc atatctggtt	3060
tgggtgtcgg cggcatcgcc gtcttatgtc ctatgttgat ctctgaaatt gctccaaagc	3120
acttgagagg cactactagt tcttggtatc agctgatgat tactgcaggg atcttttttg	3180
gctactgtac taattacggg acaaagagct attcgaactc agttcaatgg agagttccat	3240
tagggctatg ttctgcttggt tcattattta tgattggcgc tttgacgtta gttcctgaat	3300
ccccacgtta ttatgtgag gtgaataagg tagaagacgc caagctttcc attgctaagt	3360
ctaacaagggt gtcaccagag gatcctgccg tccaggcaga gttagatctg atcatggccg	3420
gtatagaagc tgaaaaactg gctggcaatg cgtcctgggg ggaattatct tccaccaaga	3480
ccaaagtatt tcaacgtttg ttgatgggtg tatttgttca aatgttccaa caattaaccg	3540
gtaacaatta ttttttctac tacggtagcc ttattttcaa gtcagttggc ctggatgatt	3600
cctttgaaac atccattgtc attggtgtag tcaactttgc ctccactttc tttagtttgt	3660
ggactgtcga aaacttgggg cgtcgtaaat gtttactttt gggcgtgcc actatgatgg	3720
cttgtagtgt catctacgcc tctgttggtg ttaccagatt atatcctcac ggtaaaagcc	3780
agccatcttc taaagggtgcc ggtaactgta tgattgtctt tacctgtttt tatattttct	3840
gttatgccac aacctgggcg ccagttgcct gggcatcac agcagaatca ttcccactga	3900
gagtcaagtc gaaatgtatg gcgttggcct ctgcttccaa ttgggtatgg gggttcttga	3960
ttgcattttt caccctattc atcacatctg ccattaactt ctactacggg tatgtcttca	4020
tgggctgttt ggttgccatg tttttttatg tctttttctt tgttccagaa actaaaggcc	4080

tatcgttaga agaaattcaa gaattatggg aagaagggtgt tttaccttgg aaatctgaag	4140
gctggattcc ttcattccaga agaggtaata attacgattt agaggattta caacatgacg	4200
acaaaccgtg gtacaaggcc atgctagaat aagcgcgcga atttcttatg atttatgatt	4260
tttattatta aataagttat aaaaaaata agtgatatca aattttaaag tgactcttag	4320
gtttttaaac gaaaattctt attcttgagt aactctttcc tgtaggtcag gttgctttct	4380
caggatatgc atgaggtcgc tcttattgac cacacctcta ccggcatgcc gagcaaatgc	4440
ctgcaaatcg cccccattt cacccaattg tagatatgct aactccagca atgagttgat	4500
gaatctcggg gtgtatttta tgcctcaga ggacaacacc tgttgtaatc gttcttccac	4560
acgtacgaag cttatcgata ccgtcgaggg ggggcccggg acccagcttt tgttcccttt	4620
agtgagggtt aattccgagc ttggcgtaat catgggcata gctgtttcct gtgtgaaatt	4680
gttatccgct cacaattcca cacaacatag gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg	4740
gtgcctaata agtgaggtaa ctacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt	4800
cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt	4860
tgcgtattgg gcgctcttcc gcttctcgcg tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc	4920
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cgtaataacg gttatccaca gaatcagggg	4980
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa ggcagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg	5040
ccgcgttgct ggcggttttc cataggctcg gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac	5100
gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagc gactataaag ataccaggcg ttccccctg	5160
gaagtcctct cgtgcgtctt cctgttccga cctgcgctt taccggatac ctgtccgct	5220
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg	5280
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggttcag cccgaccgt	5340
gcgccttata cggttaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac	5400
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt	5460
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatattgg atctgcgctc	5520
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca	5580
ccgctggtag cggtggtttt ttgttttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat	5640
ctcaagaaga tcttttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac	5700
gttaagggat ttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacttagatc cttttaaatt	5760
aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc	5820
aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg	5880
cctgactgcc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg	5940
ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggtccaga tttatcagca ataaaccagc	6000

ES 2 663 480 T3

cagccggaag ggcgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta 6060
ttaattggtg ccggaagct agagtaagta gtccgccagt taatagtttg cgcaacggtg 6120
ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtagtgct tcattcagct 6180
ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccct gttgtgaaaa aaagcggtta 6240
gctccttcgg tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatgg 6300
ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcattgccatc cgtaagatgc ttttctgtga 6360
ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat ggggcgaccg agttgctctt 6420
gcccggcgtc aatacgggat aatacgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca 6480
ttggaacacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt 6540
cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat ctccagcatc ttttactttc accacgtttc 6600
tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 6660
atgttgaata ctcatctct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg 6720
tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 6780
cacatttccc cgaaaagtgc cacctgggtc cttttcatca cgtgctataa aaataattat 6840
aatttaaatt ttttaataa aatatataaa ttaaaaatag aaagtaaaaa aagaaattaa 6900
agaaaaaata gtttttgttt tccgaagatg taaaagactc tagggggatc gccacaaat 6960
actacctttt atcttgctct tcctgctctc aggtattaat gccgaattgt ttcattctgt 7020
ctgtgtagaa gaccacacac gaaaatcctg tgattttaca ttttacttat cgttaatcga 7080
atgtatatct atttaactct cttttcttgt ctaataaata tatatgtaa gtacgctttt 7140
tggtgaaatt ttttaaacct ttgtttattt ttttttcttc attccgtaac tcttctacct 7200
tctttattta ctttctaaaa tccaaataca aaacataaaa ataaataaac acagagtaaa 7260
ttcccaaatt attccatcat taaaagatac gaggcgcgtg taagttacag gcaagcgatc 7320
cgtcctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 7380
cctttcgtc 7389

<210> 59

<211> 574

5

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Gal2p WT

10

<400> 59

ES 2 663 480 T3

Met	Ala	Val	Glu	Glu	Asn	Asn	Met	Pro	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Pro	Gln
1				5				10					15		
Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Ser	His	Leu	Ser
			20					25					30		
Ala	Gln	Ser	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asn	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Ser
	35						40					45			
Gly	Pro	Glu	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Pro	Ile	Glu	Ile	Pro	Lys	Lys	Pro
	50					55					60				
Met	Ser	Glu	Tyr	Val	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu	Cys	Val	Ala	Phe
65					70					75				80	
Gly	Gly	Phe	Met	Phe	Gly	Trp	Asp	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Val
				85					90					95	
Val	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Arg	Arg	Phe	Gly	Met	Lys	His	Lys	Asp	Gly
			100					105					110		
Thr	His	Tyr	Leu	Ser	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Phe
	115						120					125			
Asn	Ile	Gly	Cys	Ala	Phe	Gly	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Gly	Asp
	130					135					140				
Met	Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Val	Ser	Val	Tyr	Ile
145					150					155				160	
Val	Gly	Ile	Ile	Ile	Gln	Ile	Ala	Ser	Ile	Asn	Lys	Trp	Tyr	Gln	Tyr
				165					170					175	
Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Val
			180					185					190		
Leu	Cys	Pro	Met	Leu	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Gly
	195						200					205			
Thr	Leu	Val	Ser	Cys	Tyr	Gln	Leu	Met	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Phe	Leu
	210					215						220			
Gly	Tyr	Cys	Thr	Asn	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ser	Val	Gln
225					230					235				240	
Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Cys	Phe	Ala	Trp	Ser	Leu	Phe	Met	Ile
				245					250					255	
Gly	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Tyr	Leu	Cys	Glu	Val
	260							265					270		
Asn	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Lys	Leu	Ser	Ile	Ala	Lys	Ser	Asn	Lys	Val
	275						280					285			
Ser	Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	Val	Gln	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Ile	Met	Ala
	290					295					300				
Gly	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Trp	Gly	Glu	Leu
305					310					315				320	
Phe	Ser	Thr	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met	Gly	Val	Phe
				325					330					335	
Val	Gln	Met	Phe	Gln	Gln	Leu	Thr	Gly	Asn	Asn	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Tyr
			340					345					350		
Gly	Thr	Val	Ile	Phe	Lys	Ser	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Glu	Thr
	355						360					365			
Ser	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Ala	Ser	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu
	370					375					380				
Trp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala
385					390					395				400	
Ala	Thr	Met	Met	Ala	Cys	Met	Val	Ile	Tyr	Ala	Ser	Val	Gly	Val	Thr
				405					410					415	
Arg	Leu	Tyr	Pro	His	Gly	Lys	Ser	Gln	Pro	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	Gly
			420					425					430		
Asn	Cys	Met	Ile	Val	Phe	Thr	Cys	Phe	Tyr	Ile	Phe	Cys	Tyr	Ala	Thr
	435						440					445			
Thr	Trp	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Val	Ile	Thr	Ala	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu
	450					455					460				
Arg	Val	Lys	Ser	Lys	Cys	Met	Ala	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Asn	Trp	Val
465					470					475				480	
Trp	Gly	Phe	Leu	Ile	Ala	Phe	Phe	Thr	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Ala	Ile
				485					490					495	
Asn	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Val	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Met	Phe
			500					505					510		
Phe	Tyr	Val	Phe	Phe	Phe	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Gly	Leu	Ser	Leu	Glu
	515						520					525			
Glu	Ile	Gln	Glu	Leu	Trp	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Trp	Lys	Ser	Glu	
	530						535				540				
Gly	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Arg	Arg	Gly	Asn	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Asp
545						550				555				560	
Leu	Gln	His	Asp	Asp	Lys	Pro	Trp	Tyr	Lys	Ala	Met	Leu	Glu		
				565					570						

<210> 60

<211> 9400

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<221> fuente

<222> 1..9400

10

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN187 (pSH65-derived CRE recombinase que expresun vector)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 60

cctctagagt cgacctgcag cttctcaatg atattcgaat acgctttgag gagatacagc	60
ctaatatccg acaaactgtt ttacagattt acgatcgtac ttgttaccca tcattgaatt	120
ttgaacatcc gaacctggga gttttccctg aaacagatag tatatttgaa cctgtataat	180
aatatatagt ctagcgcttt acggaagaca atgtatgtat ttcggttcct ggagaaacta	240
ttgcatctat tgcataggta atcttgacg tgcgatcccc ggttcatttt ctgcgtttcc	300
atcttgcaat tcaatagcat atctttgtta acgaagcatc tgtgcttcat tttgtagaac	360
aaaaatgcaa cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag	420
aaacagaaatg caacgcgaaa gcgctatttt accaacgaag aatctgtgct tcatttttgt	480
aaaacaaaaa tgcaacgcga gagcgcta attttcaaaca aagaatctga gctgcatttt	540
tacagaacag aaatgcaacg cgagagcgct atttttacaa caaagaatct atacttcttt	600
tttgttctac aaaaatgcat cccgagagcg ctatttttct aacaaagcat cttagattac	660
tttttttctc ctttgtgcgc tctataatgc agtctcttga taactttttg cactgtaggt	720
ccgttaaggt tagaagaagg ctacttttgt gtctattttc tcttccataa aaaaagcctg	780
actccacttc ccgcgtttac tgattactag cgaagctgcg ggtgcatttt ttcaagataa	840
aggcatcccc gattatattc tataccgatg tggattgcgc atactttgtg aacagaaagt	900
gatagcgttg atgattcttc attggtcaga aaattatgaa cggtttcttc tattttgtct	960
ctatatacta cgtataggaa atgtttacat ttctgtattg ttttcgattc actctatgaa	1020
tagttcttac tacaattttt ttgtctaaag agtaatacta gagataaaca taaaaaatgt	1080
agaggtcgag ttttagatgca agttcaagga gcgaaagggt gatgggtagg ttatataggg	1140
atatagcaca gagatatata gcaaagagat acttttgagc aatgtttgtg gaagcgggat	1200
tcgcaatatt ttagtagctc gttacagtc ggtgcgtttt tgggtttttg aaagtgcgtc	1260
ttcagagcgc ttttggtttt caaaaagcgt ctgaagttcc tatactttct agagaatagg	1320

ES 2 663 480 T3

aacttcggaa taggaacttc aaagcgtttc cgaaaacgag cgcttccgaa aatgcaacgc	1380
gagctgcgca catacagctc actgttcacg tcgcacctat atctgcgtgt tgccctgtata	1440
tatatataca tgagaagaac ggcatagtgc gtgtttatgc ttaaatacgt acttatatgc	1500
gtctattttat gtaggatgaa aggtagtcta gtacctctg tgatattatc ccattccatg	1560
cggggtatcg tatgcttcct tcagcactac cctttagctg ttctatatgc tgccactcct	1620
caattggatt agtctcatcc ttcaatgcta tcatttcctt tgatattgga tcatatgcat	1680
agtaccgaga aactagtgcg aagtagtgat cagggtattgc tgttatctga tgagtatacg	1740
ttgtcctggc caccggcaga gcaacgcttat cgtccaatt tcccacaaca ttagtcaact	1800
ccgttaggcc cttcattgaa agaaatgagg tcatacaatg tcttccaatg tgagattttg	1860
ggccattttt tatagcaaag attgaataag gcgcattttt cttcaaagct ttattgtacg	1920
atctgactaa gttatctttt aataattggt attcctgttt attgcttgaa gaattgccgg	1980
tcctattttac tcgttttagg actggttcag aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata	2040
cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact	2100
tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatacg	2160
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt	2220
atgagtatcc aacatttcog tgtgcctctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct	2280
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca	2340
cgagtggggt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc	2400
gaagaacggt ttccaatgat gacactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc	2460
cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgcgcatac actattctca gaatgacttg	2520
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta	2580
tgcagtgctg ccataacccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgac	2640
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt	2700
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaac acgagcgtga caccacgatg	2760
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct	2820
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc	2880
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct	2940
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct ccggtatcgt agttatctac	3000
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagac agatcgctga gatagggtgc	3060
tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat	3120
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg	3180
accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc	3240

ES 2 663 480 T3

aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa	3300
ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag	3360
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta	3420
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta	3480
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag	3540
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg	3600
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg	3660
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag	3720
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtccgtg cgggtttcgc	3780
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctctcag gggggcggag cctatggaaa	3840
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg	3900
ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct	3960
gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgagcga ggaagcggaa	4020
gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg	4080
cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttac	4140
ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcctat gttgtgtgga	4200
attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagcgc	4260
gcaattaacc ctactaaag ggaacaaaag ctggagctct agtacggatt agaagccgcc	4320
gagcgggtga cagccctccg aaggaagact ctccctccgtg cgtcctcgtc ttcaccggtc	4380
gcgttcctga aacgcagatg tgccctcgcg cgcactgctc cgaacaataa agattctaca	4440
atactagctt ttatggttat gaagaggaaa aattggcagt aacctggccc cacaaacctt	4500
caaatgaacg aatcaaatta acaaccatag gatgataatg cgattagttt tttagcctta	4560
tttctggggt aattaatcag cgaagcgatg atttttgatc tattaacaga tatataaatg	4620
caaaaactgc ataaccactt taactaatac tttcaacatt ttcggtttgt attacttctt	4680
attcaaagtgt aataaaagta tcaacaaaaa attgttaata tacctctata ctttaacgtc	4740
aaggagaaaa aaccccgat tctagaacta gtggatcccc cgggctgcag gaattcgata	4800
tcaagcttat cgataccgtc gaggggcaga gccgatcctg tacactttac ttaaaaccat	4860
tatctgagtg ttaaagtgtc aatttactga ccgtacacca aaatttgcct gcattaccgg	4920
tcgatgcaac gagtgatgag gttcgcaaga acctgatgga catgttcagg gatcgccagg	4980
cgttttctga gcatacctgg aaaatgcttc tgtccgtttg ccggctcgtg gcggcatggt	5040
gcaagttgaa taaccggaaa tggtttcccg cagaacctga agatgttcgc gattatcttc	5100

ES 2 663 480 T3

tatatcttca	ggcgcgcggt	ctggcagtaa	aaactatcca	gcaacatttg	ggccagctaa	5160
acatgcttca	tcgtcgttcc	gggctgccac	gaccaagtga	cagcaatgct	gtttcactgg	5220
ttatgcggcg	gatccgaaaa	gaaaacgttg	atgccggtga	acgtgcaaaa	caggctctag	5280
cgttcgaacg	cactgatttc	gaccaggttc	gttcaactcat	ggaaaatagc	gatcgtctgc	5340
aggatatatc	taatctggca	tttctgggga	ttgcttataa	cacctgttta	cgtatagccg	5400
aaattgccag	gatcagggtt	aaagatatct	cacgtactga	cggtagggaga	atgttaatcc	5460
atattggcag	aacgaaaaac	ctggtttagca	ccgcagggtg	agagaaggca	cttagcctgg	5520
gggtaactaa	actggctcag	cgatggattt	ccgtctctgg	tgtagctgat	gatccgaata	5580
actacctgtt	ttgccgggtc	agaaaaaatg	gtgttgccgc	gccatctgcc	accagccagc	5640
tatcaactcg	cgccttgga	gggatttttg	aagcaactca	tcgattgatt	tacggcgcta	5700
aggatgactc	tggtcagaga	tacctggcct	ggtctggaca	cagtgcccg	gtcggagccg	5760
cgcgagatat	ggcccgcgct	ggagtttcaa	taccggagat	catgcaagct	ggtggctgga	5820
ccaatgtaaa	tattgtcatg	aactatatcc	gtaccctgga	tagtgaaaca	ggggcaatgg	5880
tgccgctgct	ggaagatggc	gattagccat	taacgcgtaa	atgattgcta	taattatttg	5940
atatttatgg	tgacatatga	gaaaggattt	caacatcgac	ggaaaatatg	tagtgctgtc	6000
tgtaagcact	aatattcagt	cgcagccgt	cattgtcact	gtaaagctga	gcgatagaat	6060
gcctgatatt	gactcaatat	ccgttgcggt	tcctgtcaaa	agtatgcgta	gtgctgaaca	6120
tttcgtgatg	aatgccaccg	aggaagaagc	acggcgcggt	tttgcaaagt	gatgtctgag	6180
tttggcgaac	tcttggttaa	ggttggaatt	gtcgacctcg	agtcatgtaa	ttagttatgt	6240
cacgcttaca	ttcacgcct	ccccccacat	ccgtctctaac	cgaaaaggaa	ggagttagac	6300
aacctgaagt	ctagggtccct	atttattttt	ttatagttat	gttagtatta	agaacgttat	6360
ttatatattca	aatttttctt	ttttttctgt	acagacgcgt	gtacgcatgt	aacattatac	6420
tgaaaaacct	gcttgagaag	gttttgggac	gctcgaaggc	tttaattttgc	ggccgggtacc	6480
taggacccgt	ttatcattat	caatactgcc	atttcaaaga	atacgtaa	aattaatagt	6540
agtgattttc	ctaactttat	ttagtcaaaa	aattagcctt	ttaattctgc	tgtaaccctg	6600
acatgccccaa	aatagggggc	gggttacaca	gaatatataa	catcgtaggt	gtctgggtga	6660
acagttttatt	cctggcatcc	actaaatata	atggagcccg	ctttttaagc	tggtcatccag	6720
aaaaaaaaag	aatcccagca	ccaaaatatt	gttttcttca	ccaacctca	gttcataggt	6780
ccattctctt	agcgcaacta	cagagaacag	gggcacaaac	aggcaaaaaa	cgggcacaaac	6840
ctcaatggag	tgatgcaacc	tgccctggagt	aaatgatgac	acaaggcaat	tgaccacgc	6900
atgtatctat	ctcattttct	tacaccttct	attaccttct	gctctctctg	atttgaaaaa	6960
agctgaaaaa	aaagggttgaa	accagttccc	tgaattatt	cccctacttg	actaataagt	7020

ES 2 663 480 T3

atataaagac	ggtaggtatt	gattgtaatt	ctgtaaactc	atttcttaaa	cttcttaaat	7080
tctactttta	tagttagtct	tttttttagt	tttaaaacac	caagaactta	gtttcgaata	7140
aacacacata	aagaattcaa	aatggtttca	aaaggtgaag	aagataatat	ggctattatt	7200
aaagaattta	tgagatttaa	agttcatatg	gaaggttcag	ttaatggcca	tgaatttgaa	7260
attgaaggtg	aaggtgaagg	tagaccatat	gaaggtactc	aaactgctaa	attgaaagtt	7320
actaaaggtg	gtccattacc	atttgcttgg	gatattttgt	caccacaatt	tatgtatggg	7380
tcaaaagctt	atgttaaaca	tccagctgat	attccagatt	atttaaaatt	gtcattttcca	7440
gaaggtttta	aatgggaaag	agttatgaat	tttgaagatg	gtgggtgtgt	tactgttact	7500
caagattcat	cattacaaga	tggtgaattt	atttataaag	ttaaattgag	aggtactaat	7560
tttccatcag	atgggtccag	tatgcaaaaa	aaaactatgg	gttggaagc	ttcatcagaa	7620
agaatgtatc	cagaagatgg	tgctttaaaa	ggtgaaatta	aacaaagatt	gaaattaaaa	7680
gatgggtggtc	attatgatgc	tgaagttaaa	actacttata	aagctaaaaa	accagttcaa	7740
ttaccaggtg	cttataatgt	taatattaaa	ttggatatta	cttcacataa	tgaagattat	7800
actattgttg	aacaatatga	aagagctgaa	ggtagacatt	caactggtgg	tatggatgaa	7860
ttatataaat	aatctagaca	aatcgctcct	aaatatatac	ctaaagaaca	ttaaagctat	7920
attataagca	aagatacgta	aattttgctt	atattattat	acacatatca	tattttctata	7980
tttttaagat	ttgggttatat	aatgtacgta	atgcaaagga	aataaatttt	atacattatt	8040
gaacagcgtc	caagtaacta	cattatgtgc	actaatagtt	tagcgtcgtg	aagactttat	8100
tgtgtcgcga	aaagtaaaaa	ttttaaaaat	tagagcacct	tgaacttgcg	aaaaaggttc	8160
tcatcaactg	tttaaaagat	ctgagctcgc	ggccgcgata	tcgctagctc	gagcccacac	8220
accatagctt	caaaatgttt	ctactccttt	tttactcttc	cagattttct	cggactccgc	8280
gcacgcgctg	accacttcaa	aacacccaag	cacagcatac	taaattttcc	ctctttcttc	8340
ctctaggggtg	tcgttaatta	cccgtactaa	aggtttgaa	aagaaaaaag	agaccgcctc	8400
gtttcttttt	cttcgctgaa	aaaggcaata	aaaattttta	tcacgtttct	ttttcttgaa	8460
attttttttt	ttagtttttt	tctctttcag	tgacctccat	tgatatttaa	gttaataaac	8520
ggtcttcaat	ttctcaagtt	tcagtttcat	ttttcttgtt	ctattacaac	tttttttact	8580
tcttgttcat	tagaaagaaa	gcatagcaat	ctaactaag	ggcggtgtt	gacaattaat	8640
catcggcata	gtatatcggc	atagtataat	acgacaaggt	gaggaaactaa	accatggcca	8700
agttgaccag	tgccgttccg	gtgctcaccg	cgcgcgacgt	cgcggagcg	gtcgagttct	8760
ggaccgaccg	gctcgggttc	tcccgggact	tcgtggagga	cgaacttcgcc	ggtgtggtcc	8820
gggacgacgt	gacctgttc	atcagcgcg	tccaggacca	ggtggtgccc	gacaaccccc	8880

