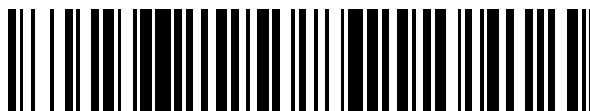


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 096**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015** **E 15160897 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3072971**

54 Título: **Sensores para la detección y cuantificación de secreción microbiológica de proteínas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2020

73 Titular/es:

SENSEUP GMBH (100.0%)
Karl-Heinz-Beckurts-Strasse 13
52428 Jülich, DE

72 Inventor/es:

JURISCHKA, SARAH-KRISTIN;
SCHAUMANN, GEORG;
BINDER, STEPHAN;
KLEINE, BRITTA y
FREUDL, ROLAND

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 758 096 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sensores para la detección y cuantificación de secreción microbiológica de proteínas

La presente invención se refiere a una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre, un método para la identificación de una célula que se caracteriza por una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, un método para la identificación de una composición de medio de cultivo que está optimizada para la producción recombinante de proteínas, un método para la identificación de condiciones de cultivo que están optimizadas para la producción recombinante de proteínas, un método para la identificación de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o para analizar el efecto de dicho compuesto sobre una población de células bacterianas genéticamente diferentes, un método para la producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, una célula obtenida por este método, un método para la producción de proteínas y un método para la preparación de una mezcla.

Las proteínas son de gran interés económico. Las enzimas, por ejemplo, se utilizan como biocatalizadores en la síntesis química de diversos compuestos, en particular en síntesis enantioselectivas, en detergentes o en alimentos para seres humanos o animales. En las composiciones medicinales pueden encontrarse otras proteínas, tales como anticuerpos, hormonas y moduladores inmunológicos.

Un método preferido para preparar tales proteínas es la producción biotecnológica utilizando microorganismos recombinantes. En los procesos de fermentación, estos microorganismos se cultivan de manera que producen la proteína deseada a través de la síntesis de proteínas celulares. Por medio de esta ruta de producción biosintética pueden obtenerse directamente las proteínas naturales y pueden utilizarse materias primas simples y económicas. Como microorganismos, habitualmente se utilizan para este propósito, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* o bacterias relacionadas.

Los parámetros biológicos y de procedimiento son cruciales para la eficacia y rentabilidad con las cuales pueden producirse proteínas en procesos biotecnológicos. Estos parámetros comprenden, por ejemplo, el microorganismo hospedador, la combinación de cepa/vector, el uso de codón del gen codificante de proteínas, los péptidos señal que son necesarios para el transporte de la proteína a través de la pared celular (péptidos señal secretorios), el nivel de expresión, el tiempo de inducción, la temperatura, la composición del medio, la tasa de crecimiento, etc.

Para el desarrollo de procesos biotecnológicos eficientes para la producción de proteínas estos parámetros deben variarse y optimizarse. Sin embargo, el problema es que no solo uno de los parámetros mencionados anteriormente es variable en un amplio intervalo, sino que además los diferentes parámetros también se influyen entre sí, lo que resulta en que debe evaluarse un gran número de combinaciones de parámetros posibles. Según el estado actual de la técnica, no es posible una mera predicción teórica de combinaciones de parámetros o parámetros optimizados y, como además para cada proteína específica se consideran ideales diferentes parámetros y combinaciones de parámetros, deben probarse muchas combinaciones de parámetros diferentes para cada proceso de producción.

Para la generación de diferentes propiedades en una determinada cepa que se pretende usar para la producción recombinante de una proteína deseada se aplican etapas de mutagénesis químicas o físicas convencionales (por ejemplo, MNNG o UV), por medio de las cuales se inducen mutaciones aleatorias en el genoma de la cepa (mutagénesis no dirigida). Para producir mutantes con una secreción alterada de la proteína, por ejemplo, se generan genotecas de un gen codificante de proteína, en las que la secuencia génica codificante de proteína se fusiona con diferentes secuencias codificantes de péptidos señal de secreción. Para analizar el efecto de diferentes condiciones de cultivo o diferentes composiciones del medio sobre las cepas de secreción de proteínas que secretan la proteína específica, estas se cultivan en estas diferentes condiciones y/o en estos diferentes medios de cultivo.

La búsqueda de modificaciones genéticas y parámetros de cultivo optimizados y medios de cultivo que conduzcan a un rendimiento aumentado, eficacia o economía del proceso biotecnológico para la producción de la proteína deseada se denomina comúnmente "*identificación sistemática*". Sin embargo, en dicho proceso de identificación sistemática, debe observarse un problema en el hecho de que en una suspensión celular que comprende una pluralidad de células genéticamente diferentes o en una preparación experimental en la que se han ajustado diversos parámetros (o en la que solo se ha variado un parámetro que sin embargo también afecta a otros parámetros) es casi imposible identificar claramente qué modificación genética o qué parámetro fue el responsable de un aumento finalmente observado en la producción de una proteína deseada. Los métodos de identificación sistemática que son necesarios para dicha evaluación no solo consumen mucho tiempo y son caros, además son altamente específicos para cada proteína individual y por tanto no son aplicables de un modo general. Además, estos métodos de identificación sistemática dependen de la disponibilidad de un ensayo práctico de identificación sistemática para la proteína deseada, puesto que la cantidad de producción o secreción de la proteína deseada en una preparación experimental dada únicamente puede determinarse mediante la detección de la actividad catalítica de la proteína en el medio de cultivo o dentro de las células.

Los métodos del estado de la técnica para la identificación sistemática incluyen el uso de construcciones de sensores en los que las proteínas fluorescentes están bajo el control de un promotor sensible al metabolito respectivo, por

ejemplo, L-lisina (Binder et al. (2012), Genome Biology, 13 (5): R40).

A partir del estado de la técnica, también se sabe que las células hospedadoras pueden optimizarse haciendo que sobreexpresen proteínas secretoras y a continuación analizándolas a nivel de transcripción (Marciniak et al. (2012), Microbial Cell Factories, 11 (66): 1-13).

- 5 La presente invención se basó en el objetivo de superar las desventajas que surgen en relación con la detección de células modificadas genéticamente que secretan una proteína particular.

En particular, la presente invención se basó en el objetivo de proporcionar una célula modificada genéticamente en la que, después de una modificación genética o después de un cambio de un parámetro relacionado con las condiciones de cultivo o después de un cambio de la composición del medio de cultivo, pudieran identificarse de una manera simple aquellas variantes que se caracterizan por una secreción aumentada de una proteína específica, en la que también fuera posible separar fácilmente estas células de entre una pluralidad de células diferentes. También, la identificación de células que se caracterizan por una secreción aumentada de una proteína específica no debe depender de la naturaleza de la proteína deseada y de este modo debe poder aplicarse a todas las proteínas que puedan producirse de un modo recombinante en un proceso de fermentación.

- 15 La presente invención también se basó en el objetivo de proporcionar un método para identificar una célula que se caracteriza por una secreción aumentada de una proteína específica dentro de una pluralidad de células genéticamente diferentes de una manera simple, rápida y rentable y para separar específicamente estas células de la pluralidad de células genéticamente diferentes.