ES 2 663 480 T3

```

tggcctgggt gtgggtgcgc ggcctggacg agctgtacgc cgagtggtcg gaggtcgtgt      8940
ccacgaactt ccgggacgcc tccgggccgg ccatgaccga gatcggcgag cagccgtggg      9000
ggcgggagtt cgcctgcgc gacccggccg gcaactgcgt gcacttcgtg gccgaggagc      9060
aggactgaca cgtccgacgg cggcccacgg gtcccaggcc tcggagatcc gtcccccttt      9120
tcctttgtcg atatcatgta attagttatg tcacgcttac attcacgcc tccccccaca      9180
tccgctctaa ccgaaaagga aggagttaga caacctgaag tctagggtccc tatttatattt      9240
tttatagtta tgtagtatt aagaacgtta tttatatattc aaatttttct tttttttctg      9300
tacagacgcg tgtacgcatg taacattata ctgaaaacct tgcttgagaa ggttttggga      9360
cgctcgaagg ctttaatttg caagctgaat tcccggggat      9400

```

<210> 61

<211> 5763

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..5763

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="pRN486 (TOPO-BLUNT-his3::loxP-natMX-loxP)"
/tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 61

15

ES 2 663 480 T3

acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta tacgtacgca gttgtcgaac ttggtttgca	60
aaggagagaaa gtaggagatc tctcttgcca gatgatcccc ctttttcttg aaagctttgc	120
agaggctagc agaattaccc tccacgttga ttgtctgcca ggcaagaatg atcatcaccg	180
tagtgagagt gcgttcaagg ctcttgccgt tgccataaga gaagccacct cgcccaatgg	240
taccaacgat gttccctcca ccaaagggtg tcttatgtag tgacaccgat tatttaaagc	300
tgcagcatac gatatatata catgtgtata tatgtatacc tatgaatgtc agtaagtatg	360
tatacgaaca gtatgatact gaagatgaca aggtaatgca tcattctata cgtgtcattc	420
tgaacgagggc gcgctttcct tttttctttt tgctttttct tttttttct cttgaactcg	480
acggatcata tgcgggtgtga aatactcgag atcttgctga aaaactcgag ccatccggaa	540
gatctggctt aagggcgaat tctgagatat ccatcacact ggcgcccgct cgagcatgca	600
tctagagggc ccaattcgcc ctatagttag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta	660
caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc	720
cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgcccttc ccaacagttg	780
cgcagcctat acgtacggca gtttaagggt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt	840
ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccg ggcgacggat ggtgatcccc	900
ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccggt aactttaccc ggtggtgcat	960

ES 2 663 480 T3

atcgggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt	1020
atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa cgccattaac	1080
ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc atgagattat caaaaaggat cttcacctag	1140
atccttttca cgtagaaagc cagtccgcag aaacgggtgct gaccccgat gaatgtcagc	1200
tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcacaaga gaaagcaggt agcttgtagt	1260
gggcttacat ggcatagct agactggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg	1320
ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaaactg gatggctttc	1380
tcgccgcaa ggatctgat ggcgaggga tcaagctctg atcaagagac aggatgagga	1440
tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag	1500
aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc cgccgtgttc	1560
cggtgtcag cgagggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg	1620
aatgaactgc aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc	1680
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaaggact ggctgctatt gggcgaagtg	1740
ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgcc agaaagtatc catcatggct	1800
gatgcaatgc ggcgctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg	1860
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat	1920
ctggacgaag agcatcagg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgagc	1980
atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg	2040
gtggaaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc	2100
tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct	2160
gaccgcttc tcgtgcttta cggtatcgcc gctccgatt cgcagcgcat cgccttctat	2220
cgccttcttg acgagttctt ctgaattatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatttt	2280
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacagg tggcactttt cggggaaatg	2340
tgccggaac ccctatttgt ttattttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga	2400
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat agcacgtgag gagggccacc atggccaagt	2460
tgaccagtgc cgttcgggtg ctcaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc gagttctgga	2520
ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccggg gtggtccggg	2580
acgacgtgac cctgttcac agcgcgggtc aggaccaggt ggtgccggac aacaccctgg	2640
cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag gtcgtgtcca	2700
cgaacttcgg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag ccgtgggggc	2760
gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc gaggagcagg	2820

actgacacgt gctaaaaactt cattttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg	2880
ataatctcat gacccaaaac ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg	2940
tagaaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc	3000
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc	3060
tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt	3120
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc	3180
taatctctgt accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact	3240
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac	3300
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag	3360
aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg	3420
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctgttatctt tatagtcctg	3480
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgt atgctcgtca ggggggcgga	3540
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctgggcttt tgctggcctt	3600
ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct	3660
ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcaagcgccc	3720
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag	3780
gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	3840
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag	3900
cggataaaca ttccacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaaagc tatttaggtg	3960
acactataga atactcaagc tatgcatcaa gcttgggtacc gagctcggat ccactagtaa	4020
cggccgccag tgtgtctggaa ttgcgcccat gccagctgag aatattgtag gagatcttct	4080
agaaagattg tacatccgga attctagatt ggtgagcgtc aggagtcact gccaggatc	4140
gtttgaacac ggcattagtc agggaagtca taacacagtc ctttcccgca attttctttt	4200
tctattactc ttggcctcct ctagtacact ctatatTTTT ttatgcctcg gtaatgattt	4260
tcattttttt ttttccacct agcggatgac tctttttttt tcttagcgat tggcattatc	4320
acataatgaa ttatacatta tataaagtaa tgtgatttct tcgaagaata tactaaaaaa	4380
tgagcaggca agataaacga aggcaaagat gacagagcag aaagccctag taaagcgtat	4440
tacaaatgaa accaagattc agattgcgat ctctttccta taacttcgta tagcatacat	4500
tatacgaagt tatgcgcgct ctagatatcg tcgacactgg atggcggcgt tagtatcgaa	4560
tcgacagcag tatagcgacc agcattcaca tacgattgac gcatgatatt actttctgcg	4620
cacttaactt cgcctctggg cagatgatgt cgaaggcga aaaaatataa atcacgctaa	4680
catttgatta aaatagaaca actacaatat aaaaaacta tacaatgac aagttcttga	4740

ES 2 663 480 T3

```

aaacaagaat ctttttattg tcagtaactag gggcagggca tgctcatgta gagcgccctgc 4800
tcgccgtccg aggcgggtgcc gtcgtacagg gcggtgtcca ggccgcagag ggtgaacccc 4860
atccgcgggt acgcgtggat cgcgggtgctg ttgacgttgg tgacctccag ccagaggtgc 4920
ccggcgcccc gctcgcgggc gaactccgtc gcgagcccca tcaacgcgcg cccgaacccg 4980
tgcccccggt gctccggggc gacctcgatg tcctcgacgg tcagccggcg gttccagccg 5040
gagtacgaga cgaccacgaa gcccgccagg tcgccgtcgt ccccgtagc gacgaacgtc 5100
cgggagtcg ggtcgccgtc ctccccggcg tccgattcgt cgtccgattc gtcgtcgggg 5160
aacaccttg tcaggggcgg gtccaccggc acctcccga gggggaagcc gtccccggtg 5220
gcggtgacgc ggaagacggt gtcggtggtg aaggaccat ccagtgcctc gatggcctcg 5280
gcgtcccccg ggacactggt gcggtaccgg taagccgtgt cgtcaagagt ggtcatttta 5340
catggttggt tatgttcgga tgtgatgtga gaactgtatc ctagcaagat tttaaaagga 5400
agtatatgaa agaagaacct cagtggcaaa tcctaacctt ttatatattc ctacaggggc 5460
gcggcgtggg gacaattcaa cgcgtctgtg aggggagcgt ttccctgctc gcaggtctgc 5520
agcgaggagc cgtaattttt gcttcgcgcg gtgcggccat caaatgtat ggatgcaaat 5580
gattatacat ggggatgtat gggctaaatg tacgggcgac agtcacatca tgcccctgag 5640
ctgcgcacgt caagactgtc aaggagggtg ttctgggcct ccattgctcgt ggccgggtga 5700
cccgcggggg acgaggcaag cttaaggggc aattccagca cactggcggc cgttactaga 5760
ata 5763

```

<210> 62

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..23

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador ActinF (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 62

15 ggattctgag gttgctgctt tgg 23

<210> 63

<211> 23

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador ActinR (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 5 asignado"

 <400> 63
 gagcttcac accaacgtag gag 23

 10 <210> 64
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT1F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 20 asignado"

 <400> 64
 tgttctctgt acaccgttga ccg 23

 25 <210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT1R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 35 asignado"

 <400> 65
 agatcataca gttaccagca ccc 23

 <210> 66

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota=" Cebador HXT2F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"

10 <400> 66
 cttcgcatcc actttcgtg 19

 <210> 67

15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT2R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"

25 <400> 67
 aatcatgacg ttaccggcag cc 22

 <210> 68
 <211> 23

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente

35 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT3F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"

<400> 68
gaagctagag ctgctgggtc agc 23

<210> 69
5 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> fuente
<222> 1..24
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT3R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 69
15 acaacgacat aaggaattgg agcc 24

<210> 70
<211> 24
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <222> 1..24
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT4F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 70
30 atggagagtt ccattaggtc tagg 24

<210> 71
<211> 24
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT4R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 5
 <400> 71
 atggagagtt ccattaggtc tagg 24
 <210> 72
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT5F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 20 <400> 72
 ttgctatgtc gtctatgcct ctg 23
 <210> 73
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..22
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT5R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 73
 35 agataaggac ataggcaacg gg 22
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..21

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT7F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 74

10 ggggtgctgca tccatgactg c 21

<210> 75

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..24

20 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT7R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 75

25 acaacgacat aaggaattgg agcc 24

<210> 76

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<222> 1..25

35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT8F ((PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 76

gtactactat cttcaatct gtcgg 25

<210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT8R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 77
 cttgtgacgc caacggaggc g 21
 15 <210> 78
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT9F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 25 <400> 78
 ccattgagag gtttgacgc cg 22
 30 <210> 79
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT9R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 79
acacaatcat acagttaccg gcg 23

<210> 80
5 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> fuente
<222> 1..23
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT10F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 80
15 ggaatgcaag actctttcga gac 23

<210> 81
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <222> 1..21
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT10R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 81
30 ctagtgacgc caacggtggc g 21

<210> 82
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT11F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 5
 <400> 82
 gccactcaat ggagagtcgg c 21
 <210> 83
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT11R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 20 <400> 83
 caactagcaa ggctggatcg tc 22
 <210> 84
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT12F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 84
 35 caccatcttc aaatctgtcg gtc 23
 <210> 85
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT12R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

 10 <400> 85
 caatcataca gttaccggca ccc 23

 <210> 86
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..20
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT13F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

 <400> 86
 25 ccctcatggc caggacggtc 20

 <210> 87
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT13R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

 <400> 87

	ttgccataac cagttgcatg cag	23
	<210> 88	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
10	<222> 1..24	
	<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT14F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"	
	<400> 88	
15	gccttagtag tgtactgcat cggt	24
	<210> 89	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..23	
25	<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT14R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"	
	<400> 89	
30	tgatacgtag ataccatgga gcc	23
	<210> 90	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<221> fuente	

<222> 1..21

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT15F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

5 <400> 90
gaggcctgtg tctccatcgc c 21

<210> 91
<211> 24

10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

15 <222> 1..24
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT15R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 91

20 cacaagaata cctgtgatca aacg 24

<210> 92
<211> 24
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..24

30 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT16F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 92
caaggaagta tagtaatact gcgc 24

35 <210> 93
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..21

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT16R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 93

10 ttggcgatgg agacacaggc c 21

<210> 94

<211> 23

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..23

20 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT17F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 94

25 taacactgca caatggagag tcc 23

<210> 95

<211> 22

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..22

35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT17R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 95

tgagtaccca tggatcctct gg 22

<210> 96
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador GAL2F (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"
 <400> 96
 tcaatggaga gttccattag ggc 23
 15 <210> 97
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador GAL2R (PCR en tiempo real)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"
 25 <400> 97
 ctggacggca ggatcctctg g 21
 30 <210> 98
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..82
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador KOP11* para KO HXT11" /tipo_mol="ADN no
 asignado"

ES 2 663 480 T3

<400> 98

```
aataatcatt gcacaattta gttctaaacg cttttgttat tactcaatat ccgttttaag      60
agcttggtga gcgctaggag tc                                             82
```

5 <210> 99

<211> 101

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<222> 1..101

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador KOT11* para KO HXT11" /tipo_mol="ADN no asignado"

15

<400> 99

```
tcgtcaattt ttttttttgc ttttttacca atttaccgaa aactagaaga gaggttcaaga      60
gaaaaaaaaa gaaaaagcaa aaagaaaaaa ggaaagcgcg c                          101
```

20 <210> 100

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<222> 1..39

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador iHXT11F (HXT11 inversa)" /tipo_mol="ADN no asignado"

30

<400> 100

```
ggcctctaga tcagctggaa aagaacctct tgtaaattg      39
```

<210> 101

35 <211> 41

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..41
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador iHXT11R (HXT11 inversa)" /tipo_mol="ADN no asignado"

10 <400> 101
 gctaggatcc atgtcaggtg ttaataatac atccgcaaat g 41

<210> 102
 <211> 36
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..36
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT11F (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 102
 ggcctctaga atgtcaggtg ttaataatac atccgc 36
 25

<210> 103
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..37
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT12F (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

35 <400> 103
 ggcctctaga atgggttga ttgtctcaat attcaac 37

<210> 104
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT11/12R (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 10
 <400> 104
 cgatggatcc tcagctggaa aagaacctct tgtaaattg 39
 <210> 105
 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador HXT1 Xbal (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 105
 25
 gcattctaga atgaattcaa ctcccgatct aatatc 36
 <210> 106
 <211> 38
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..38
 35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT1 Cfr9i (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 106
 tgcatcccg gttatttcct gctaaacaaa ctcttgta 38

5 <210> 107
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador F HXT2 Xbai (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

15 <400> 107
 gtcctctaga atgtctgaat tcgctactag ccg 33

20 <210> 108
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..40
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT2 Cfr9i (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

30 <400> 108
 catcgcccg gttattcctc ggaaactctt tttcttttg 40

35 <210> 109
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..38
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador F HXT3 Xbal (clonación)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"
 5
 <400> 109
 gcattctaga atgaattcaa ctccagattt aatatctc 38
 <210> 110
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT6 Cfr9i (clonación)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"
 20 <400> 110
 catcgcccggtgttatttgggtgctgaacattctcttg 36
 <210> 111
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador F HXT4 Xbal (clonación)" /tipo_mol="ADN no
 asignado"
 <400> 111
 35 gtcctctaga atgtctgaag aagctgccta tcaag 35
 <210> 112
 <211> 38

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..38
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT4RN Cfr9I (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

10 <400> 112
 tatcgccgg gttaattaac tgacctactt tttccga 38

<210> 113
 <211> 35
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador F HXT5 XbaI (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 113
 25 gtctctaga atgtcggaac ttgaaaacgc tcatac 35

<210> 114
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..40
 35 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT5 Cfr9I (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 114

gcatcccggttattttcttagtgaacatcctttata 40

<210> 115
<211> 34
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..34
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador F HXT7 XbaI (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 115
15 gtcctctagaatgtcacaagacgctgctat tgca 34

<210> 116
<211> 36
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..36
25 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Cebador R HXT7 Cfr9I (clonación)" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 116
catcgcccggtgtatttggtgctgaacattctctg 36
30

<210> 117
<211> 6338
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35

<220>
<221> fuente

<222> 1..6338

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Plásmido pRS313-P7T7" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 117

5

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cgcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataattc cgttttaaga gcttggtgag cgctaggagt cactgccagg tatcgtttga	240
acacggcatt agtcaggga gtcataaacac agtcctttcc cgcaattttc tttttctatt	300

ES 2 663 480 T3

actcttgccc	tcctctagta	cactctatat	tttttttatgc	ctcggtaatg	attttcattt	360
ttttttttcc	acctagcggg	tgactctttt	tttttcttag	cgattggcat	tatcacataa	420
tgaattatac	attatataaa	gtaatgtgat	ttcttcgaag	aataatactaa	aaaatgagca	480
ggcaagataa	acgaaggcaa	agatgacaga	gcagaaagcc	ctagttaaagc	gtattacaaa	540
tgaaaccaag	attcagattg	cgatctcttt	aaagggtggt	cccctagcga	tagagcactc	600
gatcttccca	gaaaaagagg	cagaagcagt	agcagaacag	gccacacaat	cgcaagtgat	660
taacgtccac	acaggatatag	ggtttctgga	ccatatgata	catgctctgg	ccaagcattc	720
cggctggctg	ctaactgctt	agtgcattgg	tgacttacac	atagacgacc	atcacaccac	780
tgaagactgc	gggattgctc	tcggtcaagc	ttttaagag	gccctactgg	cgcgtggagt	840
aaaaaggttt	ggatcaggat	ttgcgccttt	ggatgaggca	ctttccagag	cggtggtaga	900
tctttcgaac	aggccgtacg	cagttgtcga	acttggtttg	caaagggaga	aagtaggaga	960
tctctcttgc	gagatgatcc	cgcattttct	tgaagctttt	gcagaggcta	gcagaattac	1020
cctccacgtt	gattgtctgc	gaggcaagaa	tgatcatcac	cgtagtgaga	gtgcgttcaa	1080
ggctcttgcc	gttgccataa	gagaagccac	ctcgcccaat	ggtaccaacg	atgttccttc	1140
caccaaagggt	gttcttatgt	agtgcaccgg	attattttaa	gctgcagcat	acgatatata	1200
tacatgtgta	tatatgtata	cctatgaatg	tcagtaagta	tgtatacgaa	cagtatgata	1260
ctgaagatga	caaggtaatg	catcattcta	tacgtgtcat	tctgaacgag	gcgcgctttc	1320
cttttttctt	tttgcttttt	cttttttttt	ctcttgaact	cgacggatca	tatgcggtgt	1380
gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	ggaaattgta	aacgttaata	1440
ttttgttaaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aaatcagctc	attttttaac	caataggccg	1500
aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaag	aatagaccga	gatagggttg	agtgttgttc	1560
cagtttgtaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	caacgtcaaa	gggcgaaaaa	1620
cgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	ctaatacagt	tttttggggt	1680
cgagggtgcc	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaaggagg	cccccgattt	agagcttgac	1740
ggggaaaagc	ggcgaacgtg	gcgagaaaag	aagggaagaa	agcgaagga	gcgggcgcta	1800
gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	cacacccgcc	gcgcttaatg	1860
cgccgctaca	gggcgcgtcg	cgccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	1920
gatcgtgctg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	ggggggatgt	gctgcaaggc	1980
gattaagttg	gqtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	2040
aattgtaata	cgactcacta	tagggcgaat	tggagctctc	tcgtaggaac	aatttcgggc	2100
ccctgcgtgt	tcttctgagg	ttcatctttt	acatttgctt	ctgctggata	attttcagag	2160
gcaacaagga	aaaattagat	ggcaaaaagt	cgtcttttcaa	ggaaaaatcc	ccaccatctt	2220

ES 2 663 480 T3

tcgagatccc	ctgtaactta	ttggcaactg	aaagaatgaa	aaggaggaaa	atacaaaata	2280
tactagaact	gaaaaaaaaa	aagtataaat	agagacgata	tatgccaaata	cttcacaatg	2340
ttcgaatcta	ttcttcattt	gcagctattg	taaaataata	aaacatcaag	aacaaacaag	2400
ctcaacttgt	cttttctaag	aacaaagaat	aaacacaaaa	acaaaaagtt	tttttaattt	2460
taatcaaaaa	tctagaacta	gtggatcccc	cgggctgcag	gaattcgata	tcaagcttat	2520
cgattttgcg	aacactttta	ttaattcatg	atcacgctct	aatttgtgca	tttgaaatgt	2580
actctaattc	taattttata	tttttaatga	tatcttgaaa	agtaaatacg	tttttaatat	2640
atacaaaata	atacagttta	attttcaagt	ttttgatcat	ttgttctcag	aaagttgagt	2700
gggacggaga	caaagaaact	ttaaagagaa	atgcaaagtg	ggaagaagtc	agttgtttac	2760
cgaccgcact	gttattcaca	aatattccaa	ttttgcctgc	agaccacagt	ctacaaattt	2820
tggttagttt	ggtaaattgt	aaggatatag	tagagccttt	ttgaaatggg	aaatatcttc	2880
tttttctgta	tcccgtttca	aaaagtgctc	aatgagtcag	ttatttcttt	cttactcatc	2940
gcccgtcact	taaaagaaga	aaaattactt	tcatgatgcy	aagcgaaaaa	aatttttagc	3000
ttcaattttc	acaatgcac	tatggagagg	atattataag	gttacgaaat	aaattcttga	3060
gtgttgtaaa	ttctgttaat	caaagaaaaa	gcaatagctc	gtttttctac	agaatggcta	3120
gcacagcaaa	tatgatttct	caactaaaga	aactatctat	cgcggaacct	gcggttgcca	3180
aggattctca	tcctgatgta	aatatcgtgg	atttgatgag	aaattacatt	tcacaagaat	3240
taagcaagat	ttccggcgta	gactcgtctc	ttatttttcc	agcattagaa	tggacaaata	3300
ctatggagag	aggcgatttg	ttgattccta	tcccagatt	gagaatcaaa	ggtgccaatc	3360
caaaggattt	ggcagtccaa	tgggctgaaa	aatttccatg	tggagatttc	ttggagaaaag	3420
ttgaagcgaa	tggcccgttc	atccagtttt	tcttcaaccc	tcaattttta	gcaaaacttg	3480
tcattcccaga	tattcttaacc	agaaaggagg	attatggttc	ttgcgtcgac	ctcgaggggg	3540
ggcccgttac	ccagcttttg	ttcccttttag	tgagggttaa	ttccgagctt	ggcgtaatca	3600
tggtcatagc	tgtttctctg	gtgaaattgt	tatccgctca	caattccaca	caacatagga	3660
gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaattgag	tgaggtaact	cacattaatt	3720
gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	ggaaacctgt	cgtgccagct	gcattaatga	3780
atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	gctcttccgc	ttcctcgctc	3840
actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	3900
gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	3960
cagcaaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctcggc	4020
ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	4080

ES 2 663 480 T3

ctataaagat accagcggtt ccccccgtga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	4140
ctgccgctta ccggataacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa	4200
tgctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	4260
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	4320
aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	4380
gcgaggtatg tagggcgtgc tacagagttc ttgaagtggg gccctaacta cggctacact	4440
agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	4500
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	4560
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg	4620
tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tggctatgag attatcaaaa	4680
aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata	4740
tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatac gtgaggcacc tatctcagcg	4800
atctgtctat ttgcgttcac catagttgcc tgactgcccg tcgtgtagat aactacgata	4860
cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg	4920
gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct	4980
gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaaagctag agtaagtagt	5040
tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc	5100
tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga	5160
tccccatgt tgtgaaaaaa agcggttage tccttcggtc ctccgacgt tgtcagaagt	5220
aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc	5280
atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa	5340
tagtgatatg gcgcaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca	5400
catagcagaa ctttaaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca	5460
aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct	5520
tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct ggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc	5580
gcaaaaaagg gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa	5640
tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt	5700
tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgggtcc	5760
ttttcatcac gtgctataaa aataattata atttaattt tttaataata atatataaat	5820
taaaaataga aagtaaaaaa agaaattaaa gaaaaaatag tttttgtttt ccgaagatgt	5880
aaaagactct agggggatcg ccaacaaata ctacctttta tcttgcctct cctgctctca	5940
ggtattaatg ccgaattggt tcatcttgtc tgtgtagaag accacacacg aaaatcctgt	6000
gattttacat ttactttatc gttaatcgaa tgtatatcta tttaatctgc ttttcttgtc	6060
taataaatat atatgtaaag tacgcttttt gttgaaattt tttaaacctt tgtttatttt	6120
tttttcttca ttccgtaact cttctacctt ctttattttac ttctataaat ccaaatacaa	6180
aacataaaaa taaataaaca cagagtaaat tcccaaatta ttccatcatt aaaagatacg	6240
aggcgcgtgt aagttacagg caagcgatcc gtccctaagaa accattatta tcatgacatt	6300
aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc	6338

<210> 118

<211> 8726

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<221> fuente

<222> 1..8726

10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="Plásmido pRS313-P7t7-HXT11+GFP" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 118

tcgcgcggttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accataattc cgttttaaga gcttgggtgag cgctaggagt cactgccagg tatcgtttga	240
acacggcatt agtcaggga gtcataaacac agtcctttcc cgcaattttc tttttctatt	300
actcttggcc tcctctagta cactctatat ttttttatgc ctcggtaatg attttcattt	360
ttttttttcc acctagcgga tgactctttt tttttcttag cgattggcat tatcacataa	420
tgaattatac attatataaa gtaatgtgat ttcttcgaag aatatactaa aaaatgagca	480
ggcaagataa acgaaggcaa agatgacaga gcagaaagcc ctagtaaagc gtattacaaa	540
tgaaccaag attcagattg cgatctcttt aaaggggtgt cccctagcga tagagcactc	600
gatcttccca gaaaaagagg cagaagcagt agcagaacag gccacacaat cgcaagtgat	660
taacgtccac acaggtatag ggtttctgga ccatatgata catgctctgg ccaagcattc	720
cggctggtcg ctaatcgttg agtgcatttg tgacttacac atagacgacc atcacaccac	780
tgaagactgc gggattgctc tcggtcaagc ttttaagag gccctactgg cgcgtggagt	840
aaaaagggtt ggatcaggat ttgcgccttt ggatgaggca ctttcagag cggtggtaga	900
tctttcgaa aggccgtacg cagttgtcga acttggtttg caaagggaga aagtaggaga	960
tctctcttgc gagatgatcc cgcattttct tgaaagcttt gcagaggcta gcagaattac	1020
cctccacgtt gattgtctgc gaggcaagaa tgatcatcac cgtagtgaga gtgcgttcaa	1080

ES 2 663 480 T3

ggctcttgcg	gttgccataa	gagaagccac	ctcgcccaat	ggtaccaacg	atgttccttc	1140
caccaaaggt	gttcttatgt	agtgcacccg	attattttaa	gctgcagcat	acgatatata	1200
tacatgtgta	tatatgtata	cctatgaatg	tcagtaagta	tgtatacgaa	cagtatgata	1260
ctgaagatga	caaggtaatg	catcattcta	tacgtgtcat	tctgaacgag	gcgcgctttc	1320
cttttttctt	tttgcttttt	cttttttttt	ctcttgaact	cgacggatca	tatgcggtgt	1380
gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	ggaaattgta	aacgttaata	1440
ttttgtttaa	attcgcgtta	aatttttgtt	aaatcagctc	attttttaac	caataggccg	1500
aaatcggcga	aatcccttat	aaatcaaaa	aatagaccga	gatagggttg	agtgttggtc	1560
cagtttgtaa	caagagtcca	ctattaaaga	acgtggactc	caacgtcaaa	gggcgaaaaa	1620
ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	aaccatcacc	ctaatcaagt	tttttggggt	1680
cgaggtgcgc	taaagcacta	aatcggaacc	ctaaaggag	ccccgattt	agagcttgac	1740
ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaaag	aagggaagaa	agcgaaagga	gcgggcgcta	1800
gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	gcgtaaccac	cacaccgcgc	gcgcttaatg	1860
cgccgctaca	gggcgcgtcg	cgccattcgc	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	1920
gatcggtgcg	ggcctcttcg	ctattacgcc	agctggcgaa	ggggggatgt	gctgcaaggc	1980
gattaagttg	ggtaacgcca	gggttttccc	agtcacgacg	ttgtaaaacg	acggccagtg	2040
aattgtaata	cgactcacta	tagggcgaa	tggagctctc	tcgtaggaac	aatttcgggc	2100
ccctgcgtgt	tcttctgagg	ttcatctttt	acatttgctt	ctgctggata	attttcagag	2160
gcaacaagga	aaaattagat	ggcaaaaagt	cgtctttcaa	ggaaaaatcc	ccaccatctt	2220
tcgagatccc	ctgtaactta	ttggcaactg	aaagaatgaa	aaggaggaaa	atacaaaata	2280
tactagaact	gaaaaaaaa	aagtataaat	agagacgata	tatgccata	cttcacaatg	2340
ttcgaatcta	ttcttcattt	gcagctattg	taaaataata	aaacatcaag	aacaaacaag	2400
ctcaacttgt	cttttctaag	aacaaagaat	aaacacaaaa	acaaaaagtt	tttttaattt	2460
taatcaaaaa	tctagaatgt	caggtgttaa	taatacatcc	gcaaatgagt	tatctactac	2520
catgtctaac	tctaactcag	cagtaggcgc	tccctctggt	aagactgaac	acggtgactc	2580
taaaaattcc	cttaacctag	atgccaatga	gccacctatt	gacttacctc	aaaaaccctt	2640
ctctgcgtat	accaccgtcg	caatcctgtg	tttgatgatt	gcatttggcg	gcttcattctt	2700
tgggtgggat	accggtacca	tttctgggtt	tgtaaacctt	tctgatttca	tcagaagggt	2760
cgggtcaaaaa	aatgacaagg	gaacctacta	cttatcgaaa	gtaagaatgg	gtttgatcgt	2820
ctcaatatcc	aacattggct	gcgccatagg	cggaaattgtc	ttgtcaaaag	tcggtgatat	2880
atatggtcgt	cgtattggat	tgattacagt	tactgccatt	tacgtttag	gcacctaata	2940
ccaaataact	tcataaaca	agtggtagca	atacttcatt	ggaagaatta	tttctggcct	3000

ES 2 663 480 T3

aggagtggga ggcattgctg tcctttcccc aatgttgata tctgaagttg ctcccaaaca	3060
tatcagagga actctggtcc aattgtacca gctgatgggt acgatgggta tttttctagg	3120
atactgtacc aattacggtg ccaagaacta tcacaacgcc actcaatgga gagtccggcct	3180
tggtcctttgc tttgcctggg ctacattcat ggttagtgga atgatgtttg taccagaatc	3240
accacgttac ctgattgagg ttggtaaaga tgaggaagcg aaacgttcac tatcgaaatc	3300
caacaaagtc tcagttgacg atccagcctt gctagttgaa tatgacacta taaaggcagg	3360
aattgaactt gaaaagctgg caggtaacgc atcatggtct gaactactct ccactaaaac	3420
aaaggtcttt cagcgtgttc tcatgggagt gatgatccaa tcgctgcagc aattaaccgg	3480
tgacaactac ttcttttact acggtaccac catcttcaaa tctgtcggtc taaaggactc	3540
ctttcagaact tcgatcatta tcgggtgtgt taattttttc tcttcattca tagcgggtata	3600
caccattgag aggtttggac gccgtacgtg tctattgtgg ggtgctgctt ctatgctatg	3660
ctgctttgct gtgtttgcct ccgtcgggtg gacaaagttg tggcctcaag gaagcagtca	3720
ccaagacatt acttctcagg gcgccggtaa ctgtatgatt gtgtttacta tgttcttcat	3780
tttttcgttc gccaccactt gggcaggcgg ctgttacgtt attgtctcag agacgtttcc	3840
tcttagggtc aaatcaagag gaatggcaat gcgaacagct gcaaactgga tgtggggttt	3900
cctgattagt ttcttttacc cattcattac cggggcaatc aacttttact acggttacgt	3960
attcttaggc tgtctggttt ttgcatactt ttatgtcttt ttctttgtcc cagaaacaaa	4020
aggcctgaca ctggaggagg tgaatactat gtggctggaa ggtgtgccag catggaaatc	4080
ggcctcatgg gtgccaccgg agagaagaac cgcagattac gatgctgatg caatagatca	4140
tgacaataga ccaatttaca agaggttctt ttccagctga cccgggatgg tgagcaaggg	4200
cgaggagctg ttaccggggg tgggtgccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaacgg	4260
ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct	4320
gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg ccacacctcg tgaccaccct	4380
gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt	4440
caagtccgcc atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg	4500
caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga	4560
gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa	4620
ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa	4680
cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctcgccgacc actaccagca	4740
gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgt gctgcccgac aaccactacc tgagcaccca	4800
gtccgcccctg agcaaagatc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc tggagttcgt	4860

ES 2 663 480 T3

gaccgcccgc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaaatcg attttgcgaa 4920
cactttttatt aattcatgat cacgctctaa tttgtgcatt tgaaatgtac tctaattcta 4980
atthttatatt tttaatgata tcttgaaaag taaatacggt tttaatatat acaaaataat 5040
acagtttaat tttcaagttt ttgatcattt gttctcagaa agttgagtg gacggagaca 5100
aagaaacttt aaagagaaat gcaaagtgga aagaagtcag ttgtttaccg accgcactgt 5160
tattcacaaa tattccaatt ttgcctgcag acccacgtct acaaattttg gttagtttg 5220
taaagtgtta ggatatagta gagccttttt gaaatgggaa atatcttctt tttctgtatc 5280
ccgcttcaaa aagtgtctaa tgagtcagtt atttctttct tactcatcgc ccgtcactta 5340
aaagaagaaa aattactttc atgatgcgaa gcgaaaaaaa tttttagctt caattttcac 5400
aatgcatcta tggagaggat attataaggt tacgaaataa attcttgagt gttgtaaatt 5460
ctgttaatca aagaaaaagc aatagctcgt tttctacag aatggctagc acagcaaata 5520
tgattttctc actaaagaaa ctatctatcg cggaaacctgc ggttgccaag gattctcatc 5580
ctgatgtaaa tatcgtggat ttgatgagaa attacatttc acaagaatta agcaagattt 5640
ccggcgtaga ctcgtctctt atttttccag cattagaatg gacaaatact atggagagag 5700
gcgattttgtt gattcctatc ccaagattga gaatcaaagg tgccaatcca aaggattttg 5760
cagtccaatg ggctgaaaaa ttcccatgtg gagattttct ggagaaagtt gaagcgaatg 5820
gcccgttcat ccagtttttc ttcaaccctc aatttttagc aaaaactgtc atcccagata 5880
tottaaccag aaaggaggat tatggttctt gcgtcgacct cgaggggggg cccggtacct 5940
agctttttgtt cccttttagt aggggttaatt ccgagcttgg cgtaatcatg gtcatagetg 6000
tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acataggagc cggaagcata 6060
aagtgtaaa cctgggggtgc ctaatgagtg aggtaaactc cattaattgc gttgcgctca 6120
ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc 6180
gcggggagag gcggtttgog tattgggcgc tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg 6240
cgctcggtcg ttccggtcg gcgagcggtc tcagctcact caaaggcggg aatacggtta 6300
tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc 6360
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctcgccc ccctgacgag 6420
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 6480
caggcgttcc ccctggaag ctccctcgtg cgtctctctg ttccgacct gccgcttacc 6540
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg ctacgctgt 6600
aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc 6660
gttcagcccc accgctgcgc ctatccggg aactatcgtc ttgagtcgaa cccggttaaga 6720
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta 6780

ES 2 663 480 T3

ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta 6840
 tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga 6900
 tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg 6960
 cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag 7020
 tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc 7080
 tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact 7140
 tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt 7200
 cggttcacca tagttgcctg actgcccgct ggtgtagataa ctacgatacg ggagggccta 7260
 ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta 7320
 tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggctcctg aactttatcc 7380
 gcctccatcc agtctattaa ttggtgccg gaagctagag taagtagttc gccagttaat 7440
 agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcggtg tgtcacgctc gtcgtttggt 7500
 atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg 7560
 tgaaaaaag cggtagctc cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca 7620
 gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta 7680
 agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg 7740
 cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact 7800
 ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg 7860
 ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt 7920
 actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaggga 7980
 ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc 8040
 atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa 8100
 caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgggtcctt ttcattcacgt 8160
 gctataaaaa taattataat ttaaattttt taatataaat atataaatta aaaatagaaa 8220
 gtaaaaaaag aaattaaaga aaaaatagtt tttgttttcc gaagatgtaa aagactctag 8280
 ggggatcgcc aacaaatact accttttatt ttgctcttcc tgctctcagg tattaatgcc 8340
 gaattgtttc atcttgtctg tgtagaagac cacacacgaa aatcctgtga ttttacattt 8400
 tacttatcgt taatcgaatg tatatctatt taatctgctt ttcttgtcta ataaatatat 8460
 atgtaaagta cgctttttgt tgaaattttt taaacctttg tttatttttt tttcttcatt 8520
 ccgtaactct tctaccttct ttatttactt tctaaaatcc aaatacaaaa cataaaaata 8580
 aataaacaca gagtaaattc ccaaattatt ccatcattaa aagatacgag gcgcgtgtaa 8640
 gttacaggca agcgatccgt cctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa 8700
 taggcgtatc acgaggccct ttcgtc 8726

<210> 119

5

<211> 1704

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> fuente

5

<222> 1..1704

<223> /organismo="Saccharomyces cerevisiae" /nota="HXT11 ORF RN1053" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 119

atgtcaggtg ttaataatac atccgcaa at gagttatcta ctaccatgtc taactctaac	60
tcagcagtag gcgctccctc tgttaagact gaacacggtg actctaaaaa ttcccttaac	120
ctagatgcc aatgagccacc tattgactta cctcaaaaac ccctctctgc gtataccacc	180
gtcgcaatcc tgtgtttgat gattgcattt ggcggcttca tctttggttg ggataccggt	240
accatttctg gttttgttaa cctttctgat ttcatacaga ggttcggtca aaaaaatgac	300
aagggaacct actacttata gaaagtaaga atgggtttga tcgtctcaat attcaacatt	360
ggctgcgcca taggcggaat tgtcttgc caaagtcggtg atatatatgg tcgtcgtatt	420
ggattgatta cagttactgc catttacgtt gtaggcattc taatccaaat aacttcata	480
aacaagtgt accaatactt cattggaaga attatttctg gcctaggagt gggaggcatt	540
gctgtccttt cccaatgtt gatatacga gttgctcca aacatacag aggaactctg	600
gtccaattgt accagctgat gggtagcatg ggtatttttc taggatactg taccaattac	660
ggtaccaaga actatcaca cgcactcaa tggagagtcg gccttggtct ttgctttgcc	720
tgggctacat tcatggttag tggaatgatg tttgtaccag aatcaccacg ttacctgatt	780
gaggttggt aagatgagga agcgaaacgt tcactatcga aatccaaca agtctcagtt	840
gacgatccag ccttgctagt tgaatatgac actataaagg caggaattga acttgaaaag	900
ctggcaggt aacgatcatg gtctgaacta ctctccacta aaacaaagg ctttcagcgt	960
gttctcatgg gagtgatgat ccaatcgctg cagcaattaa ccggtgaca ctacttcttt	1020
tactacggt ccaccatctt caaatctgtc ggtctaaagg actcctttca gacttcgac	1080
attatcggtg tggtaattt tttctcttca ttcatacagg tatacaccat tgagaggttt	1140
ggacgcgta cgtgtctatt gtgggtgct gcttctatgc tatgctgctt tgctgtgtt	1200
gcctccgtc gtgtgacaaa gttgtggcct caaggaagca gtcaccaaga cattacttct	1260
cagggcgccg gtaactgtat gattgtgtt actatgttct tcattttttc gttcgccacc	1320
acttgggcag gcggctgtta cgttattgtc tcagagacgt ttctcttag ggtcaaatca	1380

ES 2 663 480 T3

```

agaggaatgg caatcgcaac agctgcaaac tggatgtggg gtttcctgat tagtttcttt 1440
acccattca ttaccggggc aatcaacttt tactacggtt acgtattctt aggctgtctg 1500
gtttttgcat acttttatgt ctttttcttt gtcccagaaa caaaaggcct gacactggag 1560
gaggtgaata ctatgtggct ggaagggtgtg ccagcatgga aatcggcctc atgggtgcc 1620
ccggagagaa gaaccgcaga ttacgatgct gatgcaatag atcatgacaa tagaccaatt 1680
tacaagaggt tcttttccag ctga 1704

```

<210> 120

<211> 1626

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1626

<223> /organismo="Saccharomyces cerevisiae" /nota="HXT2 ORF" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 120

ES 2 663 480 T3

```

atgtctgaat tcgctactag ccgcgttgaa agtggtctct aacaaacttc tatccactct      60
actccgatag tgcagaaatt agagacggat gaatctccta ttcaaaccac atctgaatac      120
actaacgctg aactcccagc aaagccaatc gccgcatatt ggactgttat ctgtttatgt      180
ctaagtattg catttggtgg gtttgtcttt ggttgggata ctggtaccat ctctggtttt      240
gttaatcaaa ccgatttcaa aagaagattt ggtcaaatga aatctgatgg tacctattat      300
ctttcggacg tccggactgg tttgatcgtt ggtatcttca atattggttg tgcctttggt      360
gggttaacct taggacgtct gggatgatatg tatggacgta gaattgggtt gatgtgcgtc      420
gttctgggat acatcgttgg tattgtgatt caaatgtctt ctagtacaa atggtaccaa      480
tatttcattg gtagaattat ctctggatg ggtgtcgggt gtattgctgt cctatctcca      540
actttgattt ccgaaacagc accaaaacac attagaggta cctgtgtttc tttctatcag      600
ttaatgatca ctctaggtat tttcttaggt tactgtacca actatggtac taaagactac      660
tccaattcag ttcaatggag agtgcctttg ggtttgaact ttgccttcgc tattttcatg      720
atcgctggtg tgctaattgg tccagaatct ccaagattct tagtcgaaaa aggcagatac      780
gaagacgcta aacgttcttt ggcaaatct aacaaagtca ccattgaaga tccaagtatt      840
gttgctgaaa tggatacaat tatggccaac gttgaaactg aaagattagc cggtaacgct      900
tcttggtgtg agttattctc caacaaaggt gctattttac ctctgtgat tatgggtatt      960
atgattcaat cttacaaca attaactggt aacaattact tcttctatta tggactact      1020
attttcaacg ccgtcggat gaaagattct ttccaaactt ccatcgtttt aggtatagtc      1080
aacttcgcat ccactttcgt ggctttatac actgttgata aatttggtcg tcgtaagtgt      1140
ctattgggtg gttctgcttc catggccatt tgttttgtaa tcttctctac tgtcgggtgc      1200
acaagcttat atccaatgg taaagatcaa ccatcttcca aggtgcccgc taacgtcatg      1260
attgtcttta cctgtttatt cattttcttc ttcgctatta gttgggcccc aattgcctac      1320
gttattgttg ccgaatccta tcctttgcgt gtcaaaaatc gtgctatggc tattgtggtt      1380
ggtgccaaact ggatttgggg tttcttgatt ggtttcttca ctcccttcat tacaagtgca      1440
attggatttt catacgggta tgtcttcatg ggctgtttgg tattttcatt cttctacgtg      1500
tttttctttg tctgtgaaac caagggctta acattagagg aagttaatga aatgtatgtt      1560
gaaggtgtca aaccatggaa atctggtagc tggatctcaa aagaaaaaag agtttccgag      1620
gaataa                                         1626

```

<210> 121

5 <211> 1725

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

10 <221> fuente

<222> 1..1725

<223> /organismo="Saccharomyces cerevisiae" /nota="GAL2 ORF" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 121

5

```

atggcagttg aggagaacaa tatgcctggt gtttcacagc aacccaagc tggatgaagac      60
gtgatctctt cactcagtaa agattcccat ttaagcgac aatctcaaaa gtattccaat      120
gatgaattga aagccggtga gtcagggcct gaaggctccc aaagtgttcc tatagagata      180
cccaagaagc ccatgtctga atatgttacc gtttccttgc tttgtttgtg tgttgccctc      240
ggcggcctca tgtttggctg ggataccggt actatttctg ggtttgttgt ccaaacagac      300
tttttgagaa ggtttggtat gaaacataag gatggtaccc actatttgtc aaacgtcaga      360
acagggttaa tcgtcgccat tttcaatatt ggctgtgcct ttggtggtat tatactttcc      420
aaagggtgag atatgtatgg ccgtaaaaag ggtctttcga ttgtcgtctc ggtttatata      480
gttggattta tcattcaaatt tgcctctatc aacaagtggg accaatatct cattggtaga      540
atcatatctg gtttgggtgt cggcggcctc gccgtcttat gtcctatggt gatctctgaa      600
attgctcaa agcacttgag aggcacacta gtttcttgtt atcagctgat gattactgca      660
ggtatctttt tgggctactg tactaattac ggtacaaaga gctattcgaa ctcagttcaa      720
tgagaggttc cattagggct atgtttcgct tggtcattat ttatgattgg cgctttgacg      780
ttagttcctg aatccccacg ttatttatgt gaggtgaata aggtagaaga cgccaagctt      840
tcatttgcta agtctaacaa ggtgtcacca gaggatcctg ccgtccaggc agagtttagat      900
ctgatcatgg ccggtataga agctgaaaaa ctggctggca atgcgtcctg gggggaatta      960
ttttccacca agaccaaagt atttcaacgt ttgttgatgg gtgtatttgt tcaaattgtc     1020
caacaattaa ccgtaacaa ttattttttc tactacggta ccgttatctt caagtcagtt     1080
ggcctggatg attcctttga aacatccatt gtcattgggt tagtcaactt tgcctccact     1140
ttcttttagt tgtggactgt cgaaaacttg gggcgtcgta aatgtttact tttggcgct     1200
gccactatga tggcttgat ggtcatctac gcctctgttg gtgttaccag attatacct     1260
cacggtaaaa gccagccatc ttctaaaggt gccgtaact gtatgattgt ctttacctgt     1320
ttttatattt tctgttatgc cacaacctgg gcgccagttg cctgggtcat cacagcagaa     1380
tcattccac tgagagtcaa gtcgaaatgt atggcgttgg cctctgcttc caattgggta     1440
tggggggtct tgattgcatt tttcacccca ttcacacat ctgccattaa cttctactac     1500
ggttatgtct tcatgggctg tttgggtgcc atgttttttt atgtcttttt ctttgttcca     1560
gaaactaaag gcctatcgtt agaagaaatt caagaattat gggaagaag tgttttacct     1620
tggaatctg aaggctggat tccttcatcc agaagaggta ataattacga tttagaggat     1680
ttacaacatg acgacaaacc gtggtacaag gccatgctag aataa                       1725