La presente invención también se basó en el objetivo de proporcionar un método para identificar una célula que, cuando se estuviera cultivando en determinadas condiciones de cultivo o en un determinado medio de cultivo, se caracterizara por una secreción aumentada de una proteína específica, en comparación con la misma célula que se hubiera cultivado en condiciones de cultivo diferentes o en un medio de cultivo diferente, permitiendo de este modo determinar las condiciones de cultivo óptimas y/o medios de cultivo óptimos de una manera simple, rápida y rentable.

La presente invención también se basó en el objetivo de proporcionar una célula modificada genéticamente con una secreción optimizada de una proteína específica, en la que se introducen selectivamente genes o mutaciones, en particular genes para la secreción de péptidos señal o mutaciones en estos genes, que se han identificado como adecuados por medio del proceso de identificación sistemática mencionado anteriormente para aumentar la secreción de la proteína específica o la concentración de la proteína específica en el lado *trans* de la membrana citoplásmica.

La materia objeto de la categoría que forma las reivindicaciones de la presente invención contribuye a conseguir al menos uno de los objetivos anteriores. Se hace una contribución adicional mediante la materia objeto de las reivindicaciones dependientes que representan realizaciones específicas de la invención.

En el presente documento se desvela:

[1] Una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

[2] La célula de acuerdo con la realización [1], en la que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de al menos un promotor heterólogo que, en el tipo silvestre de la célula, controla la expresión de un gen del cual la expresión en la célula de tipo silvestre depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

[3] La célula de acuerdo con la realización [1] o [2], en la que la célula es una célula del género *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus* o *Mycobacterium*.

[4] La célula de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, en la que el promotor se selecciona entre el grupo que consiste en el promotor *cg0706*, el promotor *cg0996*, el promotor *cg0998*, el promotor *cg1325*, el promotor *htrA*, el promotor *lial*, el promotor *mprA* o el promotor *pepD*.

[5] La célula de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [4], en la que la célula es una célula del género *Corynebacterium* y en la que el promotor es el promotor *cg0706*, el promotor *cg0996*, el promotor *cg0998* o el promotor *cg1325*.

[6] La célula de acuerdo con la realización [5], en la que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de una combinación del promotor *cg0996* y el promotor *cg0998*, en la que el promotor *cg0996* se localiza cadena arriba del promotor *cg0998*.

[7] La célula de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [4], en la que la célula es del género *Bacillus* y en la que el promotor es el promotor *htrA* o el promotor *lial*.

[8] La célula de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [4], en la que la célula es una célula del género

Mycobacterium y en la que el promotor es el promotor *mprA* o el promotor *pepD*.

[9] La célula de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [4], en la que la célula es una célula del género *Escherichia* y en la que el promotor es el promotor *htrA*.

5 [10] La célula de acuerdo con una de las realizaciones anteriores, en la que la proteína fluorescente es proteína verde fluorescente (GFP) o una variante de esta proteína.

[11] Un método para la identificación de una célula que se caracteriza por una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular, comprendiendo el método las etapas:

10 α1) provisión de una suspensión celular que comprende células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10];

 α2) modificación genética de las células para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

15 α3) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

[12] El método de acuerdo con la realización [11], en el que la modificación genética en la etapa α2) del método se realiza mediante mutagénesis no dirigida o mediante ingeniería metabólica.

[13] El método de acuerdo con la realización [11] o [12], que comprende además la etapa de método:

α4) separación de las células identificadas desde la suspensión celular.

20 [14] El método de acuerdo con la realización [13], en el que la separación se realiza por medio de citometría de flujo.

25 [15] Un método para la identificación de una célula que se caracteriza por una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular o para la identificación de una suspensión celular que comprende células que se caracterizan por una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:

 β1) provisión de

 i) una suspensión celular que comprende una pluralidad de células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10], en la que las células en la suspensión celular difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico,

30 o

 ii) una pluralidad de suspensiones celulares, comprendiendo cada suspensión celular, células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10], en la que las suspensiones celulares difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta por las células a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

35 β2) cultivo de células diferentes en la suspensión celular o de las diferentes suspensiones celulares;

 β3) identificación de células individuales en la suspensión celular que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico o identificación de suspensiones celulares individuales que comprenden células que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

40 [16] Un método para la identificación de una composición de medio de cultivo que está optimizada para la producción recombinante de una proteína, comprendiendo el método las etapas:

 γ1) provisión de una pluralidad de medios de cultivo que se diferencian entre sí con respecto a la composición del medio del cultivo;

45 γ2) cultivo de células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10] en los diferentes medios de cultivo, obteniendo de este modo una pluralidad de suspensiones celulares en las que las células de las suspensiones celulares, debido a la diferencia en la composición de los medios de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de secreción de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

 γ3) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción

de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

[17] Un método para la identificación de condiciones de cultivo que están optimizadas para la producción recombinante de una proteína, comprendiendo el método las etapas:

- 5 δ1) provisión de una pluralidad de suspensiones celulares que comprenden células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10];
- δ2) cultivo de las células en estas suspensiones celulares en condiciones de cultivo diferentes de modo que las células en las diferentes suspensiones celulares, debido a la diferencia en las condiciones de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- 10 δ3) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

[18] Un método para la identificación de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o para analizar el efecto de dicho compuesto sobre una población de células bacterianas genéticamente diferentes o células genéticamente idénticas en estados fisiológicos diferentes o fases de crecimiento diferentes, comprendiendo el método las etapas:

- 15 ε1) provisión de una suspensión celular que comprende las células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10];
- ε2) cultivo de las células en la suspensión en presencia del compuesto;
- 20 ε3) determinación de la actividad antibiótica y actividad antibiótica dependiente de la concentración del compuesto mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular.

[19] Un método para la producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:

- 25 I) provisión de una suspensión celular que comprende células de acuerdo con una de las realizaciones [1] a [10];
- II) modificación genética de las células para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- 30 III) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- IV) separación de las células identificadas desde la suspensión;
- V) identificación de aquellos genes modificados genéticamente G_1 a G_n o aquellas mutaciones M_1 a M_m en las células identificadas y separadas que son responsables de la secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- 35 VI) producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, de la cual el genoma comprende al menos uno de los genes G_1 a G_n y/o al menos una de las mutaciones M_1 a M_m .

[20] El método de acuerdo con la realización [19], en el que la modificación genética en la etapa II) del método se realiza mediante mutagénesis no dirigida o mediante ingeniería metabólica.

40 [21] Célula obtenida por un método de acuerdo con la realización [19] o [20].

[22] Un método para la producción de una proteína, comprendiendo el método las etapas:

- (a) producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico mediante un método de acuerdo con las realizaciones [19] a [20];
- 45 (b) cultivo de la célula en un medio de cultivo que comprende nutrientes en condiciones en las que la célula produce proteína a partir de los nutrientes.

[23] El método de acuerdo con la realización [22], en el que la proteína es una hormona, una toxina, un anticuerpo, una proteína estructural, una enzima, una proteína de transporte, una proteína de almacenamiento, una proteína de canal, una proteína reguladora, una proteína fluorescente o una proteína con capacidades de unión selectiva,

polimerización, recubrimiento, estabilización, reparación, aislamiento.