```

<210> 122

<211> 1704

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5 <220>

<221> fuente

<222> 1..1704

<223> /organismo="Saccharomyces cerevisiae" /nota="HXT3-6 ORF" /tipo_mol="ADN no asignado"

10 <400> 122

```

atgaattcaa ctccagattt aatatctcca caaaagtcaa gtgagaattc gaatgctgac      60
ctgccttcga atagctctca ggtaatgaac atgcctgaag aaaaagggtg tcaagatgat      120
ttccaagctg aggccgacca agtacttacc aacccaataa caggtaaagg tgcataatgtc      180
actgtgtcta tctgttgtgt tatggttgcc ttcggtggtt tcgttttcgg ttgggataact      240
ggtaccatth ctggtttcgt cgcccaaact gatttcttga gaagattcgg tatgaagcat      300
aaagatggta gttattatth gtctaagggtt agaactgggt taattgtctc cattttcaac      360
attgggtgtg ccattgggtg tattatthtg gctaaattgg gtgatatgta cggtcgtaaa      420
atgggthtga ttgtcgttgt tgttatctac atcatcggta ttattattca aattgcatcc      480
atcaacaaat ggtaccaata ttcatcgggt agaattatth ccggthtggg tgttggtggt      540
attgccgtht tatctctat gtthgatttct gaagtcgctc ctaaggaaat gagaggtact      600

```

ES 2 663 480 T3

ttagtctcct gttaccaact gatgattacc ttgggtatatt tcttgggtta ctgtaccaac	660
ttcggtaacta agaactactc caactctgtg caatggagag ttccattagg tttgtgtttt	720
gcctgggctt tgtttatgat cgggtggatg actttcgttc cagaatcccc acgttatattg	780
gttgaagctg gtcaaatga cgaagcaaga gcatctcttt ccaaagttaa caaggttgcc	840
ccagaccatc cattcattca acaagagttg gaagttattg aagctagtgt tgaagaagct	900
agagctgctg gttcagcatc atggggtgag ttgttcaactg gtaagccggc catgtttaag	960
cgtactatga tgggtatcat gatccaatct ctacaacaat tgactgggtga taactatttc	1020
ttctactatg gtactaccgt ttttaacgct gttggatga gtgattcttt cgaaacttct	1080
attgttttcg gtgtcgtcaa cttcttctct acttgttgtt ctttgtacac tgtcgatcgt	1140
tttggacgtc gtaactgttt gttatatggt gccattggta tggctcgtg ttatgtagtt	1200
tacgcttctg ttggtgtcac cagactatgg ccaaattggtg aaggtaatgg ttcaccaag	1260
ggtgctggta actgtatgat tgtctttgcc tgtttctata ttttctgttt tgctactaca	1320
tgggctccaa ttcttatgt cgttggttct gaaactttcc cattgagagt caagtctaag	1380
gctatgtcta ttgctacagc tgctaattgg ttgtggggtt tcttgattgg tttcttcaact	1440
ccatttatta ctgggtctat taacttctac tacgggttacg ttttcatggg ctgtttggtc	1500
ttcatgttct tctatgtttt gttagttgtt ccagaaacta agggtttgac tttggaagaa	1560
gtcaacacca tgtgggaaga aggtgttcta ccatggaagt ctgcctcatg ggttccacca	1620
tctagaagag gtgccaacta cgacgctgaa gaaatggctc acgatgataa gccattgtac	1680
aagagaatgt tcagcaccaa ataa	1704

<210> 123

<211> 567

5

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> Hxt11p

10

<400> 123

ES 2 663 480 T3

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

[illegible]

<210> 124

<211> 541

5 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> Hxt2p

<400> 124

```

Met Ser Glu Phe Ala Thr Ser Arg Val Glu Ser Gly Ser Gln Gln Thr
1      5      10      15
Ser Ile His Ser Thr Pro Ile Val Gln Lys Leu Glu Thr Asp Glu Ser
20      25      30
Pro Ile Gln Thr Lys Ser Glu Tyr Thr Asn Ala Glu Leu Pro Ala Lys
35      40      45
Pro Ile Ala Ala Tyr Trp Thr Val Ile Cys Leu Cys Leu Met Ile Ala
50      55      60
Phe Gly Gly Phe Val Phe Gly Trp Asp Thr Gly Thr Ile Ser Gly Phe
65      70      75      80
Val Asn Gln Thr Asp Phe Lys Arg Arg Phe Gly Gln Met Lys Ser Asp
85      90      95
Gly Thr Tyr Tyr Leu Ser Asp Val Arg Thr Gly Leu Ile Val Gly Ile
100      105      110
Phe Asn Ile Gly Cys Ala Phe Gly Gly Leu Thr Leu Gly Arg Leu Gly
115      120      125
Asp Met Tyr Gly Arg Arg Ile Gly Leu Met Cys Val Val Leu Val Tyr
130      135      140
Ile Val Gly Ile Val Ile Gln Ile Ala Ser Ser Asp Lys Trp Tyr Gln
145      150      155      160
Tyr Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Met Gly Val Gly Gly Ile Ala
165      170      175
Val Leu Ser Pro Thr Leu Ile Ser Glu Thr Ala Pro Lys His Ile Arg
180      185      190
Gly Thr Cys Val Ser Phe Tyr Gln Leu Met Ile Thr Leu Gly Ile Phe
195      200      205
Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Tyr Gly Thr Lys Asp Tyr Ser Asn Ser Val
210      215      220
Gln Trp Arg Val Pro Leu Gly Leu Asn Phe Ala Phe Ala Ile Phe Met
225      230      235      240
Ile Ala Gly Met Leu Met Val Pro Glu Ser Pro Arg Phe Leu Val Glu
245      250      255
Lys Gly Arg Tyr Glu Asp Ala Lys Arg Ser Leu Ala Lys Ser Asn Lys
260      265      270
Val Thr Ile Glu Asp Pro Ser Ile Val Ala Glu Met Asp Thr Ile Met
275      280      285
Ala Asn Val Glu Thr Glu Arg Leu Ala Gly Asn Ala Ser Trp Gly Glu
290      295      300
Leu Phe Ser Asn Lys Gly Ala Ile Leu Pro Arg Val Ile Met Gly Ile
305      310      315      320
Met Ile Gln Ser Leu Gln Gln Leu Thr Gly Asn Asn Tyr Phe Phe Tyr
325      330      335
Tyr Gly Thr Thr Ile Phe Asn Ala Val Gly Met Lys Asp Ser Phe Gln
340      345      350
Thr Ser Ile Val Leu Gly Ile Val Asn Phe Ala Ser Thr Phe Val Ala
355      360      365
Leu Tyr Thr Val Asp Lys Phe Gly Arg Arg Lys Cys Leu Leu Gly Gly
370      375      380
Ser Ala Ser Met Ala Ile Cys Phe Val Ile Phe Ser Thr Val Gly Val
385      390      395      400
Thr Ser Leu Tyr Pro Asn Gly Lys Asp Gln Pro Ser Ser Lys Ala Ala
405      410      415
Gly Asn Val Met Ile Val Phe Thr Cys Leu Phe Ile Phe Phe Ala
420      425      430
Ile Ser Trp Ala Pro Ile Ala Tyr Val Ile Val Ala Glu Ser Tyr Pro
435      440      445
Leu Arg Val Lys Asn Arg Ala Met Ala Ile Ala Val Gly Ala Asn Trp
450      455      460
Ile Trp Gly Phe Leu Ile Gly Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala

```

ES 2 663 480 T3

465					470					475				480
Ile	Gly	Phe	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Val	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Val	Phe
					485					490				495
Phe	Phe	Tyr	Val	Phe	Phe	Phe	Val	Cys	Glu	Thr	Lys	Gly	Leu	Thr
			500					505					510	
Glu	Glu	Val	Asn	Glu	Met	Tyr	Val	Glu	Gly	Val	Lys	Pro	Trp	Lys
		515					520					525		
Gly	Ser	Trp	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Arg	Val	Ser	Glu	Glu		
	530					535					540			

<210> 125

<211> 574

5

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> Gal2p

10

<400> 125

ES 2 663 480 T3

Met	Ala	Val	Glu	Glu	Asn	Asn	Met	Pro	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Pro	Gln
1				5					10				15		
Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Ser	His	Leu	Ser
		20						25					30		
Ala	Gln	Ser	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asn	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Ser
		35					40					45			
Gly	Ser	Glu	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Pro	Ile	Glu	Ile	Pro	Lys	Lys	Pro
	50					55					60				
Met	Ser	Glu	Tyr	Val	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Leu	Cys	Val	Ala	Phe
65					70					75					80
Gly	Gly	Phe	Met	Phe	Gly	Trp	Asp	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Val
				85					90					95	
Val	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Arg	Arg	Phe	Gly	Met	Lys	His	Lys	Asp	Gly
			100					105					110		
Thr	His	Tyr	Leu	Ser	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Phe
		115					120					125			
Asn	Ile	Gly	Cys	Ala	Phe	Gly	Gly	Ile	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Gly	Asp
	130					135					140				
Met	Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Val	Ser	Val	Tyr	Ile
145					150					155					160
Val	Gly	Ile	Ile	Ile	Gln	Ile	Ala	Ser	Ile	Asn	Lys	Trp	Tyr	Gln	Tyr
				165					170					175	
Phe	Ile	Gly	Arg	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Ile	Ala	Val
		180						185					190		
Leu	Cys	Pro	Met	Leu	Ile	Ser	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	His	Leu	Arg	Gly
		195					200					205			
Thr	Leu	Val	Ser	Cys	Tyr	Gln	Leu	Met	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Phe	Leu
	210					215					220				
Gly	Tyr	Cys	Thr	Asn	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ser	Val	Gln
225				230						235					240
Trp	Arg	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Cys	Phe	Ala	Trp	Ser	Leu	Phe	Met	Ile
				245					250					255	
Gly	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Glu	Ser	Pro	Arg	Tyr	Leu	Cys	Glu	Val
		260						265					270		
Asn	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Lys	Arg	Ser	Ile	Ala	Lys	Ser	Asn	Lys	Val
		275					280					285			
Ser	Pro	Glu	Asp	Pro	Ala	Val	Gln	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu	Ile	Met	Ala
	290					295					300				
Gly	Ile	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Trp	Gly	Glu	Leu
305					310					315					320
Phe	Ser	Thr	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met	Gly	Val	Phe
				325					330					335	
Val	Gln	Met	Phe	Gln	Gln	Leu	Thr	Gly	Asn	Asn	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Tyr
			340					345					350		

Gly	Thr	Val	Ile	Phe	Lys	Ser	Val	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Glu	Thr
		355					360					365			
Ser	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Ala	Ser	Thr	Phe	Phe	Ser	Leu
	370					375					380				
Trp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Gly	His	Arg	Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala
385					390					395					400
Ala	Thr	Met	Met	Ala	Cys	Met	Val	Ile	Tyr	Ala	Ser	Val	Gly	Val	Thr
			405						410					415	
Arg	Leu	Tyr	Pro	His	Gly	Lys	Ser	Gln	Pro	Ser	Ser	Lys	Gly	Ala	Gly
			420					425					430		
Asn	Cys	Met	Ile	Val	Phe	Thr	Cys	Phe	Tyr	Ile	Phe	Cys	Tyr	Ala	Thr
		435					440					445			
Thr	Trp	Ala	Pro	Val	Ala	Trp	Val	Ile	Thr	Ala	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu
	450					455					460				
Arg	Val	Lys	Ser	Lys	Cys	Met	Ala	Leu	Ala	Ser	Ala	Ser	Asn	Trp	Val
465					470					475					480
Trp	Gly	Phe	Leu	Ile	Ala	Phe	Phe	Thr	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Ala	Ile
			485					490						495	
Asn	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Val	Phe	Met	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Met	Phe
			500					505					510		
Phe	Tyr	Val	Phe	Phe	Phe	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Gly	Leu	Ser	Leu	Glu
		515					520					525			
Glu	Ile	Gln	Glu	Leu	Trp	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Trp	Lys	Ser	Glu
	530					535					540				
Gly	Trp	Ile	Pro	Ser	Ser	Arg	Arg	Gly	Asn	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Asp
545					550					555					560
Leu	Gln	His	Asp	Asp	Lys	Pro	Trp	Tyr	Lys	Ala	Met	Leu	Glu		
				565					570						

<210> 126

<211> 508

5

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> Hxt3-6p

10

<400> 126


```

Met Asn Ser Thr Pro Asp Leu Ile Ser Pro Gln Lys Ser Ser Glu Asn
 1      5      10      15
Ser Asn Ala Asp Leu Pro Ser Asn Ser Ser Gln Val Met Asn Met Pro
      20      25      30
Glu Glu Lys Gly Val Gln Asp Asp Phe Gln Ala Glu Ala Asp Gln Val
      35      40      45
Leu Thr Asn Pro Asn Thr Gly Lys Gly Ala Tyr Val Thr Val Ser Ile
      50      55      60
Cys Cys Val Met Val Ala Phe Gly Gly Phe Val Phe Gly Trp Asp Thr
      65      70      75      80
Gly Thr Ile Ser Gly Phe Val Ala Gln Thr Asp Phe Leu Arg Arg Phe
      85      90      95
Gly Met Lys His Lys Asp Gly Ser Tyr Tyr Leu Ser Lys Val Arg Thr
      100      105      110
Gly Leu Ile Val Ser Ile Ile Asn Ile Gly Cys Ala Ile Gly Gly Ile
      115      120      125
Ile Leu Ala Lys Leu Gly Asp Met Tyr Gly Arg Lys Met Gly Leu Ile
      130      135      140
Val Val Val Val Ile Tyr Ile Ile Gly Ile Ile Gln Ile Ala Ser
      145      150      155      160
Ile Asn Lys Trp Tyr Gln Tyr Phe Ile Gly Arg Ile Ile Ser Gly Leu
      165      170      175
Gly Val Gly Gly Ile Ala Val Leu Ser Pro Met Leu Ile Ser Glu Val
      180      185      190
Ala Pro Lys Glu Met Arg Gly Thr Leu Val Ser Cys Tyr Gln Leu Met
      195      200      205
Ile Thr Leu Gly Ile Phe Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Phe Gly Thr Lys
      210      215      220
Asn Tyr Ser Asn Ser Val Gln Trp Arg Val Pro Leu Gly Leu Cys Phe
      225      230      235      240
Ala Trp Ala Leu Phe Met Ile Gly Gly Met Thr Phe Val Pro Glu Ser
      245      250      255
Pro Arg Tyr Leu Val Glu Ala Gly Gln Ile Asp Glu Ala Arg Ala Ser
      260      265      270
Leu Ser Lys Val Asn Lys Val Ala Pro Asp His Pro Phe Ile Gln Gln
      275      280      285
Glu Leu Glu Val Ile Glu Ala Ser Val Glu Glu Ala Arg Ala Ala Gly
      290      295      300
Ser Ala Ser Trp Gly Glu Leu Phe Thr Gly Lys Pro Ala Met Phe Lys
      305      310      315      320
Arg Thr Met Met Gly Ile Met Ile Gln Ser Leu Gln Gln Leu Thr Gly
      325      330      335
Asp Asn Tyr Phe Phe Tyr Tyr Gly Thr Thr Val Phe Asn Ala Val Gly
      340      345      350
Met Ser Asp Ser Phe Glu Thr Ser Ile Val Phe Gly Val Val Asn Phe
      355      360      365
Phe Ser Thr Cys Cys Ser Leu Tyr Thr Val Asp Arg Phe Gly Arg Arg
      370      375      380
Asn Cys Leu Leu Tyr Gly Ala Ile Gly Met Val Cys Cys Tyr Val Val
      385      390      395      400
Tyr Ala Ser Val Gly Val Thr Arg Leu Trp Pro Asn Gly Glu Gly Asn
      405      410      415
Gly Ser Ser Lys Gly Ala Gly Asn Cys Met Ile Cys Phe Ala Cys Phe
      420      425      430
Tyr Ile Phe Cys Phe Ala Thr Thr Trp Ala Pro Ile Ala Tyr Val Val
      435      440      445
Ile Ser Glu Thr Phe Pro Leu Arg Val Lys Ser Lys Ala Met Ser Ile
      450      455      460
Ala Thr Ala Ala Asn Trp Leu Trp Gly Phe Leu Ile Gly Phe Phe Thr
      465      470      475      480
Pro Phe Ile Thr Gly Ala Ile Asn Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met
      485      490      495
Gly Cys Gln Glu Gln Thr Ser Ser Thr Cys Leu Phe
      500      505

```

<210> 127

<211> 38

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
 <222> 1..38
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador F HXT36 Bcui" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 127

10 gcatactagt atgaattcaa ctccagattt aatatctc 38

<210> 128
 <211> 30
 <212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <222> 1..30

20 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador R HXT36 367NNN" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 128

caacaagtag agaagaannn gacgacaccg 30

<210> 129
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador F HXT36 367NNN" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 129

35 cggtgtcgtc nnnttctct ctactgttg 30

<210> 130
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador R HXT36 BamHI" /tipo_mol="ADN no asignado"
 10
 <400> 130
 acgtggatcc ttatttggtg ctgaacattc tcttgt 36
 <210> 131
 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador R HXT36 BamHI-stop" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 131
 25
 ccatggatcc ttggtgctg aacattctct tgtac 35
 <210> 132
 <211> 31
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..31
 35
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador F GFP BamHI" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 132

ES 2 663 480 T3

aaaggatcca tggtagagcaa gggcgaggag c 31

<210> 133

<211> 28

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..28

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="cebador R GFP ClaI" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 133

aaaatcgatt tactgtaca gctcgtcc 28

15

<210> 134

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<222> 1..36

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 XbaI" /tipo_mol="ADN no asignado"

25

<400> 134

ggcctctaga atgtcaggtg ttaataatac atccgc 36

<210> 135

30 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

<222> 1..39

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 BamHI" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 135
 cgatggatcc tcagctggaa aagaacctct tgtaaattg 39

5 <210> 136
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 366NNN" /tipo_mol="ADN no asignado"

15 <400> 136
 cgggtgtggtt nnnnttttct cttcattc 28

20 <210> 137
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 366NNN" /tipo_mol="ADN no asignado"

30 <400> 137
 gaatgaagag aaaaannnaa ccacaccg 28

35 <210> 138
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28

ES 2 663 480 T3

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366F" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 138
cggtgtggtt ttttttct cttcattc 28

5

<210> 139
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<221> fuente
<222> 1..28
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366F" /tipo_mol="ADN no asignado"

15

<400> 139
gaatgaagag aaaaaaaaaa ccacaccg 28

<210> 140
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<221> fuente
<222> 1..28
<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366E" /tipo_mol="ADN no asignado"

25

<400> 140
cggtgtggtt gagttttct cttcattc 28

30

<210> 141
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366E" /tipo_mol="ADN no asignado"

5 <400> 141
 gaatgaagag aaaaactcaa ccacaccg 28

<210> 142
 <211> 28

10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

15 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366K" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 142
 cgggtgtggtt aaatttttct cttcattc 28

20 <210> 143
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366K " /tipo_mol="ADN no asignado"

30 <400> 143
 gaatgaagag aaaaatttaa ccacaccg 28

<210> 144
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366M" /tipo_mol="ADN no asignado"
 5
 <400> 144
 cggtgtgggt atgttttct cttcattc 28
 <210> 145
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366M" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 145
 20 gaatgaagag aaaaacataa ccacaccg 28
 <210> 146
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 30 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366W" /tipo_mol="ADN no asignado"
 <400> 146
 cggtgtgggt tggttttct cttcattc 28
 35 <210> 147
 <211> 28
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <222> 1..28

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366W" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 147

gaatgaagag aaaaacaaaa ccacaccg 28

10

<210> 148

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<222> 1..28

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="F HXT11 N366Y" /tipo_mol="ADN no asignado"

20

<400> 148

cggtgtggtt tatttttct cttcattc 28

<210> 149

25 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

<222> 1..28

<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota="R HXT11 N366Y" /tipo_mol="ADN no asignado"

<400> 149

35 gaatgaagag aaaaaataaa ccacaccg 28

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido que tiene una o más sustituciones en una posición correspondiente a la posición 339 o 376 de SEQ ID NO: 59, en la que el polipéptido es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), polipéptido que es polipéptido de hexosa permeasa, en el que, cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 376, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene un volumen de van der Waals de 80 a 138 Å³ y una hidrofobia de cadena lateral de 10 a 100 ΔtR, y cuando la sustitución es en la posición correspondiente a 339, el aminoácido en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una hidrofobia de cadena lateral de -30 a 10 ΔtR y un volumen de van der Waals de 80 a 160 Å³.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que tiene uno o más aminoácidos correspondientes a 339N/V, o 376I/M/V.
- 10 3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido tiene actividad de transporte de glucosa reducida en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 59.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido tiene actividad de transporte de xilosa mejorada en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 59.
- 15 5. Polipéptido según la reivindicación 1, en la que el polipéptido tiene actividad de transporte de glucosa reducida y actividad de transporte de xilosa mejorada en comparación con el polipéptido que tiene SEQ ID NO: 59.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende secuencias que contienen uno o más de los siguientes motivos de aminoácido:

G-R-x(3)-G-x(3)-G-x(11)-E-x(5)-[LIVM]-R-G-x(12)-[GA];

R-x(14)-G-x(2)-Y-x(2)-[YF]-[YF]-[GSAL] y/o

V-x(15)-[GNR]-[RH]-R-x(2)-[LM]-x(2)-[GA]
- 20 en el que los fragmentos en (a) a (c) en el polipéptido se corresponden con las posiciones en SEQ ID NO: 59.
7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprenden un motivo G-R-x(3)-G-x(3)-G-x(11)-E-x(5)-[LIVM]-R-G-x(12)-[GA].
- 25 8. Polinucleótido que tiene al menos el 50 % de identidad con SEQ ID NO: 56, que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Construcción de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8.
10. Célula hospedadora transformada con la construcción de ácidos nucleicos de la reivindicación 9.
11. Célula hospedadora transformada según la reivindicación 10, que es una eucariota.
12. Célula hospedadora transformada según la reivindicación 11, que es levadura.
- 30 13. Célula hospedadora transformada según la reivindicación 12, que pertenece al género *Saccharomyces*, en particular la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
14. Célula hospedadora transformada que comprende un nucleótido heterólogo que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o codifica un polipéptido que tiene la sustitución M339S o N376C de secuencia ID NO: 59.
- 35 15. Hospedador transformado según la reivindicación 14, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que es un mutante de un polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada.
16. Célula hospedadora transformada según la reivindicación 14 o 15, en la que el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS).
- 40 17. Célula hospedadora transformada según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en la que el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un polipéptido de transportador de hexosa.
18. Célula hospedadora transformada según la reivindicación 17, en la que el polipéptido que es nativo en la célula hospedadora no transformada es un transportador polipéptido elegido de la lista que consiste en Gal2, Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt5, Hxt6, Hxt7, Hxt8, Hxt9, Hxt10, Hxt11, Hxt12, Hxt13, Hxt14, Hxt15, Hxt16 y Hxt17.
- 45 19. Uso de un polipéptido que tiene una sustitución correspondiente a N376T de SEQ ID NO: 59, como un transportador de xilosa, en el que el polipéptido es un miembro de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) y el polipéptido es un polipéptido de hexosa permeasa.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que el polipéptido se expresa en una célula eucariota y la célula eucariota se usa para fermentar xilosa en presencia de glucosa.