[24] Método para la preparación de una mezcla, comprendiendo el método las etapas:

(A) producción de una proteína por el método de acuerdo con una de las realizaciones [22] o [23];

(B) mezcla de la proteína con un componente de mezcla que difiere de la proteína.

- 5 [25] Método de acuerdo con la realización [24], en el que la mezcla es un producto alimentario, un pienso para animales, una composición farmacéutica, una composición para la producción de alimentos, una composición de pegamento, una composición de acabado textil o una composición lignocelulósica.

La presente invención se refiere a una célula microbiana que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, en la que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de al menos un promotor heterólogo que, en el tipo silvestre de la célula fuente, controla la expresión de un gen del cual la expresión en la célula fuente de tipo silvestre depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

15 Este espacio extracitosólico se separa del espacio citosólico (citoplasma) mediante la membrana citoplásmica. Como se usa en el presente documento, la expresión "*espacio extracitosólico*" abarca generalmente cualquier elemento volumétrico dentro y más allá de la membrana citoplásmica (cuando se ve desde el espacio citosólico), incluyendo la capa de peptidoglicano así como el periplasma y la membrana bacteriana exterior (en el caso de bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas diderm o bacterias gram-positivas que poseen una membrana exterior). También mediante la expresión "*espacio extracitosólico*" se abarca el área que ésa más lejos del entorno inmediato de la membrana citoplásmica, incluyendo el volumen total del sobrenadante del cultivo.

Preferiblemente, se entiende que "*tipo silvestre*" de una célula significa una célula en la que el genoma está presente en un estado tal como se ha formado naturalmente por evolución. El término se usa tanto para toda la célula como para los genes individuales. En particular, aquellas células o aquellos genes de los que se han modificado las secuencias génicas al menos parcialmente por seres humanos por medio de métodos recombinantes no entran, por lo tanto, dentro del término "*tipo silvestre*".

Como se usa en el presente documento, el término "*proteína*" debe entenderse en su sentido más amplio como un compuesto que comprende dos o más aminoácidos que están conectados mediante un enlace de péptidos, siendo el compuesto el producto de la biosíntesis de proteínas celulares. Por lo tanto, la expresión "*proteína*" no solo abarca proteínas de alto peso molecular (es decir, proteínas que tienen un alto peso molecular de más de 10.000 Da), sino también dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, oligopéptidos que comprenden hasta 10 aminoácidos, polipéptidos que comprenden de 10 a 100 aminoácidos y macropéptidos que comprenden más de 100 aminoácidos. Adicionalmente, dependiendo de la naturaleza de la proteína, pueden comprender, además de los aminoácidos polimerizados, componentes adicionales, tales como residuos de azúcar resultantes de la co- o post-glicosilación translacional.

La proteína puede ser, por ejemplo, una hormona, una toxina, un anticuerpo, una proteína estructural (tal como colágeno), una enzima, una proteína de transporte o una proteína reguladora. Pueden seleccionarse proteínas adecuadas entre el grupo que consiste en una hormona del crecimiento incluyendo hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano des-N-metionilo y hormona del crecimiento bovino; factor relacionado con hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; tiroxina; lipoproteínas; α 1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes, tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; una albúmina sérica, tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; trombopoyetina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factores I de II de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y IGF-II); proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); somatotropinas; un interferón, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (FEC), por ejemplo, M-FEC, GM-FEC y G-FEC; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas periféricas de la membrana; factor acelerador de la desintegración; antígenos virales, tales como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de

transporte; receptores de asentamiento; adresinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente. Las enzimas adecuadas incluyen transglutaminasas, deshidrogenasas (tales como alcohol deshidrogenasas), monooxigenasas, lipasas, proteasas, celulasas, glucosidasas (tales como amilasas, xilanasas, sacarosas, maltasas, arabinasas, isomaltasas o fructasas), nucleasas (tales como ribonucleasas, desoxirribonucleasas, exonucleasas, endonucleasas, topoisomerasas o ligasas), fosfatasa (tales como fitasas o fosfatasa alcalinas), polimerasas (tales como ADN polimerasas o ARN polimerasas) así como liasas.

Las células que son particularmente preferidas de acuerdo con la invención son aquellas de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Escherichia*, *Zymomonas*, *Yarrowia*, *Mycobacterium*, *Methylobacterium*, *Ralstonia* *Clostridium* y *Pseudomonas*, donde son particularmente preferidas *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Zymomonas mobilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Methylobacterium extorquens*, *Ralstonia eutropha* y *Pichia pastoris*. Las células que son las más preferidas de acuerdo con la invención son aquellas de los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Saccharomyces* y *Pichia*, donde son cepas bacterianas muy particularmente preferidas *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

También son particularmente adecuadas células seleccionadas entre el grupo que consiste en *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020, y mutantes y cepas producidas a partir de las mismas que secretan proteínas.

Las células de acuerdo con la presente invención que están modificadas genéticamente con respecto a su tipo silvestre se caracterizan por que comprenden una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

Todas las secuencias génicas conocidas para el experto en la materia que codifican una proteína fluorescente son posibles como una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente. Son particularmente adecuadas las secuencias génicas que codifican proteínas autofluorescentes del género *Aequora*, tales como proteína verde fluorescente (GFP), y variantes de la misma, que son fluorescentes en un intervalo de longitud de onda diferente (por ejemplo, proteína amarilla fluorescente, YFP; proteína azul fluorescente, BFP; proteína cian fluorescente, CFP) o de las cuales se potencia la fluorescencia (GFP o EGFP, o EYFP, EBFP o ECFP mejoradas). Sin embargo, también pueden usarse secuencias génicas que codifican otras proteínas fluorescentes, por ejemplo, DsRed, HcRed, AsRed, AmCyan, ZsGreen, AcGFP, ZsYellow, tales como las que se conocen de BD Biosciences, Franklin Lakes, Estados Unidos de América. También son adecuadas secuencias génicas que codifican proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente basada en flavín mononucleótido (FbFP) que pueden obtenerse de Evocat GmbH, Monheim, Alemania.

La característica según la cual la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico y, por lo tanto, puede controlarse por la célula en función de la secreción de esta proteína, puede realizarse de acuerdo con la invención al nivel de transcripción. Dependiendo de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico se forma en consecuencia más o menos ARNm que puede traducirse en los ribosomas para formar las proteínas fluorescentes.

A este respecto, el control de la expresión al nivel de traducción se ve afectado por la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente que está bajo el control de al menos un promotor heterólogo que, en el tipo silvestre de la célula, controla la expresión de un gen del cual la expresión en la célula de tipo silvestre depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. Una secuencia de ADN que codifica una proteína fluorescente y que está bajo el control de dicho promotor se denomina posteriormente "sensor".

La frase "*bajo el control de al menos un promotor heterólogo*" indica que de manera natural el promotor, en particular en la célula fuente a partir de la cual se ha aislado al menos un promotor y que opcionalmente está modificada genéticamente para aumentar adicionalmente la eficacia del promotor, no regula la expresión de una secuencia génica que codifica la proteína fluorescente. A este respecto, la frase "*que se deriva de dicho promotor*" significa que el menos uno de los promotores que está contenido en la célula modificada genéticamente de acuerdo con la presente invención (es decir, la célula que comprende el sensor) y que regula la expresión de la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente no tiene que ser un promotor que deba estar contenido con una secuencia de ácido nucleico idéntica en una célula fuente. En vez de esto, con el propósito de aumentar la eficacia del promotor, esta secuencia de promotor puede haberse modificado, por ejemplo, mediante inserción, eliminación o intercambio de bases individuales, por ejemplo mediante palindromización de secuencias individuales de ácido nucleico. El al menos un promotor que regula la expresión de la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente tampoco tiene que ser necesariamente un promotor o derivado de un promotor que esté contenido en el genoma de la propia célula modificada genéticamente (es decir, en el genoma de la célula de acuerdo con la presente invención que comprende el sensor). Sin embargo, puede resultar completamente ventajoso si el al menos un promotor es un promotor o se deriva de un promotor que

esté contenido en el genoma de la propia célula modificada genéticamente y en la célula modificada genéticamente controle ahí la expresión de un gen, la expresión del cual depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

En la célula de acuerdo con la presente invención, la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de al menos un promotor. Es preferible que se entienda que la expresión "*bajo el control de al menos un promotor*" en este contexto significa que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está unida funcionalmente a el al menos un promotor. El al menos un promotor y la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente están unidos funcionalmente si estas dos secuencias y, opcionalmente, elementos reguladores adicionales, tales como, por ejemplo, un terminador, están dispuestos secuencialmente de modo que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico. Para esto, no es absolutamente necesaria una unión directa en el sentido químico. Las secuencias de control genético, tales como, por ejemplo, secuencias amplificadoras, también pueden ejercer su función sobre la secuencia diana desde posiciones más retiradas o incluso desde otras moléculas de ADN. Se prefieren las disposiciones en las que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente se sitúa tras la secuencia promotora (es decir, en el extremo 3'), de modo que las dos secuencias están enlazadas covalentemente entre sí. También es posible que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente y el promotor estén unidos funcionalmente entre sí de modo que todavía exista una secuencia parcial del gen homólogo (es decir, aquel gen cuya expresión en la célula de tipo silvestre está regulada por el promotor) entre estas dos secuencias génicas. En la expresión de dicha construcción de ADN, se obtiene una proteína de fusión a partir de la proteína fluorescente y la secuencia de aminoácidos que está codificada por la secuencia parcial correspondiente del gen homólogo. Las longitudes de dichas secuencias parciales del gen homólogo no son críticas siempre y cuando no se vea notablemente alterada la capacidad funcional de la proteína fluorescente, es decir, su propiedad de ser fluorescente cuando se excita con luz de una longitud de onda particular.

Además del al menos un promotor y la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente, de acuerdo con esta realización particular, la célula de acuerdo con la presente invención también puede comprender una secuencia génica que codifica un regulador, en la que el regulador es preferiblemente una proteína que interactúa de cualquier manera, directamente o indirectamente, con una proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico o con una variante de dicha proteína, en particular con una versión mal plegada de la proteína. Esta interacción directa o indirecta entre el regulador y la proteína, que influye en la afinidad de unión de la secuencia promotora a la ARN polimerasa, depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. En este contexto, en principio el regulador puede ser un activador o un represor.

De acuerdo con la invención, en principio son promotores posibles todos los promotores que normalmente controlan, mediante una unión funcional, la expresión de un gen cuya expresión depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. La proteína codificada por dicho gen pertenece preferiblemente al grupo que comprende proteasas, peptidasas, proteínas de choque térmico, proteínas de choque fágico, factores sigma, factores anti-sigma, sistemas de transducción de señal de dos componentes, sistemas de transducción de señal de tres componentes, transportadores ABC, proteínas asociadas a membrana, proteínas periplásmicas, proteínas secretoras putativas, proteínas reguladoras (que por sí mismas regulan otras proteínas), proteínas implicadas en la biogénesis de la pared celular, proteínas implicadas en la biogénesis del ácido teicoico, proteínas fijadoras de penicilinas, proteínas implicadas en la biogénesis de la membrana externa, chaperonas asociadas a la membrana, chaperonas periplásmicas, proteínas sensibles a antibióticos de la pared celular (tales como bacitracina, vancomicina), proteínas sensibles a choque alcalino, proteínas sensibles a detergentes, proteínas sensibles a fenol, proteínas sensibles a disolventes orgánicos, proteínas implicadas en la osmoprotección o proteínas de función desconocida que responden a la secreción de proteínas dependientes de Sec, antibióticos de la pared celular, choque alcalino, detergentes, fenol o disolventes orgánicos, etc.

Los promotores pueden ser además aquellos promotores que, en el caso de una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, interactúan con activadores particulares y de este modo provocan la expresión de la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente, o promotores que se inhiben mediante un represor, difundiéndose el represor lejos del promotor en el caso de una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, como resultado de lo cual se elimina la inhibición y se efectúa la expresión de la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente.

A continuación se describirán ahora con mayor detalle ejemplos adecuados de células de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, debe enfatizarse en este punto que la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

La célula modificada genéticamente puede ser una célula de *Corynebacterium* modificada genéticamente que comprende una secuencia que codifica una proteína fluorescente bajo el control del promotor cg0706 (*Pcg0706*) o una variante del mismo, el promotor cg0996 (*Pcg0996*) o una variante del mismo, el promotor cg0998 (*Pcg0998*) o una variante del mismo, el promotor cg1325 (*Pcg1325*) o una variante del mismo o combinaciones de estos promotores o variantes, en particular combinaciones del promotor cg0996 (*Pcg0996*) o una variante del mismo y el promotor cg0998 (*Pcg0998*) o una variante del mismo, en donde el promotor cg0996 (*Pcg0996*) o la variante del mismo está situado encima del promotor cg0998 (*Pcg0998*) o la variante del mismo, que a su vez está fusionado a una secuencia que codifica una secuencia génica de proteína fluorescente. Si la secuencia que codifica una proteína fluorescente

está bajo el control de una combinación del promotor *cg0996* (*Pcg0996*) o la variante del mismo y el promotor *cg0998* (*Pcg0998*) o la variante del mismo, en donde el promotor *cg0996* (*Pcg0996*) o la variante del mismo está situado cadena arriba del promotor *cg0998* (*Pcg0998*) o la variante del mismo, la secuencia del promotor *cg0998* o la variante del mismo puede estar conectada directamente al promotor *cg0996* o a la variante del mismo o puede estar separada del promotor *cg0996* o de la variante del mismo por hasta 2500 pares de bases, preferiblemente hasta 1000 pares de bases y más preferiblemente hasta 200 pares de bases.