5 21. Proceso para la degradación de material lignocelulósico o hemicelulósico, en el que el material lignocelulósico o hemicelulósico se pone en contacto con una composición de enzima, en el que se producen uno o más azúcares, y en el que el azúcar producido se fermenta para dar un producto de fermentación, en el que la fermentación se realiza con una célula hospedadora transformada de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18.

22. Proceso según la reivindicación 21, en el que el azúcar producido comprende xilosa y glucosa y en el que la célula co-fermenta xilosa y glucosa.

10 23. Proceso según la reivindicación 22, en el que el producto de fermentación es uno o más de etanol, butanol, ácido láctico, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un suplemento para pienso para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química.

24. Proceso según la reivindicación 23, en el que el producto de fermentación es uno o más de etanol, butanol, ácido láctico, di-terpeno, di-terpeno glucosilado, un plástico, un ácido orgánico, un disolvente, un suplemento para pienso para animales, un producto farmacéutico, una vitamina, un aminoácido, una enzima o una materia prima química.

15

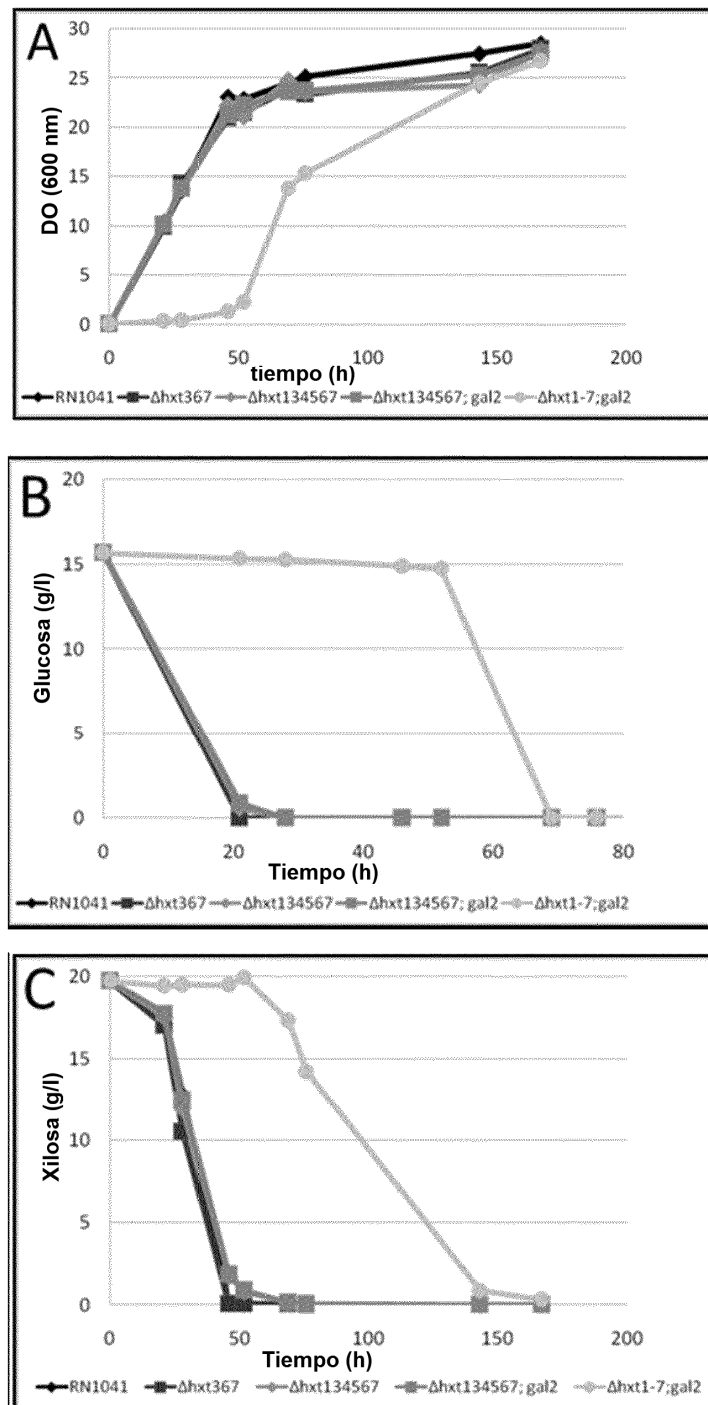


FIG. 1

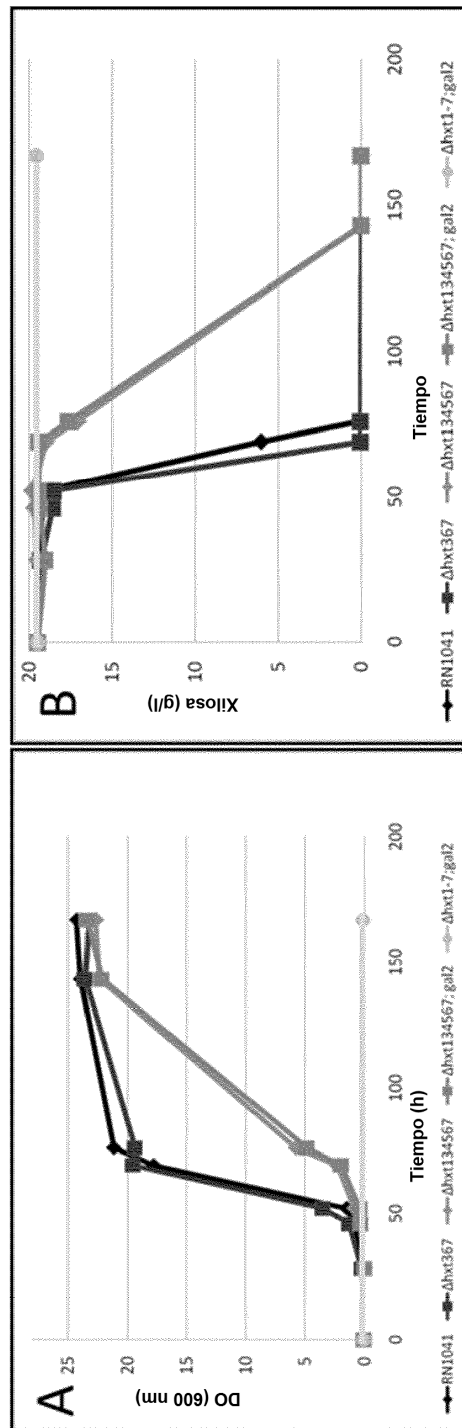


FIG. 2

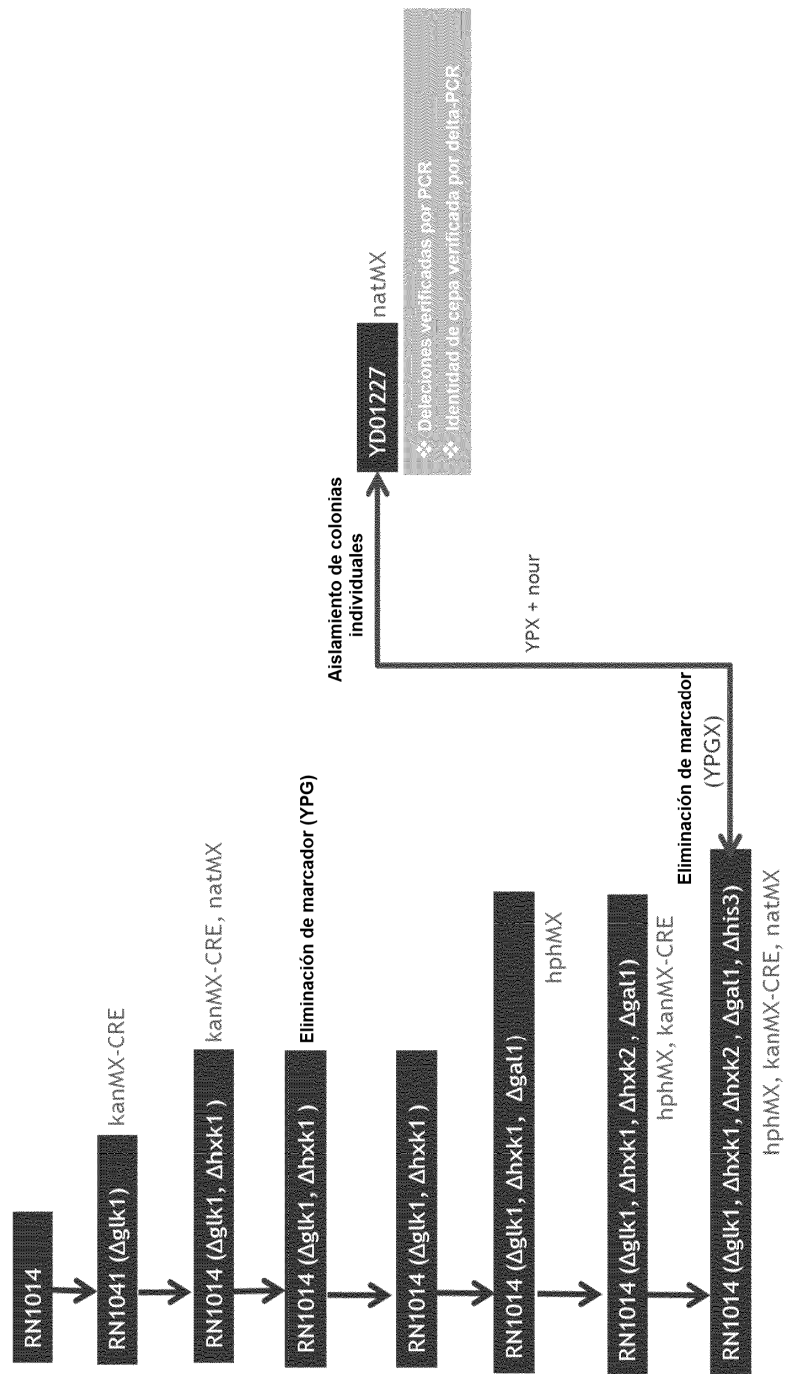


FIG. 3

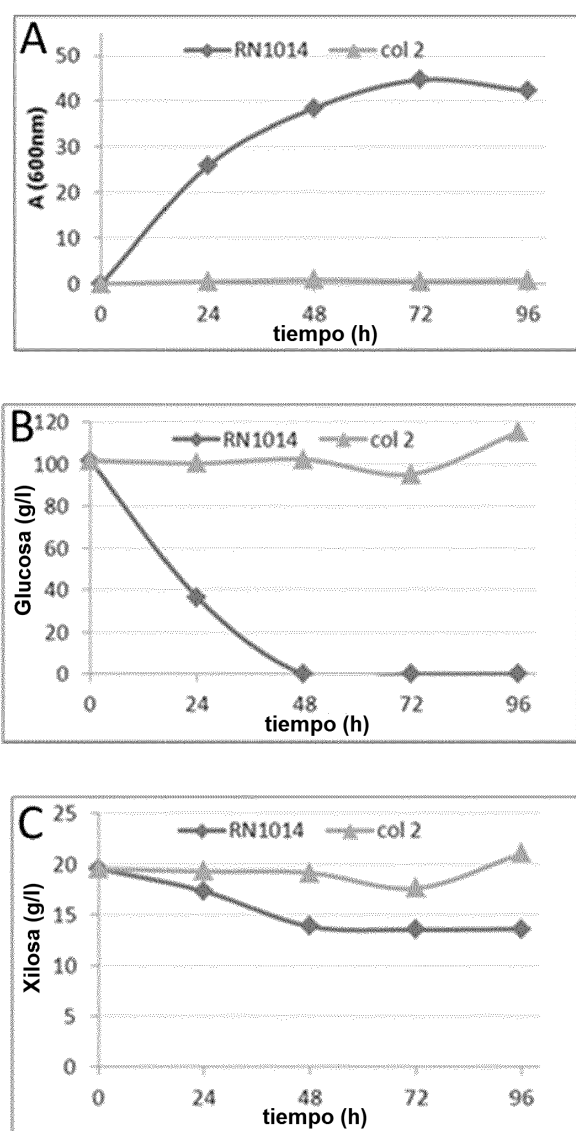


FIG. 4

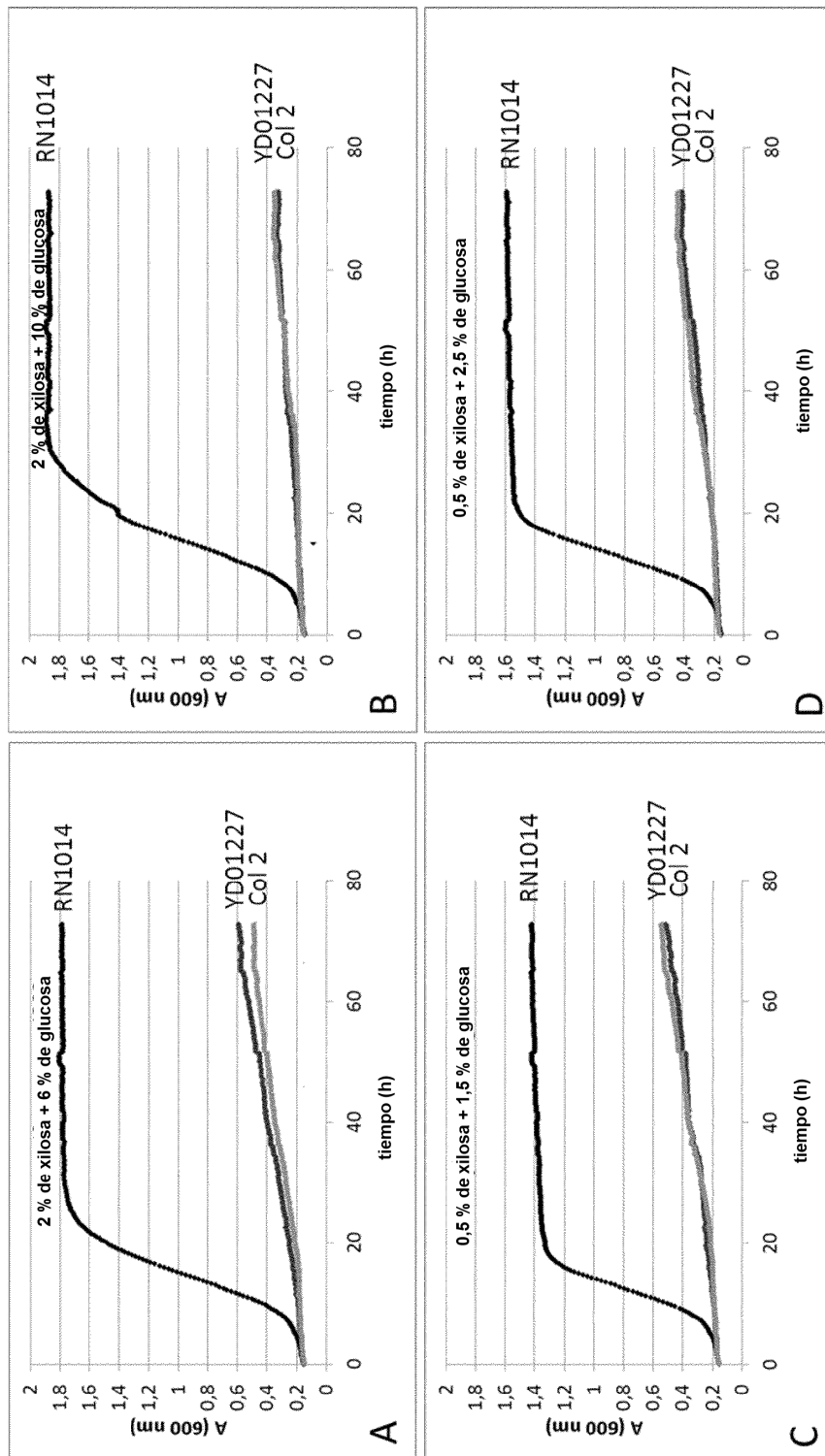


FIG. 5

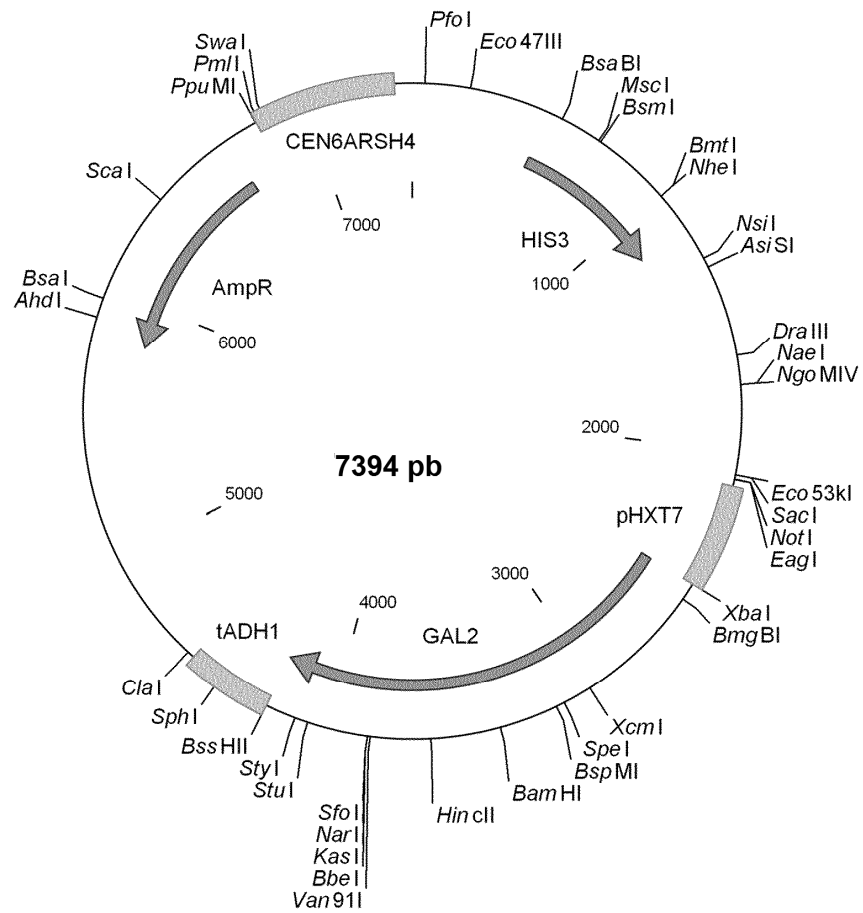


FIG. 6

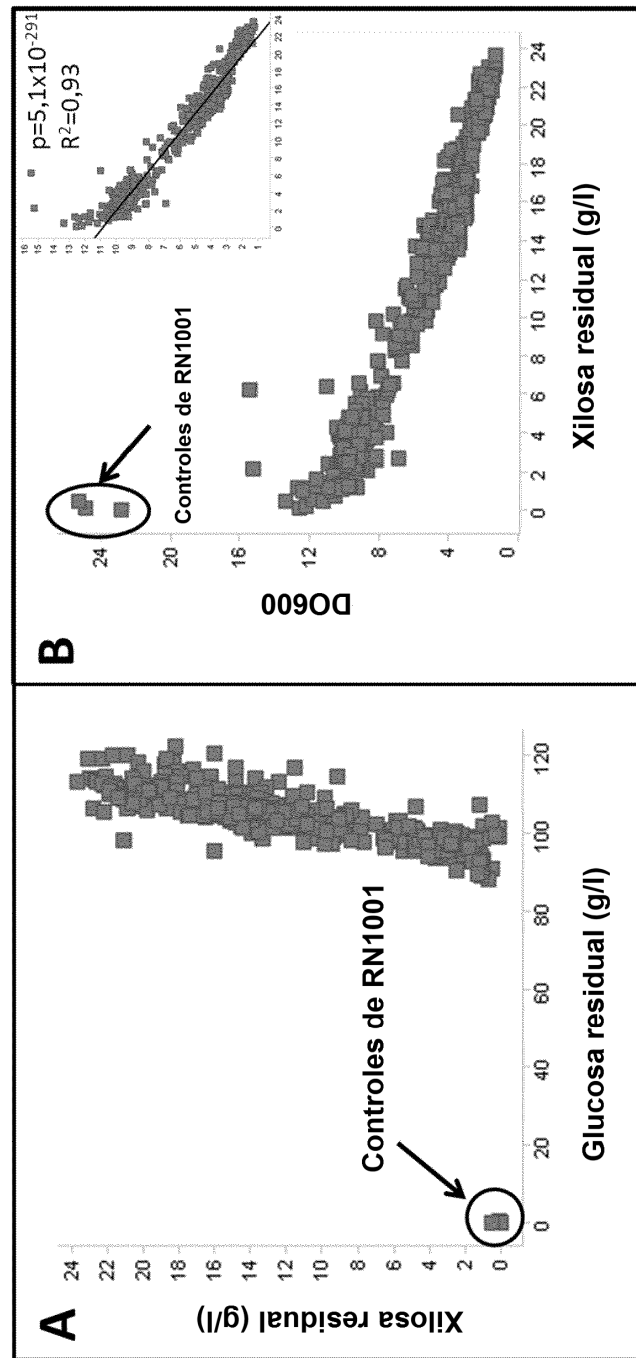


FIG. 7