En este caso, una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico conduce a una expresión de la proteína fluorescente. En el caso del promotor *cg0706*, el promotor *cg0998*, el promotor *cg1325* o una variante de estos promotores, dicha célula puede comprender adicionalmente, además del promotor y la secuencia de la proteína fluorescente que está bajo el control del promotor, una secuencia génica que codifica el regulador *cg0706-cg1325* o una variante de esta secuencia o el regulador *cg0996-cg0998* o una variante de esta secuencia. La secuencia de ADN del promotor *cg0706* se corresponde a la **SEQ ID NO 01**, la secuencia de ADN del promotor *cg0996* se corresponde a la **SEQ ID NO 02**, la secuencia de ADN del promotor *cg0998* se corresponde a la **SEQ ID NO 03** y la secuencia de ADN del promotor *cg1325* se corresponde a la **SEQ ID NO 04**. La secuencia de ADN que codifica el regulador *cg0706-cg1325* se corresponde a la **SEQ ID NO 05**, la secuencia de ADN que codifica el regulador *cg0996-cg0998* se corresponde a la **SEQ ID NO 06**.

La célula modificada genéticamente también puede ser una célula de *Bacillus* modificada genéticamente que comprende una secuencia que codifica una proteína fluorescente bajo el control del promotor *htrA* (*PhtrA*) o una variante del mismo. En este caso, una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico también conduce a una expresión de la proteína fluorescente. En el caso del promotor *htrA*, dicha célula puede comprender adicionalmente, además del promotor y la secuencia de la proteína fluorescente que está bajo el control del promotor, una secuencia génica que codifica el regulador *Css* o una variante de esta secuencia. La secuencia de ADN del promotor *htrA* que se regula por el regulador *Css* se corresponde a la **SEQ ID NO 07** y la secuencia de ADN que codifica el regulador *Css* se corresponde a la **SEQ ID NO 08**.

La célula modificada genéticamente puede ser una célula de *Bacillus* modificada genéticamente que comprende una secuencia que codifica una proteína fluorescente bajo el control del promotor *liaL* (*PliaL*) o una variante del mismo. En este caso, una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico conduce de nuevo a una expresión de la proteína fluorescente. En el caso del promotor *liaL*, dicha célula puede comprender adicionalmente, además del promotor y la secuencia de la proteína fluorescente que está bajo el control del promotor, una secuencia génica que codifica el regulador *LiaR* o una variante de esta secuencia, una secuencia génica que codifica la proteína *LiaF* o una variante de esta secuencia, una secuencia génica que codifica la proteína *LiaS* o una variante de esta secuencia o una combinación de dos o más de estas secuencias. La secuencia de ADN del promotor *liaL* que se regula mediante el regulador *LiaR* se corresponde a la **SEQ ID NO 09**, la secuencia de ADN que codifica el regulador *LiaR* se corresponde a la **SEQ ID NO 10**, la secuencia de ADN que codifica la proteína *LiaF* se corresponde a la **SEQ ID NO 11** y la secuencia de ADN que codifica la proteína *LiaS* se corresponde a la **SEQ ID NO 12**.

La célula modificada genéticamente puede ser una célula de *Mycobacterium* modificada genéticamente que comprende una secuencia que codifica una proteína fluorescente bajo el control del promotor *mprA* (*PmprA*) o una variante del mismo. En este caso, una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico conduce de nuevo a una expresión de la proteína fluorescente. En el caso del promotor *mprA*, dicha célula puede comprender adicionalmente, además del promotor y la secuencia de la proteína fluorescente que está bajo el control del promotor, una secuencia génica que codifica el regulador *MprB* o una variante de esta secuencia, una secuencia génica que codifica el factor sigma σE (SigE) o una variante de esta secuencia o una combinación de ambas secuencias. La secuencia de ADN del promotor *mprA* que se regula mediante el regulador *MprB* por medio del factor sigma σE (SigE) se corresponde a la **SEQ ID NO 13**, la secuencia de ADN que codifica el regulador *MprB* se corresponde a la **SEQ ID NO 14** y la secuencia de ADN que codifica el factor sigma σE (SigE) se corresponde a la **SEQ ID NO 15**.

La célula modificada genéticamente también puede ser una célula de *Escherichia* modificada genéticamente que comprende una secuencia que codifica una proteína fluorescente bajo el control del promotor *htrA* o una variante del mismo. En este caso, una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico también conduce a una expresión de la proteína fluorescente. En el caso del promotor *htrA*, dicha célula puede comprender adicionalmente, además del promotor y la secuencia de la proteína fluorescente que está bajo el control del promotor, una secuencia génica que codifica el regulador *CpxR* o una variante de esta secuencia. La secuencia de ADN del promotor *htrA* que se regula por el regulador *CpxR* se corresponde a la **SEQ ID NO 16** y la secuencia de ADN que codifica el regulador *CpxR* se corresponde a la **SEQ ID NO 17**.

El término "variante" como se ha usado anteriormente cuando al describir un determinado promotor X o la secuencia génica Y que codifica un determinado regulador comprende

(1) todos los ácidos nucleicos que son al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 % o al menos un 99,9 %, lo más preferiblemente

un 100 % idénticos a las secuencias génicas X e Y, respectivamente, siendo la identidad, la identidad sobre la longitud total del ácido nucleico correspondiente;

(2) en caso de una secuencia génica Y que codifica un determinado regulador, todos los ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 % o al menos un 99,9 %, lo más preferiblemente un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del regulador correspondiente;

(3) en caso de una secuencia génica Y que codifica un regulador, todos los ácidos nucleicos que codifican el mismo regulador, pero que difieren de la secuencia génica Y debido a la degeneración del código genético.

(4) todos los ácidos nucleicos capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con una secuencia complementaria de las secuencias X e Y, respectivamente.

El término "*hibridación*" como se usa en el presente documento incluye "*cualquier proceso mediante el cual una cadena de molécula de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través del emparejamiento de bases*" (J. Coombs (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York). La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre las moléculas de ácido nucleico) se ven afectadas por factores tales como el grado de complementariedad entre las moléculas de ácido nucleico, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la Tf del híbrido formado y la proporción G:C dentro de las moléculas de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "*Tf*" se usa en referencia a la "*temperatura de fusión*". La temperatura de fusión es la temperatura a la cual una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocia a medias en cadenas individuales. La ecuación para calcular la Tf de moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica. Según se indica mediante referencias convencionales, una estimación simple del valor de la Tf puede calcularse mediante la ecuación: $Tf = 81,5 + 0,41(\% \text{ de G+C})$, cuando un ácido nucleico está en una solución acuosa en NaCl 1 M (véase por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985)). Otras referencias incluyen cálculos más complejos, que tienen en cuenta características tanto estructurales como de secuencia para el cálculo de la Tf. Las condiciones rigurosas son conocidas para los expertos en la materia y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6.