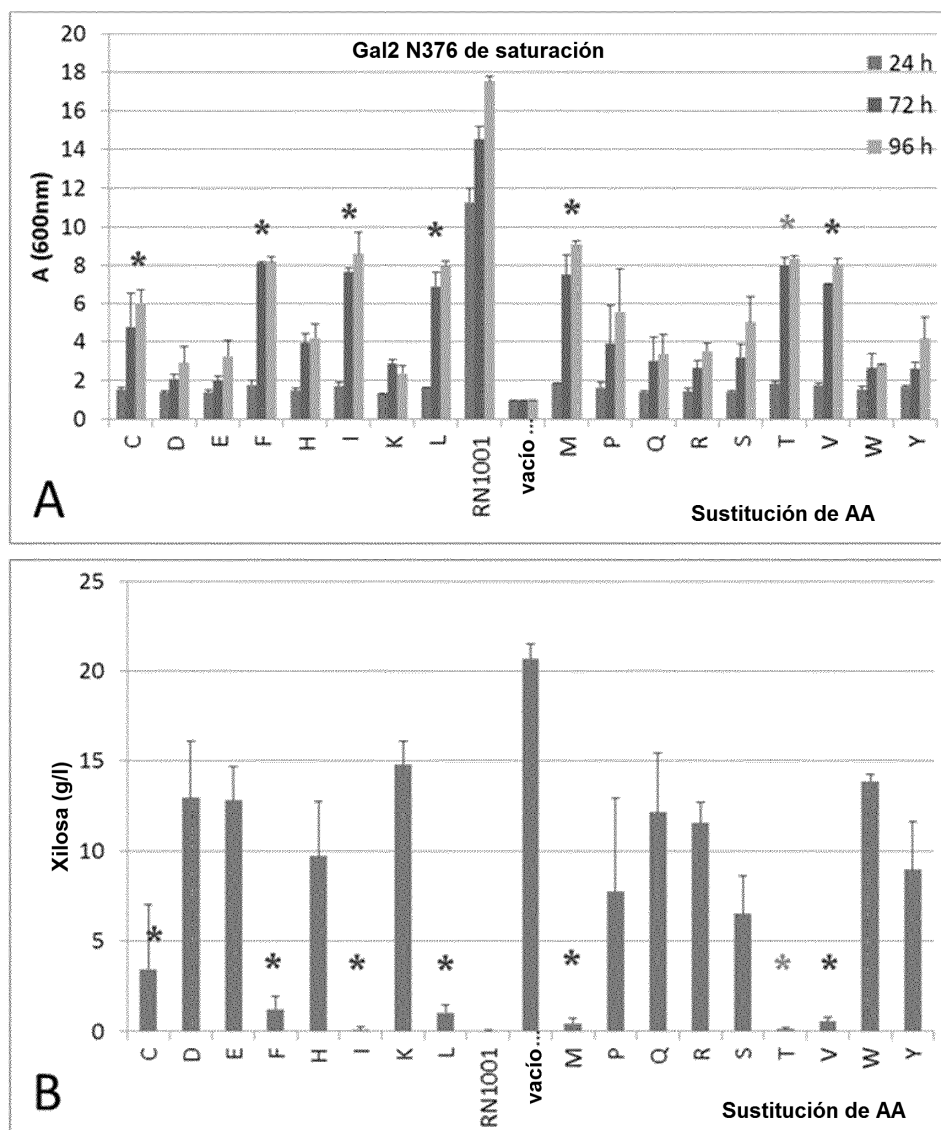


FIG. 8

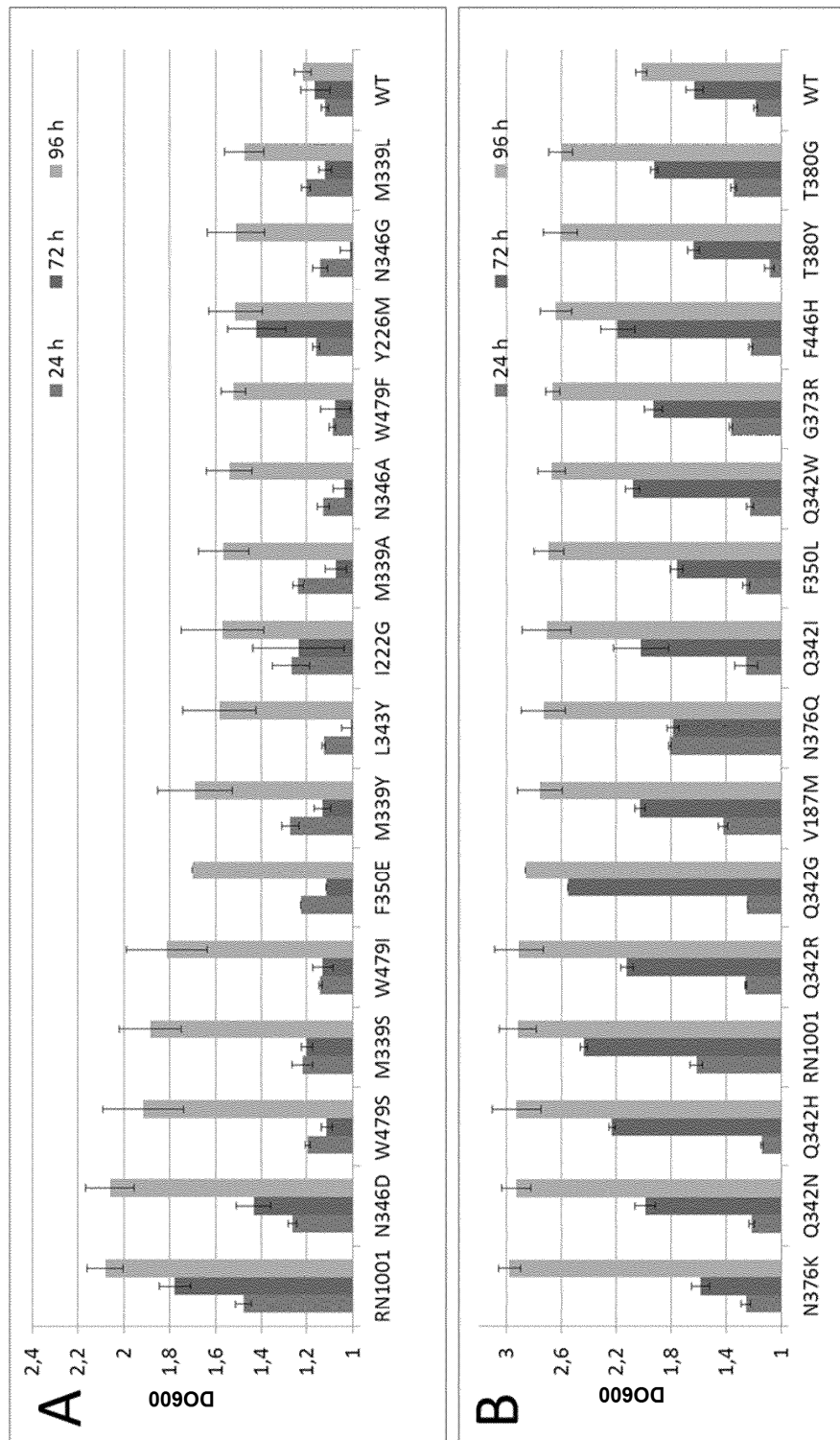
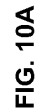


FIG. 9



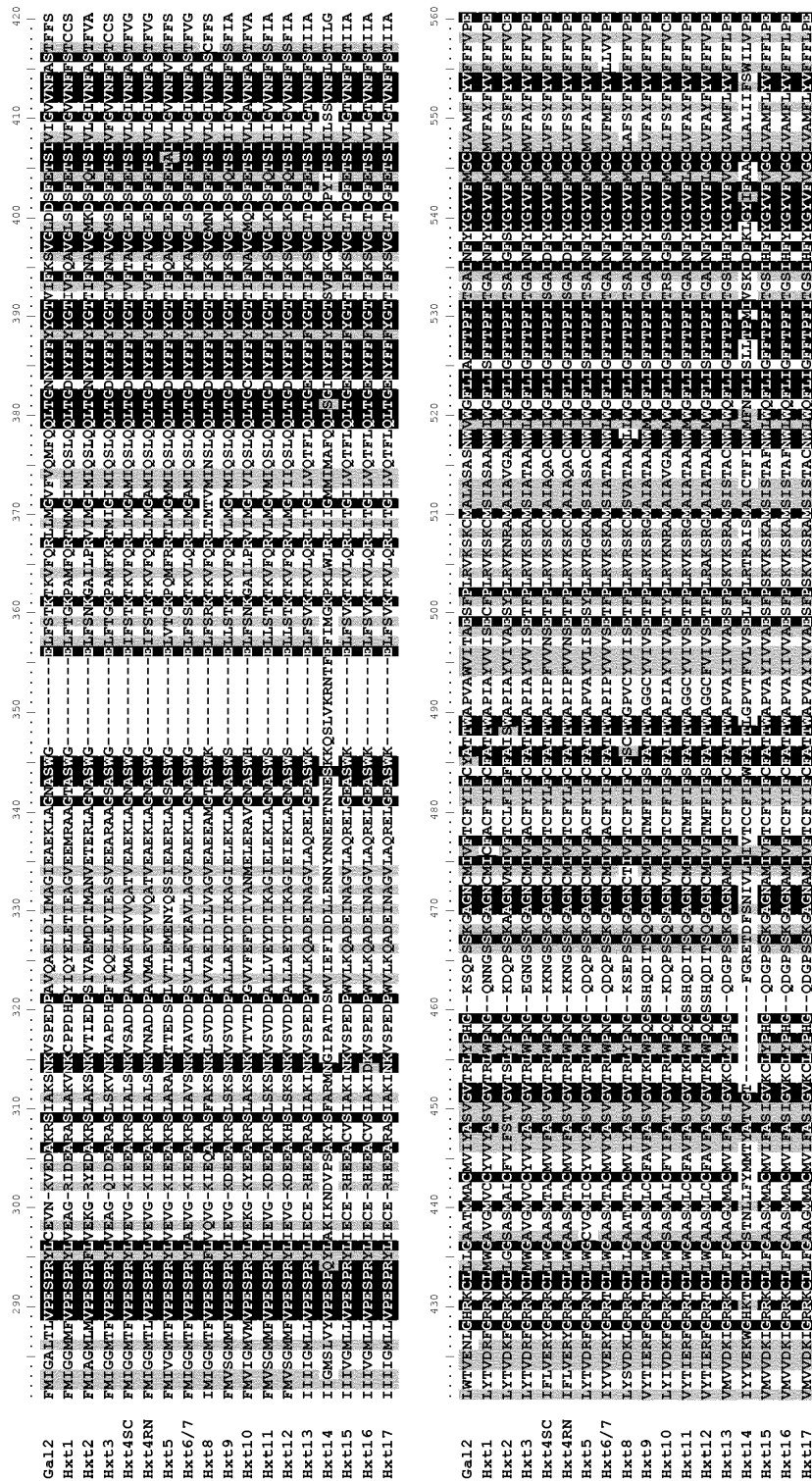


FIG. 10B

	570	580	590	600	610	620
						
	TKGLTLEEEIQELWEEGVLPWKSEG	WIPSSRRGN	NYDLEDLQ	HDDK	PWKAMLE	-----
	TKGLTLEEVNDMYAEGVLPWKSA	WVPVSKRG	ADYNADDLM	HDDQ	PPFKSLFSRK	-----
	TKGLTLEEVNEMYVEGVLPWKSG	WISKEKRV	SEE			-----
	TKGLTLEEVNDMYAEGVLPWKSA	WVPTSQ	RGANYDADALM	HDDQ	PFYKMF	GGK-----
	TKGLTLEEVNTLWEEGVLPWKSP	WFHQTR	---	EVLTT	TLMI	-----
SC	TKGLTLEEVNTLWEEGVLPWKSP	WVPNKR	GT	TDYNADDLM	HDS	THFTRRCSEKSRSVN
RN	TKGLTLEEVNEMYEENVLPWKST	KWIPPSRR	TTDYDL	DATRND	PRPFYKRMFTKEK	-----
/7	TKGLTLEEVNTMWEEGVLPWKSA	WVPPSR	RGANYDAEEM	THDDK	PLYKRMFSTK	-----
	TKGLTLEEVDEMMDGVLPWKSE	WVPASRR	DGDYDNEK	LQHDEK	PFYKRMF	-----
	TKGLTLEEVNTMWLEGVPA	WKSASW	VPERR	TADYDADA	IDHDDR	PIYKRFFSS-----
0	TKGLTLEEVNEMYEERIK	PKSGG	WIPSSRR	TPQPT	SS	PLVIVDSK-----
1	TKGLTLEEVNTMWLEGVPA	WKSASW	VPERR	TADYDADA	IDHNR	PIYKRFFSS-----
2	TKGLTLEEVNTMWLEGVPA	WKSASW	VPERR	TADYDADA	IDHNR	PIYKRFFSS-----
3	TIGLSLEEEIQLLYEEGI	KPKW	SVPPSR	RGISSEES	EKTEKKD	WKFLKFSKNSD-----
4	TKKKNEQEI	INKIFEPE				-----
5	TIGLSLEEEIQLLYEEGI	KPKW	SVPPSR	RGASSRETE	AKKSWKEV	LKFPKSFN-----
6	TIGLSLEETQLLYEEGI	KPKW	SVPPSR	RGASSRETE	AKKSWKEV	LKFPKSFN-----
7	TIGLSLEEEIQLLYEEGI	KPKW	SVPPSR	RGIPSEES	EKTEKKD	WKFLKFSKGSD-----

FIG. 10C

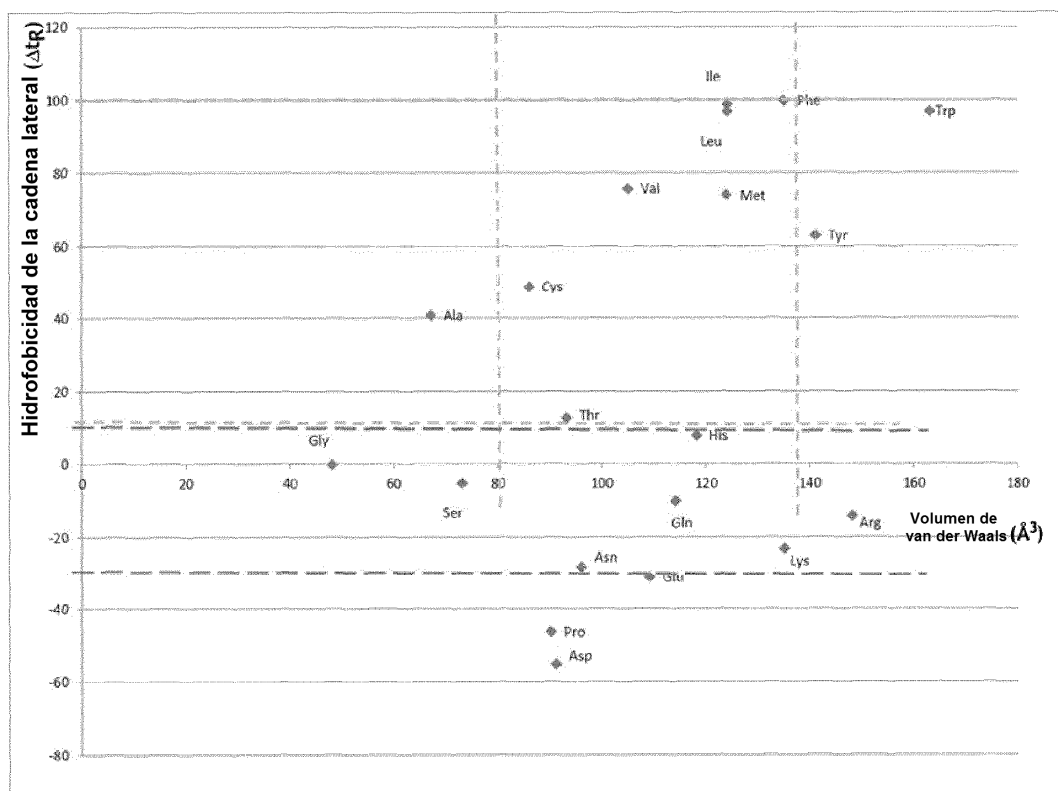


FIG. 11

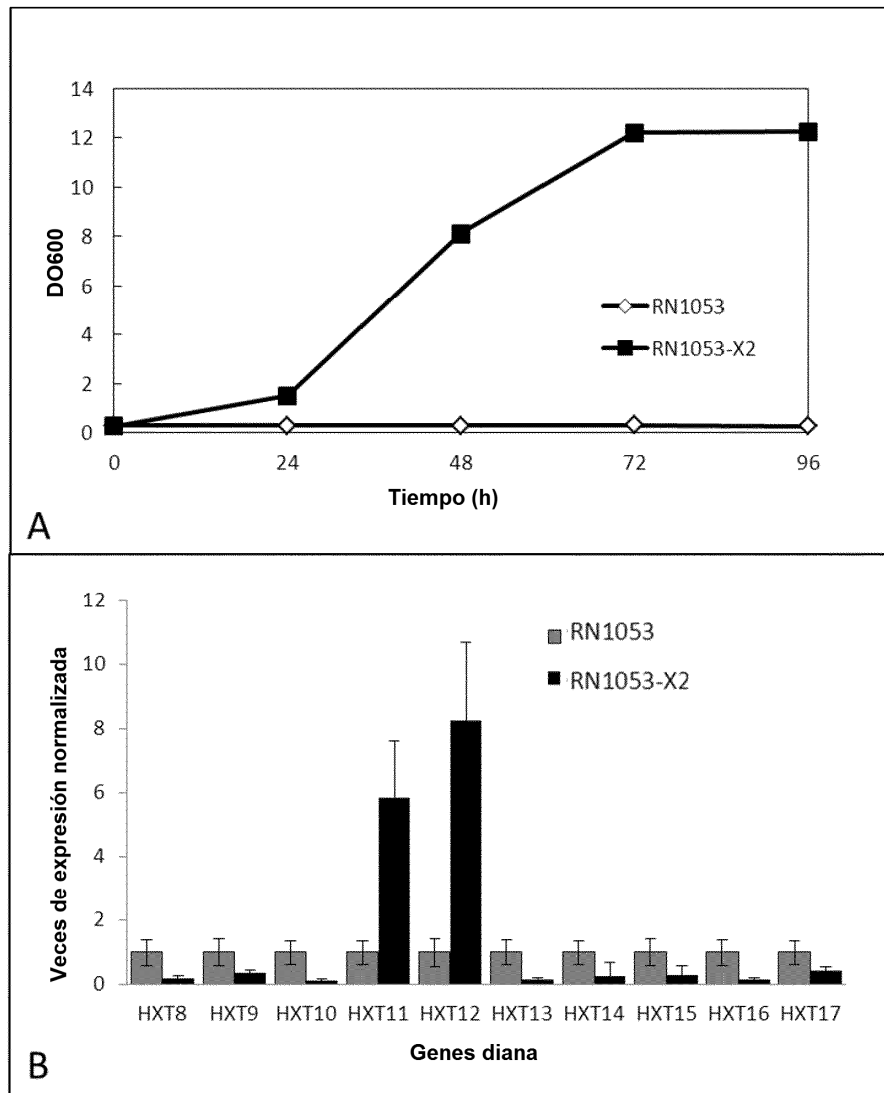


Fig. 12 (A-B)

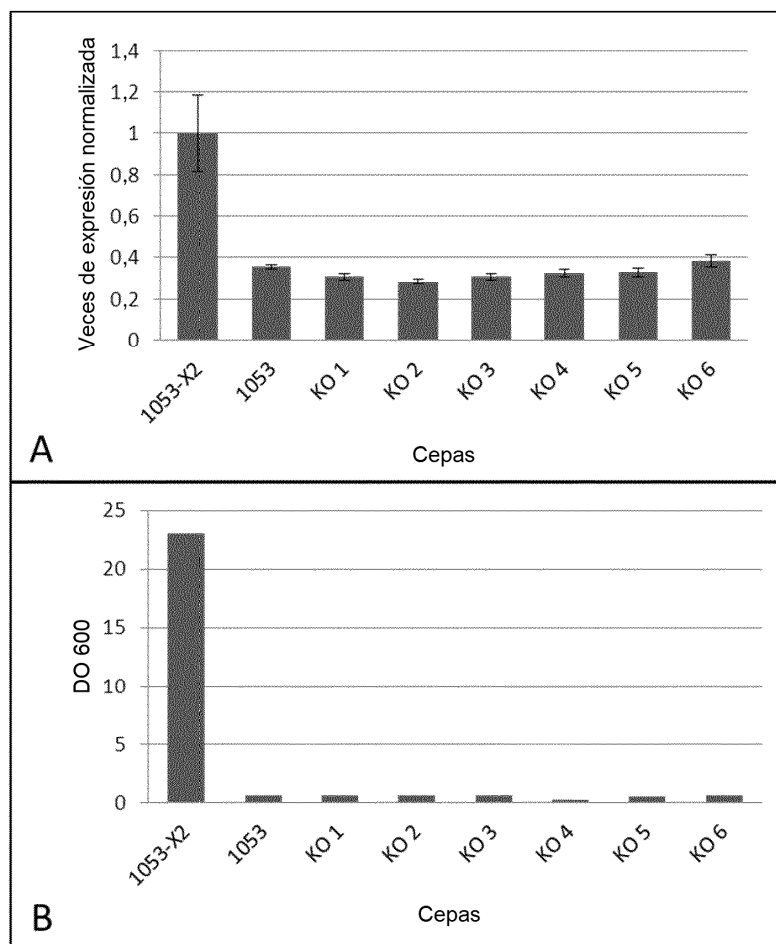


Fig. 13 (A-B)

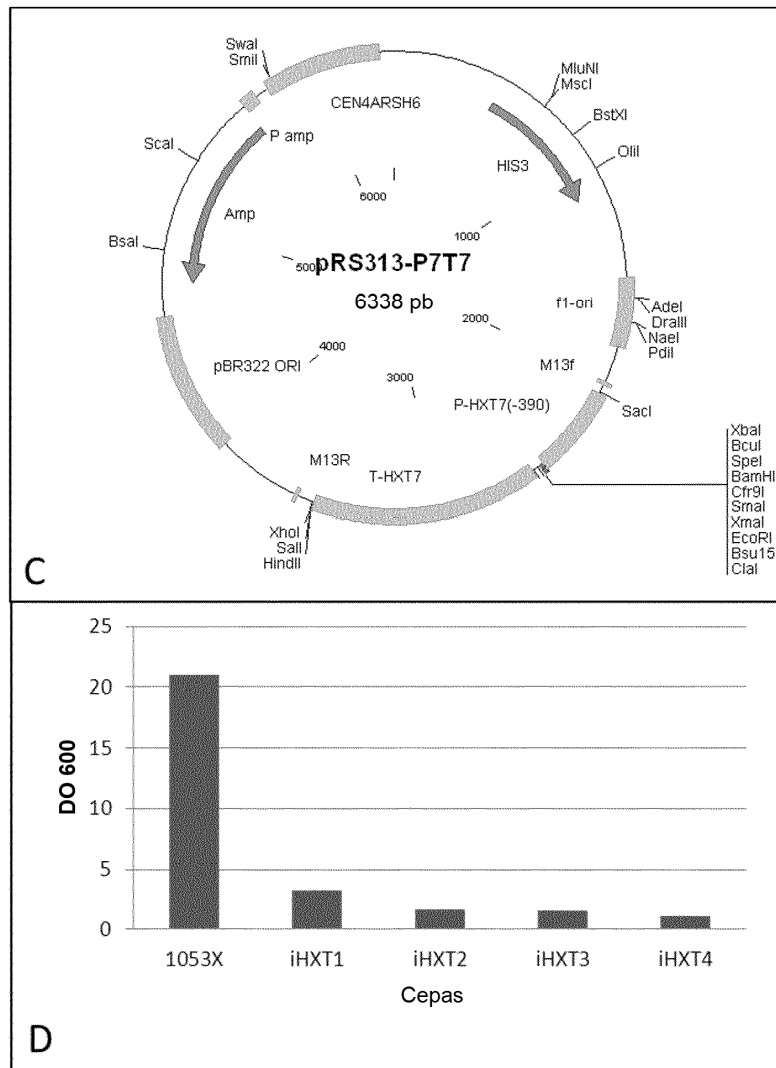


Fig. 13 (C-D)

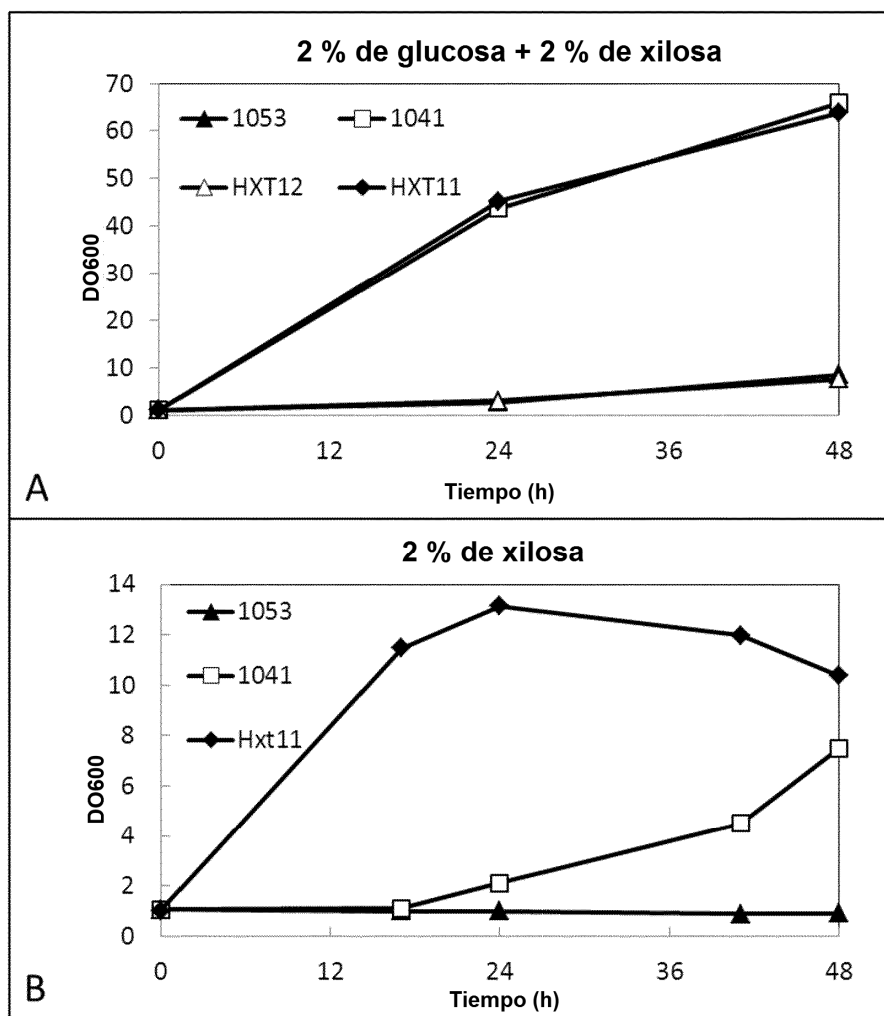


Fig. 14 (A-B)

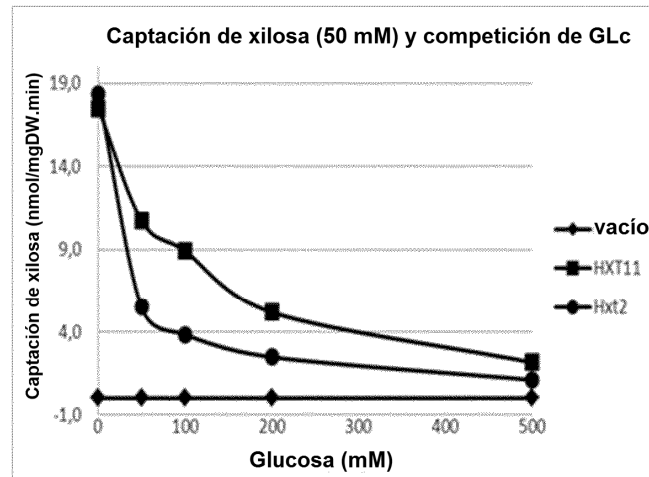


Fig.15

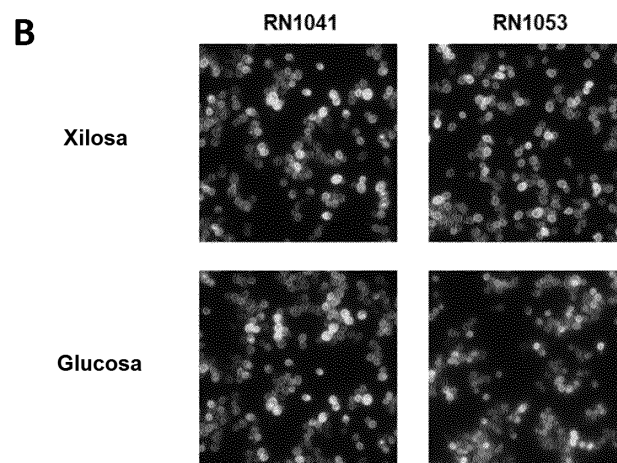
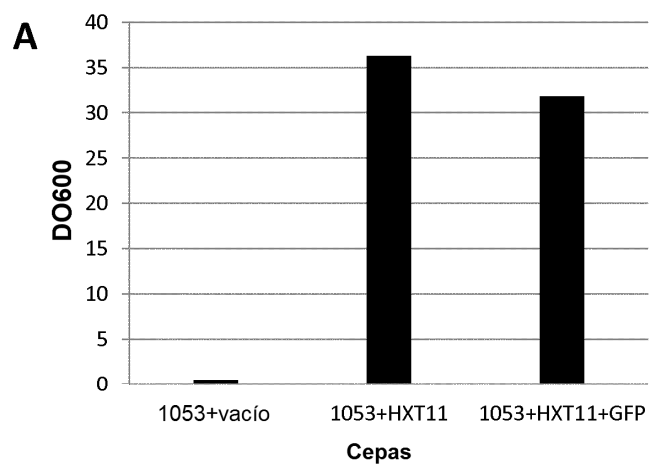


Fig. 16 (A-B)

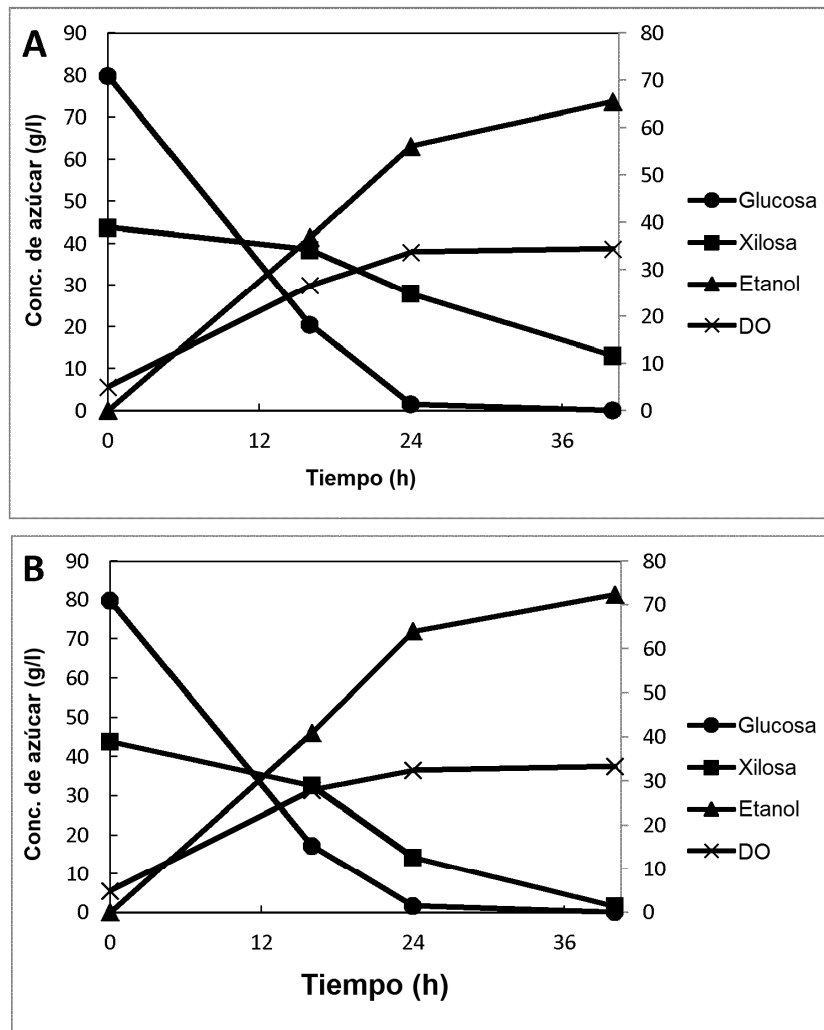


Figure 17 (A-B)

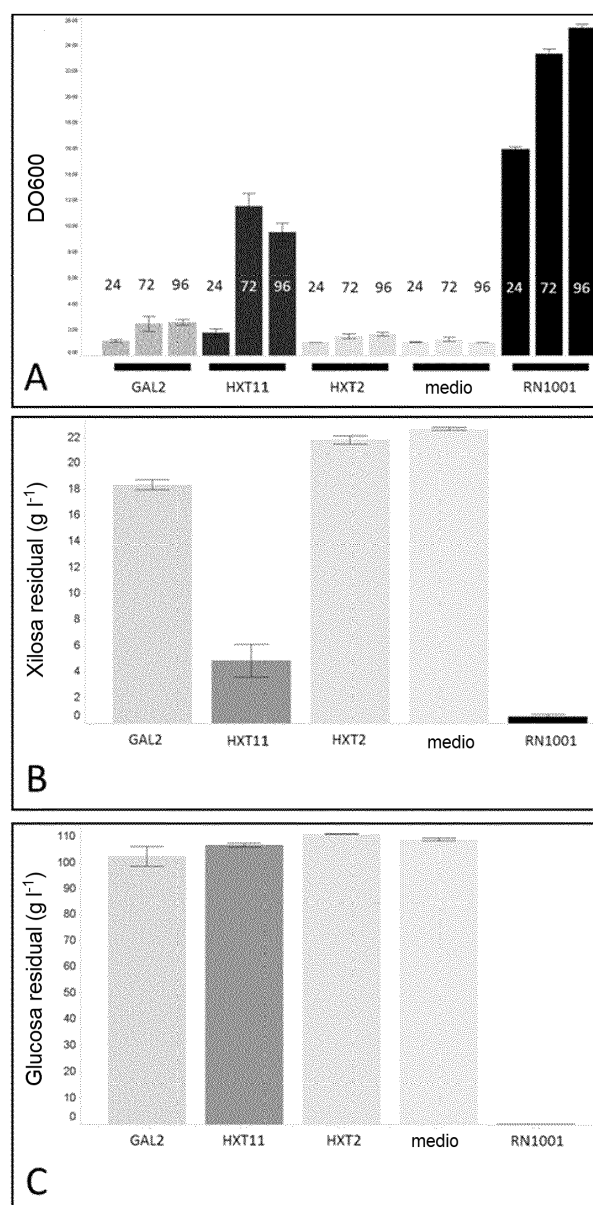


Fig. 18 (A-C)

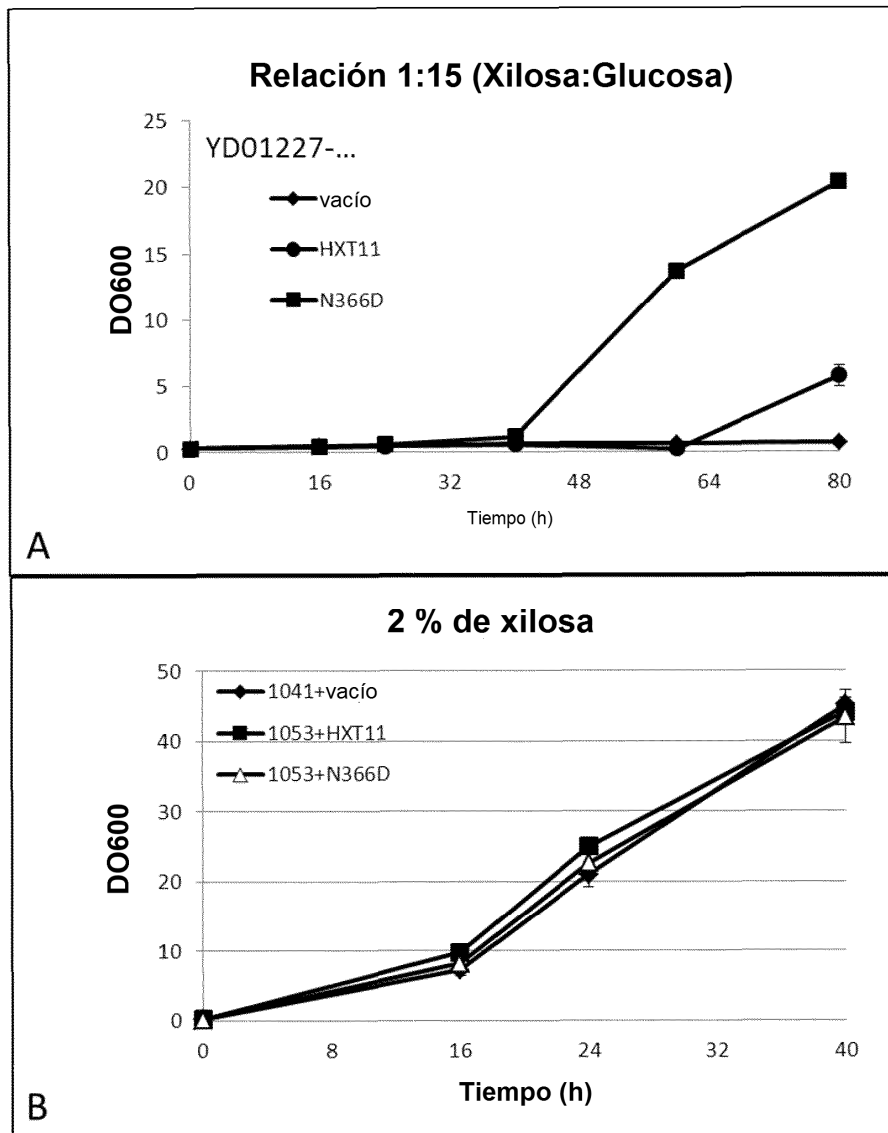


Fig. 19 (A-B)

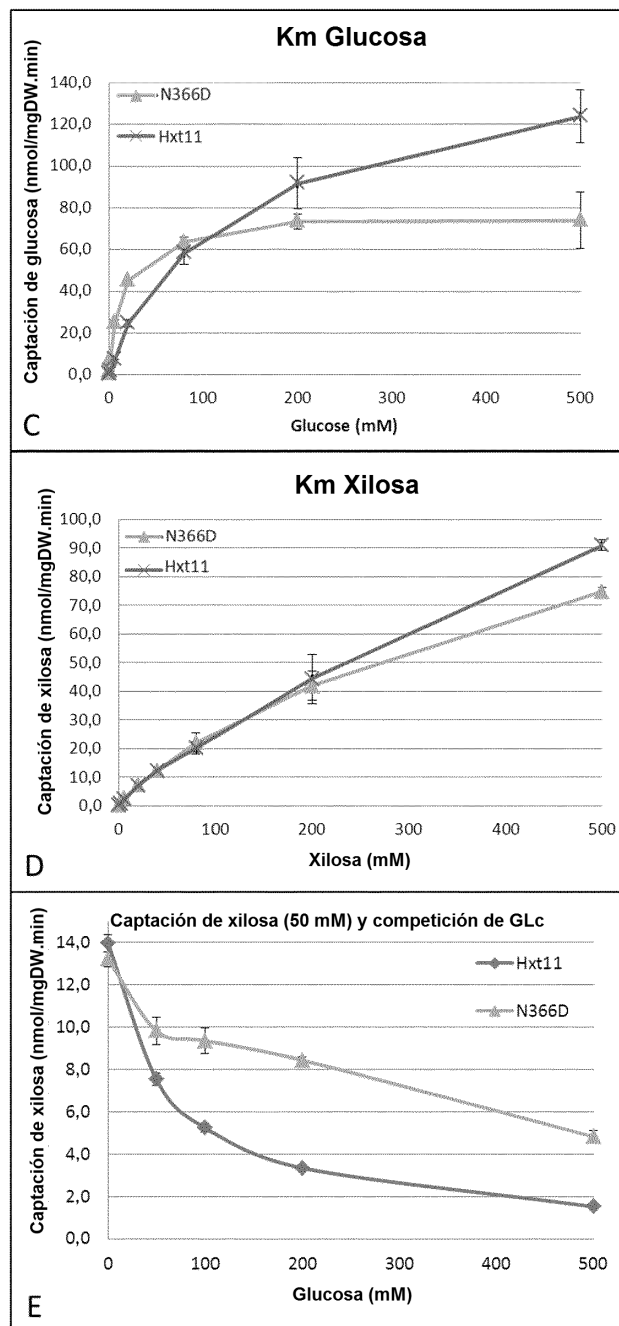


Fig. 19 (C-E)

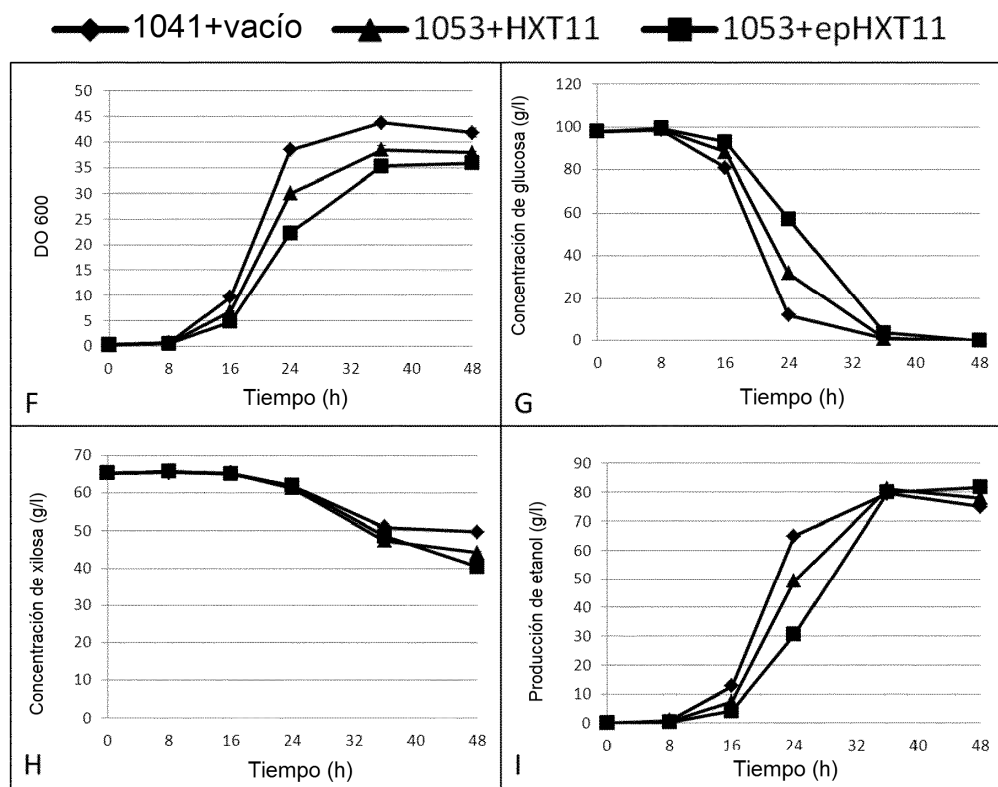


Fig. 19 (C-F)

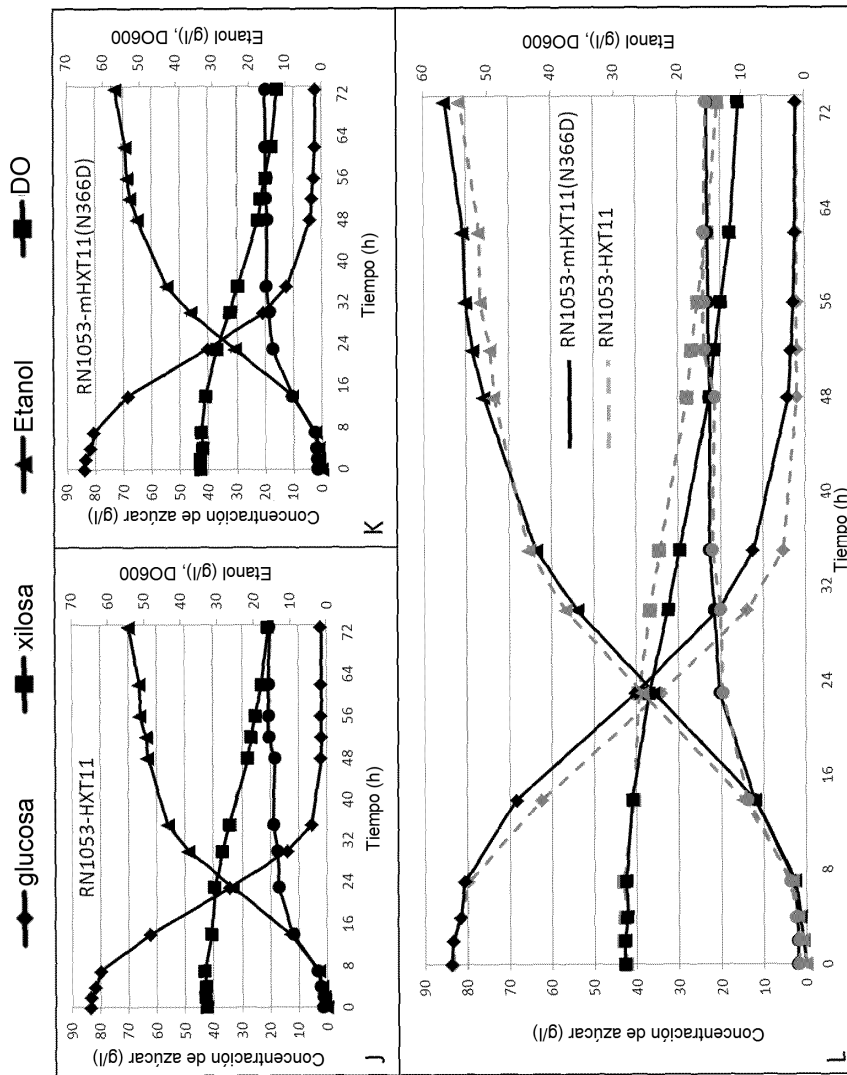


Fig. 19 (J-L)