En particular, la expresión "*condiciones rigurosas*" se refiere a condiciones, en las que 100 nucleótidos contiguos o más, 150 nucleótidos contiguos o más, 200 nucleótidos contiguos o más o 250 nucleótidos contiguos o más, que son un fragmento o idénticos a la molécula complementaria de ácido nucleico (ADN, ARN, ADNmc o ARNmc) se hibridan en condiciones equivalentes a la hibridación en dodecilsulfato sódico al 7 % (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado con 2 × SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferiblemente a 65 °C, con una molécula de ácido nucleico específica (ADN; ARN, ADNmc o ARNmc). Preferiblemente, las condiciones de hibridación son equivalentes a la hibridación en dodecil sulfato sódico al 7 % (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado con 1 × SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferiblemente 65 °C, más preferiblemente las condiciones de hibridación son equivalentes a la hibridación en dodecil sulfato sódico al 7 % (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado con 0,1 × SSC, SDS al 0,1 % a 50 °C o 65 °C, preferiblemente 65 °C. Preferiblemente, los nucleótidos complementarios se hibridan con un fragmento o los ácidos nucleicos *fruA* completos. Como alternativa, las condiciones de hibridación preferidas abarcan hibridación a 65 °C en 1 × SSC o a 42 °C en 1 × SSC y formamida al 50 %, seguido de lavado a 65 °C en 0,3 × SSC o hibridación a 50 °C en 4 × SSC o a 40 °C en 6 × SSC y formamida al 50 %, seguido de lavado a 50 °C en 2 × SSC. Otras condiciones de hibridación preferidas son SDS al 0,1 %, SSD 0,1 y 65 °C.

Por lo tanto, en principio hay diversas posibilidades para producir una célula de acuerdo con la invención que comprende un promotor descrito anteriormente y un ácido nucleico que codifica una proteína fluorescente y está bajo el control de este promotor.

Una primera posibilidad consiste en, por ejemplo, partir de una célula cuyo genoma ya comprende uno de los promotores descritos anteriormente y preferiblemente una secuencia génica que codifica el regulador correspondiente, y después introducir en el genoma de la célula una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente de modo que esta secuencia génica esté bajo el control del promotor. Si fuera adecuado, puede modificarse la propia secuencia de ácido nucleico del promotor, antes o después de la integración de la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente en el genoma, con uno o más intercambios de nucleótidos, eliminaciones de nucleótidos o inserciones de nucleótidos con el propósito de aumentar la eficacia del promotor.

Una segunda posibilidad consiste, por ejemplo, en introducir en la célula una o más construcciones de ácido nucleico que comprenden la secuencia promotora y la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente y está bajo el control del promotor, siendo aquí también posible modificar la secuencia de ácido nucleico del propio promotor con uno o más intercambios de nucleótidos, eliminaciones de nucleótidos o inserciones de nucleótidos con el propósito de aumentar la eficacia del promotor. La inserción de la construcción de ácido nucleico de manera cromosómica o extracromosómica, por ejemplo en un vector replicante extracromosómico. Son vectores adecuados aquellos que se replican en las cepas bacterianas particulares. Numerosos vectores de plásmidos conocidos, tales como, por ejemplo, pZI (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKExl (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) están basados en los plásmidos crípticos pHM1519,

pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmidos, tales como, por ejemplo, aquellos que están basados en pCG4 (documento US 4.489.160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), o pAG1 (documento US 5.158.891), pueden utilizarse de la misma manera. Sin embargo, esta lista no es limitante para la presente invención.

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

La presente invención también se refiere a un método para la identificación de una célula que se caracteriza por una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular, comprendiendo el método las etapas:

- 20 α 1) provisión de una suspensión celular que comprende las células de acuerdo con la presente invención que están modificadas genéticamente con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- α 2) modificación genética de las células para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- 25 α 3) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
- α 4) opcionalmente separación de las células identificadas desde la suspensión celular.

En la etapa α 1) del método de acuerdo con la invención, se proporciona en primer lugar una suspensión celular que comprende un medio nutritivo y un gran número de células modificadas genéticamente descritas anteriormente.

- 30 En la α 2) del método de acuerdo con la invención, una o más de las células en la suspensión celular se modifica o modifican después genéticamente para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

La modificación genética de la suspensión celular puede realizarse mediante mutagénesis dirigida o no dirigida o mediante ingeniería metabólica, prefiriéndose particularmente la mutagénesis no dirigida.

- 35 En la mutagénesis dirigida, se generan mutaciones en genes particulares de la célula de una manera controlada. Las mutaciones posibles son transiciones, transversiones, inserciones y eliminaciones. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos sobre la actividad de la enzima, se hace referencia a "*mutaciones de cambio de sentido*" o "*mutaciones sin sentido*". Las inserciones o eliminaciones de al menos un par de bases en un gen conducen a "*mutaciones del marco de lectura*", como consecuencia de las cuales se incorporan aminoácidos incorrectos o se interrumpe prematuramente la traducción. Las eliminaciones de varios codones conducen típicamente a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las instrucciones para generar dichas mutaciones pertenecen a la técnica anterior y pueden encontrarse en libros de texto de genética y biología molecular conocidos, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("*Molekulare Genetik*", 6ª edición, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker ("*Gene und Klonen*", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("*Allgemeine Genetik*", Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1986). Pueden encontrarse detalles, en particular referencias bibliográficas útiles relacionadas con estos métodos de mutagénesis dirigida, por ejemplo, en el documento DE-A-102 24 088.

- Sin embargo, es particularmente preferible de acuerdo con la invención si la modificación genética en la etapa α 2) del método se realiza mediante mutagénesis no dirigida. Un ejemplo de dicha mutagénesis no dirigida es el tratamiento de las células con productos químicos, tales como, por ejemplo, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina o irradiación de las células con luz UV. Dichos métodos para inducir mutaciones son generalmente conocidos y pueden buscarse, entre otros, en Miller ("*A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) o en el libro de referencia "*Manual of Methods for General Bacteriology*" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., Estados Unidos de América, 1981).

- 55 De acuerdo con una realización adicional del proceso de acuerdo con la presente invención, esto también es posible si en la etapa α 2) del método, la modificación genética se consigue mediante ingeniería metabólica. Como se usa en el presente documento, la expresión "*ingeniería metabólica*" se refiere a una modificación genética dirigida de la

información celular genética. Esta modificación incluye la introducción de genes en una especie que no pertenecen a la especie (es decir, genes heterólogos), la duplicación de genes nativos (es decir, genes homólogos), la eliminación de genes, la redistribución de genes homólogos o heterólogos o la introducción de secuencias reguladoras, tales como secuencias señal, atenuadores, promotores o terminadores. Los métodos para realizar ingeniería metabólica son conocidos en la técnica y pueden derivarse de libros de texto conocidos sobre genética y biología molecular, tales como el libro de texto Mülhardt ("The experimenter: molecular biology / genomics", 6ª edición, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 2009), de Wink ("Molecular Biotechnology: Concepts, Methods and Applications", 2ª edición, Wiley -VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, 2011).

Un ejemplo de ingeniería metabólica es la introducción de secuencias reguladoras que codifican los péptidos señal Sec y, cuando se fusionan directa o indirectamente con un gen que codifica una secuencia de proteínas, debido a la secreción de la proteína de fusión desde la célula (Rusch and Kendall, 2007, "Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport", Biochemistry 46, 9665e9673; Bendtsen et al., 2004: "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0", J. Mol. Biol. 340, 783e795; Nielsen et al., 1997: "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites", Protein Eng. 10, 1e6; von Heijne y Abrahmsen, 1989: "The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins", Protein Eng. 2, 531e534; von Heijne, 1989: "Species-specific variation in signal peptide design: Implications for protein secretion in foreign hosts", FEBS Lett. 244, 439e446; Dalbey et al., 2012: "Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway", Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 311e350). Otros ejemplos de ingeniería metabólica son la variación del uso del codón del gen codificante de proteínas, la variación del promotor bajo el control del cual se encuentra el gen codificante de proteínas o la variación del sitio de unión a ribosomas en la región cadena arriba del gen codificante de proteínas.

Mediante la modificación genética de la célula en la etapa $\alpha 2$) del método, dependiendo de la naturaleza de la mutación que ha tenido lugar en la célula, en una célula particular, por ejemplo como consecuencia de una actividad enzimática aumentada o reducida, una expresión aumentada o reducida de una enzima particular, una actividad aumentada o reducida de una proteína de transporte particular, una expresión aumentada o reducida de una proteína de transporte particular, una mutación en una proteína reguladora, una mutación en una secuencia reguladora, una mutación en una proteína estructural, una mutación en un elemento de control de ARN, la introducción de una nueva actividad enzimática (heteróloga), la introducción de una nueva proteína reguladora (heteróloga), la introducción de una nueva secuencia reguladora (heteróloga o sintética), la introducción de una nueva proteína estructural (heteróloga) o la introducción de un nuevo elemento de control de ARN (heterólogo), puede haber un aumento de la secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico que tiene influencia sobre la expresión de la proteína fluorescente por la interacción con una proteína reguladora correspondiente mediante el promotor. Una célula en la que se aumenta la secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico como consecuencia de la mutación se distingue por lo tanto en que la proteína fluorescente se forma en esta célula. Por lo tanto, el gen para la proteína fluorescente actúa como un gen indicador para una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

En la etapa $\alpha 3$) del método, del método de acuerdo con la invención, las células individuales en la suspensión celular que tienen una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico se identifican por tanto mediante la detección de la actividad de fluorescencia intracelular. Para esto, la suspensión celular se expone a radiación electromagnética en aquella frecuencia que excita las proteínas fluorescentes para la emisión de luz.

De acuerdo con una configuración particular del método de acuerdo con la invención, después, preferiblemente justo después de la identificación de las células en la etapa $\alpha 3$) del método, se realiza una etapa $\alpha 4$) del método más, en la que las células identificadas se separan de la suspensión celular, realizándose preferiblemente esta separación por medio de citometría de flujo (FACS = *separación de células activadas por fluorescencia*), muy particular y preferiblemente por medio de citometría de flujo de alto rendimiento (HT-FACS = *separación de células activadas por fluorescencia de gran productividad*). Pueden encontrarse detalles sobre el análisis de las suspensiones celulares por medio de citometría de flujo, por ejemplo, en Sack U, Tarnok A, Rothe G (eds.): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Basel, Karger, 2007, páginas 27 - 70.

Por medio del método de acuerdo con la invención, en una suspensión celular en la que se han generado mutaciones dirigidas o no dirigidas en las células o en la que se ha alterado la información genética por ingeniería metabólica, es por lo tanto posible aislar de una manera dirigida, sin influir en la vitalidad de las células, aquellas células en las que la mutación ha conducido a una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

El sensor de acuerdo con la presente invención no solo puede identificarse para identificar mutaciones genéticas que conducen a una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico como se ha descrito anteriormente, el sensor también puede utilizarse

- para identificar células que se caracterizan por una secreción particularmente alta de una proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular que comprende una pluralidad de células genéticamente diferentes,

- para optimizar las condiciones de cultivo celular para la secreción de una proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico,
 - para optimizar el medio de cultivo para la secreción de una proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, o
- 5 - para identificar un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o para analizar el efecto de dicho compuesto sobre una población de células bacterianas genéticamente diferentes

como se describe en los siguientes métodos que comprenden las etapas de método $\beta 1$) a $\beta 3$), $\gamma 1$) a $\gamma 3$), ($\delta 1$) a $\delta 3$) o $\epsilon 1$) a $\epsilon 3$).

10 La presente invención también se refiere a un método para la identificación de una célula que se caracteriza por una alta secreción de proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular o para la identificación de una suspensión celular que comprende células que se caracterizan por una alta secreción de proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:

15 $\beta 1$) provisión de

- una suspensión celular que comprende una pluralidad de células de acuerdo con la presente invención que están genéticamente modificadas con respecto a su tipo silvestre y que comprenden una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, en la que las células en la suspensión celular difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico,

o

- una pluralidad de suspensiones celulares, comprendiendo cada suspensión celular, células de acuerdo con la presente invención que están genéticamente modificadas con respecto a su tipo silvestre y que comprenden una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, en la que las suspensiones celulares difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta por las células a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

$\beta 2$) cultivo de células diferentes en la suspensión celular o de las diferentes suspensiones celulares;

30 $\beta 3$) identificación de células individuales en la suspensión celular que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico o identificación de suspensiones celulares individuales que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

35 La expresión "*células que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico*" como se usa junto con este proceso particular se refiere a aquellas células o suspensiones celulares que, comparadas con las otras células en la suspensión celular o comparadas con las otras suspensiones celulares, se caracterizan por una cantidad particularmente alta de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

40 La presente invención también se refiere a un método para la identificación de una composición de medio de cultivo que está optimizada para la producción recombinante de proteína, comprendiendo el método las etapas:

$\gamma 1$) provisión de una pluralidad de medios de cultivo que se diferencian entre sí con respecto a la composición del medio del cultivo;

- $\gamma 2$) cultivo de células de acuerdo con la presente invención que están genéticamente modificadas con respecto a su tipo silvestre y que comprenden una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en los diferentes medios de cultivo, obteniéndose de este modo una pluralidad de suspensiones celulares en las que las células de las suspensiones celulares, debido a la diferencia en la composición de los medios de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

50 $\gamma 3$) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

La expresión "*células que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico*" como se usa junto con este proceso particular se refiere a aquellas suspensiones celulares

que, comparadas con las otras suspensiones celulares, se caracterizan por una cantidad particularmente alta de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. Una alta cantidad de secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en esta suspensión celular indica por tanto que el medio de cultivo usado en esta suspensión celular particular es particularmente ventajoso para el cultivo de células que están destinadas a secretar grandes cantidades de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

Los medios de cultivo que se proporcionan en la etapa γ1) del proceso pueden diferir entre sí con respecto a la clase y cantidad de la fuente de carbono, la clase y cantidad de la fuente de nitrógeno, la clase y cantidad de la fuente de fosfato, la clase y cantidad de elementos traza, la clase y cantidad de sales, la clase y cantidad de detergentes, la clase y cantidad de vitaminas, la clase y cantidad de tampones, etc.