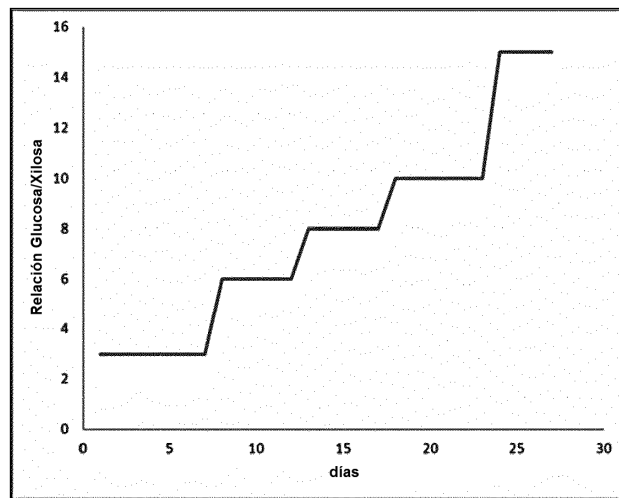


Fig. 20

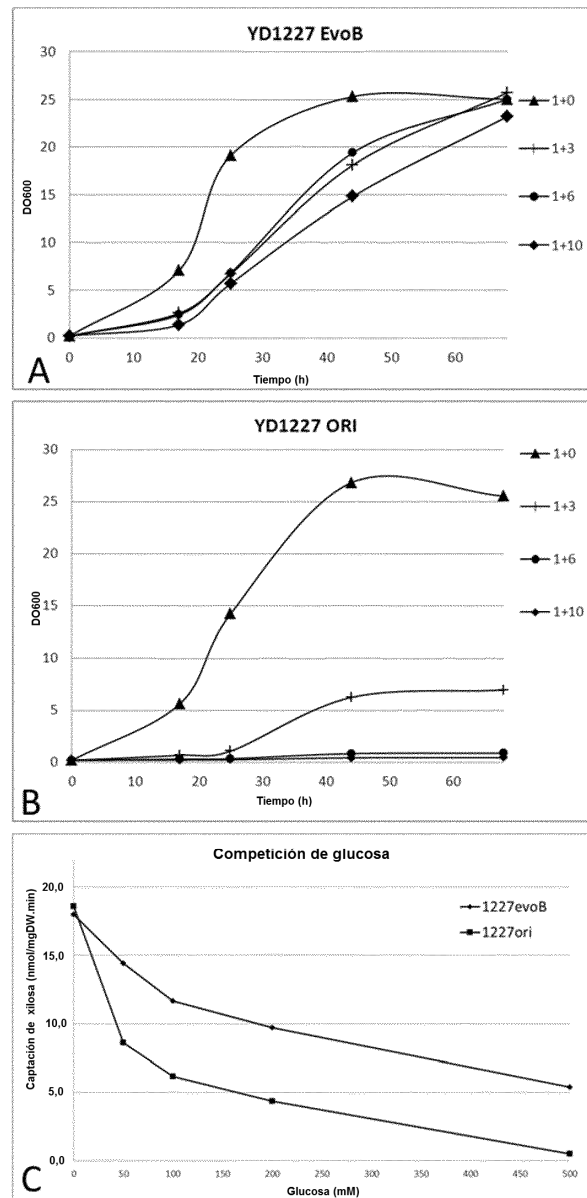


Fig. 21 (A-C)

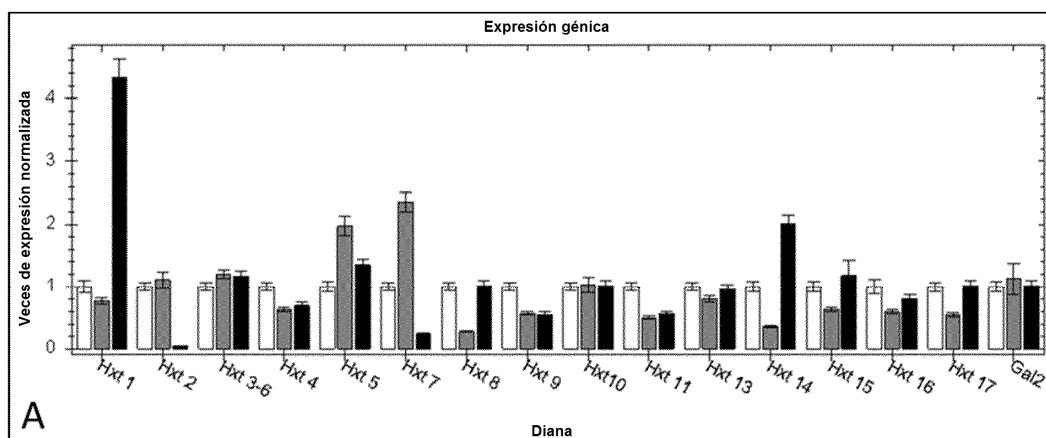


Fig. 22 (A)

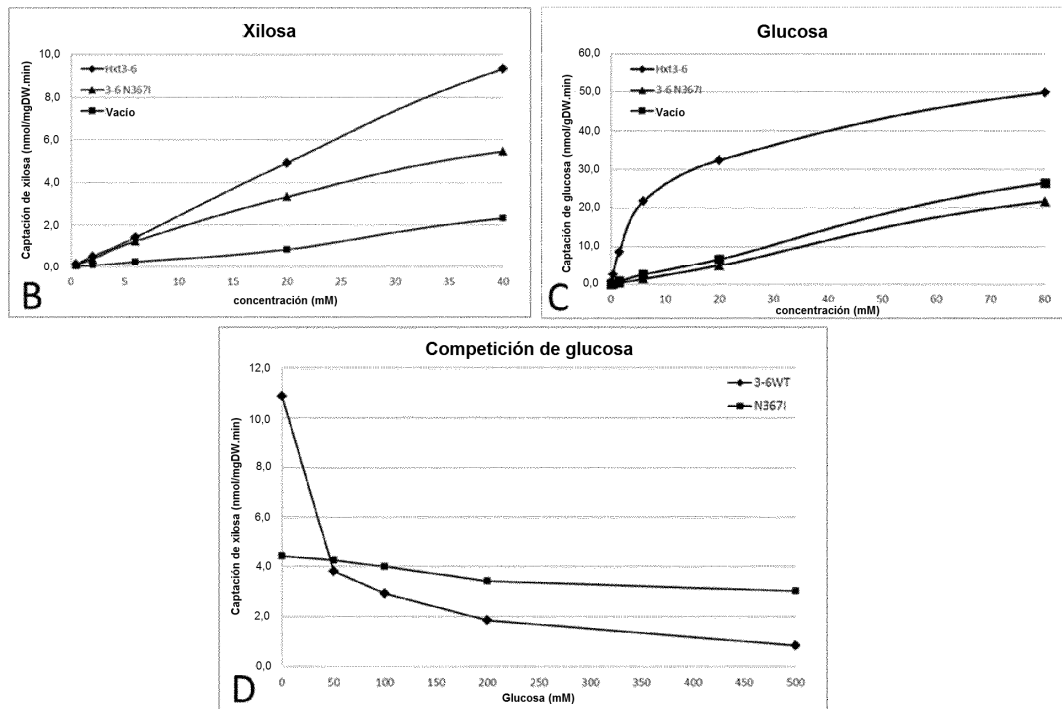


Fig. 22 (B-D)

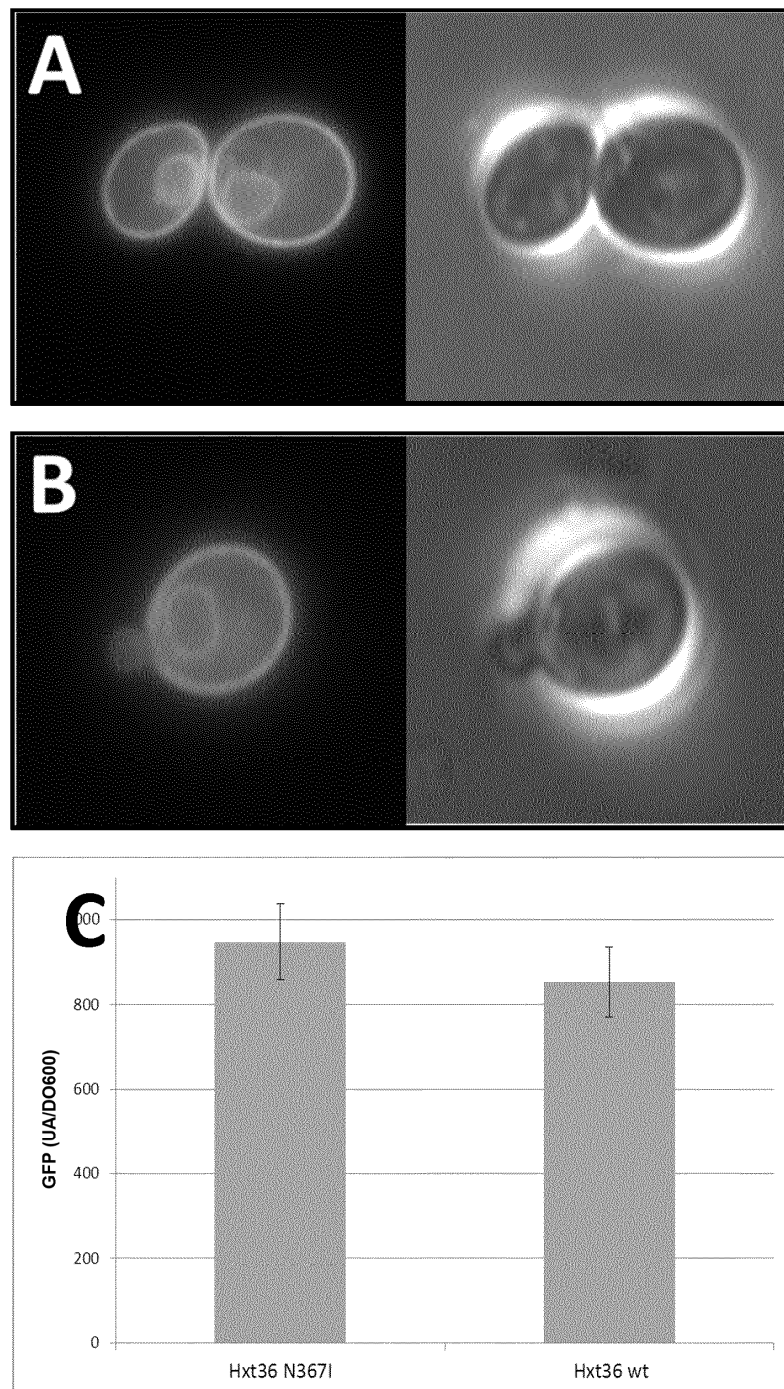


Fig. 23

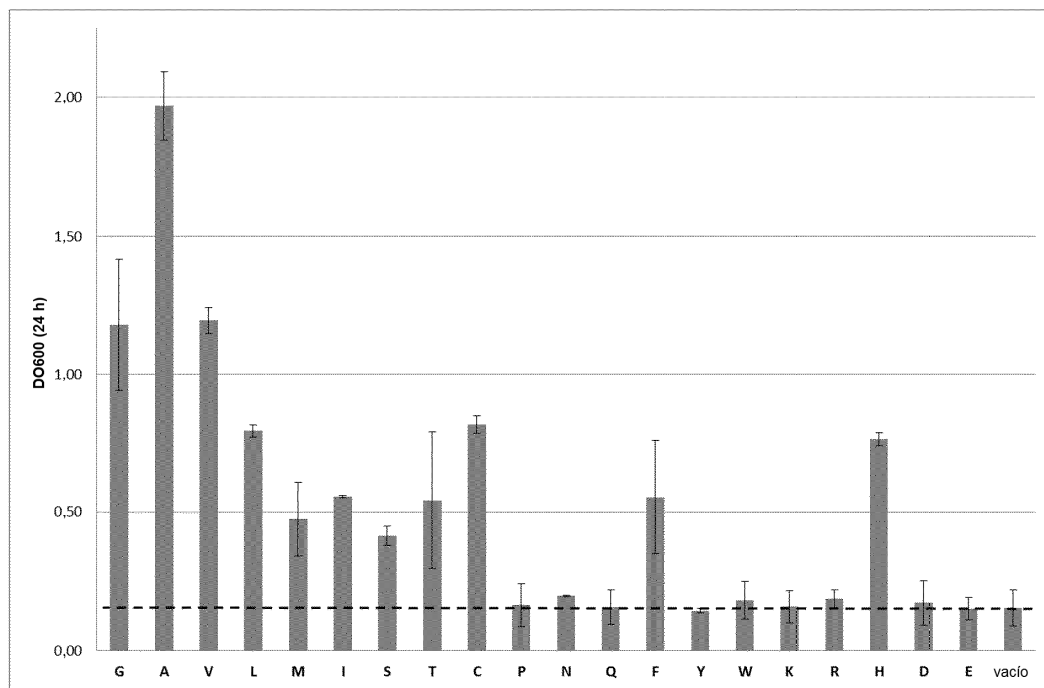


Fig. 24

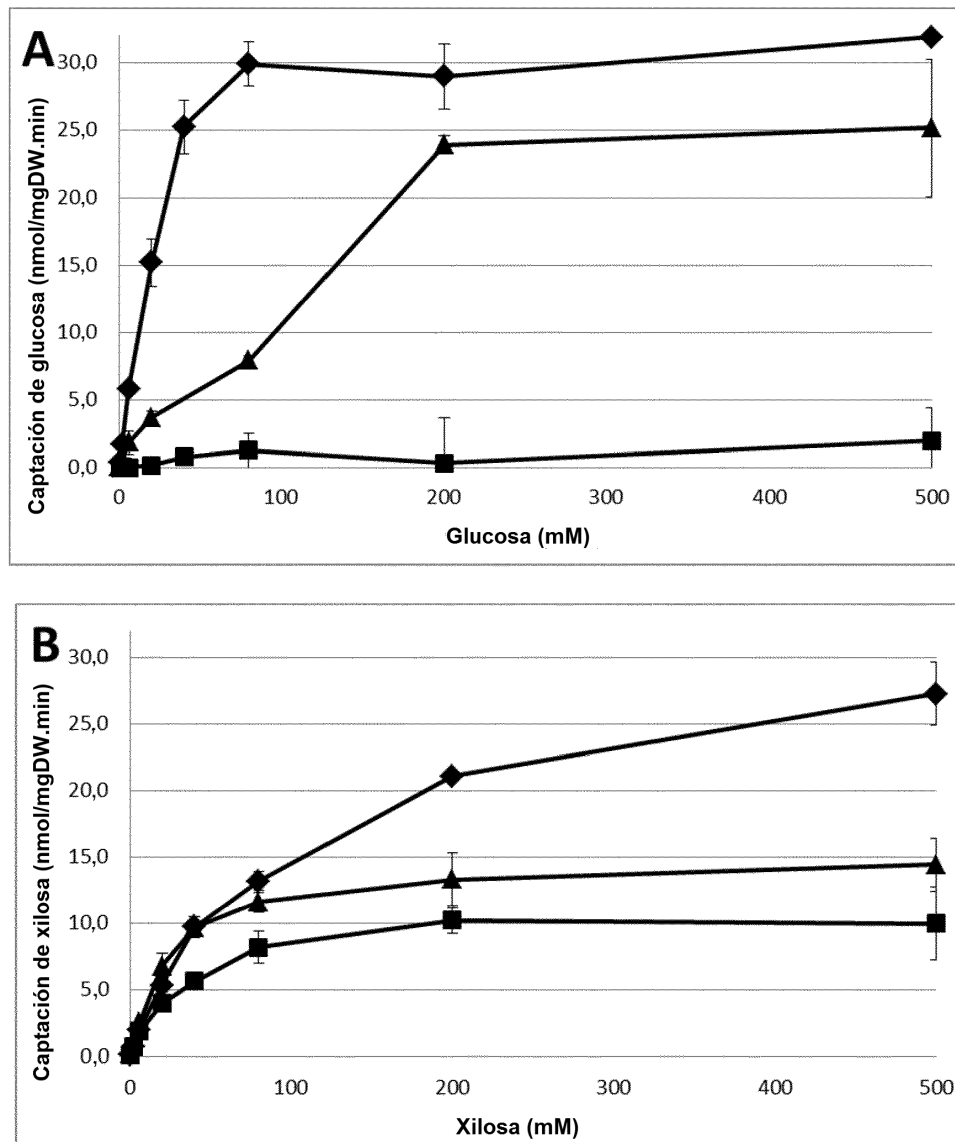


Fig. 25

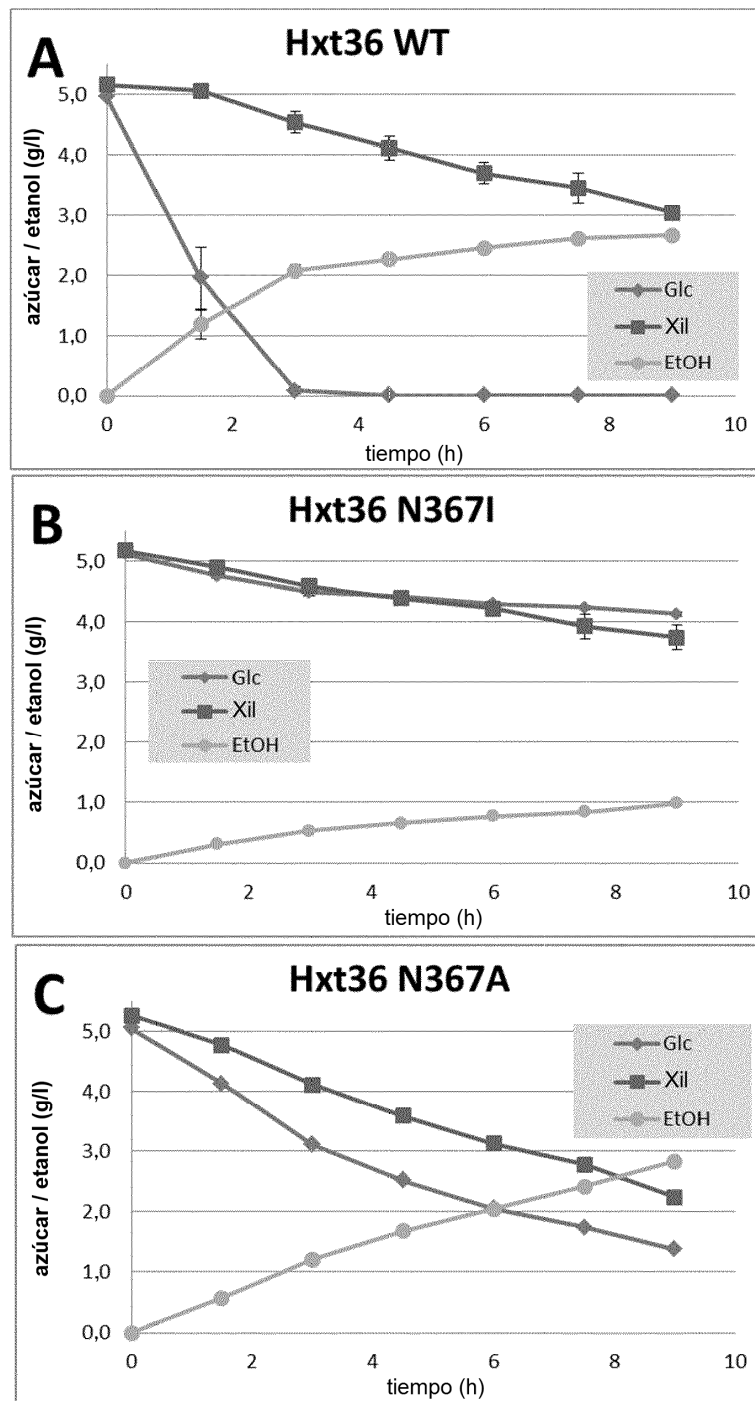


Fig. 26

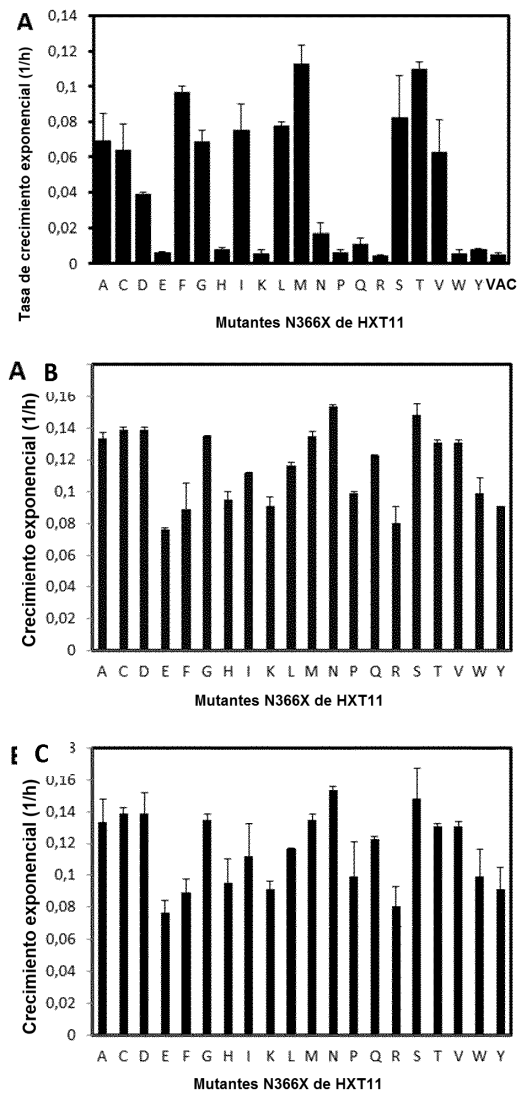


Fig. 27

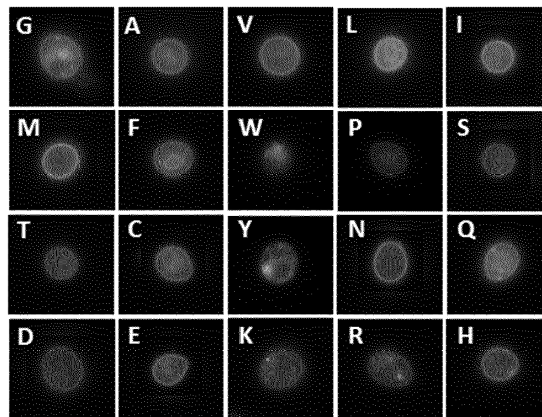


Fig. 28

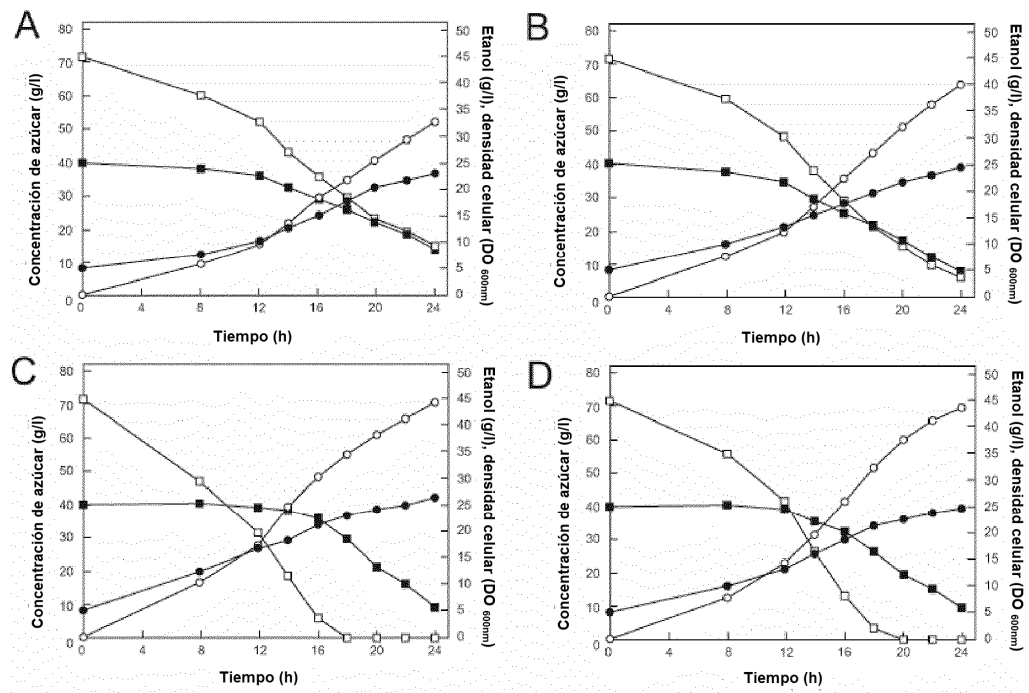


Fig. 29