La presente invención también se refiere a un método para la identificación de condiciones de cultivo que están optimizadas para la producción recombinante de una proteína deseada, comprendiendo el método las etapas:

δ1) provisión de una pluralidad de suspensiones celulares que comprenden células de acuerdo con la presente invención que están genéticamente modificadas con respecto a su tipo silvestre y que comprenden una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

δ2) cultivo de las células en estas suspensiones celulares en condiciones de cultivo diferentes de modo que las células en las diferentes suspensiones celulares, debido a la diferencia en las condiciones de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

δ3) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

La expresión "*células que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico*" como se usa junto con este proceso particular se refiere a aquellas suspensiones celulares que, comparadas con las otras suspensiones celulares, se caracterizan por una cantidad particularmente alta de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. Una alta cantidad de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en esta suspensión celular indica por tanto que las condiciones de cultivo que se han seleccionado en esta preparación experimental son particularmente ventajosas para el cultivo de células que están destinadas a secretar grandes cantidades de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

La variación de las condiciones de cultivo en la δ2) del proceso puede referirse, por ejemplo, a la temperatura, la velocidad de agitación, el suministro de oxígeno, la tasa de alimentación, el momento temporal de añadir un inductor, el periodo de cultivo y el modo de realizar el cultivo celular (proceso discontinuo, fermentación continua, etc.).

La presente invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o para analizar el efecto de dicho compuesto sobre una población de células bacterianas genéticamente diferentes o células genéticamente idénticas en estados fisiológicos diferentes o fases de crecimiento diferentes, comprendiendo el método las etapas:

ε1) provisión de una suspensión celular que comprende las células de acuerdo con la presente invención que están genéticamente modificadas con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico; la proteína depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

ε2) cultivo de células en estas suspensiones celulares en presencia del compuesto;

ε3) determinación de la actividad antibiótica del compuesto mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular.

Se ha descubierto sorprendentemente que el sensor de acuerdo con la presente invención también puede usarse para la identificación de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana. Si dicho compuesto daña la membrana de una célula que comprende el sensor de acuerdo con la presente invención, se observa una expresión aumentada de la proteína fluorescente dentro de las células.

Por lo tanto, las células que comprenden el sensor de acuerdo con la presente invención pueden usarse, por ejemplo, para determinar si un compuesto dado tiene la capacidad de dañar la membrana de una célula bacteriana o a qué concentración un compuesto dado tiene la capacidad de dañar la membrana de una célula bacteriana. A este fin, el compuesto se añade a una concentración o concentraciones diferentes a una suspensión celular que comprende el sensor de acuerdo con la presente invención y las células se incuban en presencia de este compuesto para determinar

- mediante la detección de la actividad de fluorescencia intracelular - si el compuesto daña la membrana celular y a qué concentración el compuesto daña la membrana celular.

Las células que comprenden el sensor de acuerdo con la presente invención también pueden usarse, por ejemplo, para determinar qué células en una suspensión celular que comprende una pluralidad de células genéticamente diferentes o células genéticamente idénticas en diferentes estados fisiológicos o diferentes fases de crecimiento son susceptibles a un determinado compuesto que se sabe que daña la membrana celular de células bacterianas. A esta fin, el compuesto se añade a una suspensión celular genéticamente diferentes (por ejemplo, células de especies diferentes) o células genéticamente idénticas en diferentes estados fisiológicos o diferentes clases de crecimiento, comprendiendo cada célula el sensor de acuerdo con la presente invención, y las células se incuban en presencia de este compuesto para determinar - mediante la detección de la actividad de fluorescencia intracelular - qué células son susceptibles para el compuesto.

La presente invención también se refiere a un método para la producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:

I) provisión de una suspensión celular que comprende células de acuerdo con la presente invención que están modificadas genéticamente con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

II) modificación genética de las células para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

III) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

IV) separación de las células identificadas desde la suspensión;

V) identificación de aquellos genes modificados genéticamente G_1 a G_n o aquellas mutaciones M_1 a M_m en las células identificadas y separadas que son responsables de la secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

VI) producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, de la cual el genoma comprende al menos uno de los genes G_1 a G_n y/o al menos una de las mutaciones M_1 a M_m .

De acuerdo con las etapas I) a IV) del método, se generan en primer lugar las células que tienen una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico mediante mutagénesis o mediante ingeniería metabólica y se separan de una suspensión celular. Para detalles sobre estas etapas del proceso se hace referencia a las etapas i) a iv) de proceso que se han descrito anteriormente.

En la etapa V) del método, en las células identificadas y separadas, se identifican después aquellos genes modificados genéticamente G_1 a G_n o aquellas mutaciones M_1 a M_m que son responsables de la secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico por medio de métodos genéticos conocidos para la persona experta en la materia, dependiendo el valor numérico de n y m del número de genes modificados observados y de las mutaciones observadas, respectivamente, en la célula identificada y separada. Preferiblemente, el procedimiento en este contexto es que se analiza en primer lugar la secuencia de aquellos genes o secuencias promotoras en las células que se sabe que estimulan la secreción de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico. Si no se reconoce ninguna mutación en cualquiera de estos genes, se analiza todo el genoma de la célula identificada y separada para identificar, donde sea adecuado, otros genes modificados G_i u otras mutaciones M_i . De esta manera pueden identificarse las secuencias génicas ventajosas modificadas G_i o mutaciones ventajosas M_i que conducen a una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

En una etapa VI) adicional del método, puede producirse después una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, de la cual el genoma comprende al menos uno de los genes G_1 a G_n y/o al menos una de las mutaciones M_1 a M_m . Para esto, se introducen en una célula de una manera dirigida uno o más de los genes modificados ventajosos G y/o mutaciones modificadas M observadas en la V) del método. Esta introducción dirigida de mutaciones particulares puede realizarse, por ejemplo, por medio de "sustitución génica". En este método, una mutación, tal como, por ejemplo, una eliminación, inserción o intercambio de bases, se produce *in vitro* en el gen de interés. A su vez, el alelo producido se clona en un vector que es no-replicativo para el hospedador diana y después este se transforma en el hospedador diana mediante transformación o conjugación. Después de una recombinación homóloga por medio de un suceso de "entrecruzamiento" que efectúa la integración y un segundo suceso de "entrecruzamiento" adecuado que efectúa una escisión en el gen diana o en la secuencia diana, se consigue la incorporación de la mutación o el

alelo.

La presente invención también se refiere a una célula con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico que se ha obtenido por el método descrito anteriormente.

5 La presente invención también se refiere a un proceso para la producción de una proteína deseada, comprendiendo el método las etapas:

(a) producción de una célula microbiana que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico por el método de acuerdo con la reivindicación 13;

10 (b) cultivo de la célula en un medio de cultivo que comprende nutrientes en condiciones en las que la célula produce proteína a partir de los nutrientes.

Las proteínas adecuadas que pueden prepararse por este método comprende una hormona, una toxina, un anticuerpo, una proteína estructural, una enzima, una proteína de transporte o una proteína reguladora. Son particularmente adecuadas aquellas proteínas que ya se han mencionado en relación con la célula de acuerdo con la presente invención.

15 Las células modificadas genéticamente de acuerdo con la invención con una secreción optimizada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico que se producen en la etapa (a) del método pueden cultivarse en el medio nutritivo en la etapa (b) del método continua o discontinuamente en el método *discontinuo* (cultivo por lotes) o en el método de *alimentación discontinua* (método de alimentación) o método de *alimentación discontinua repetida* (método de alimentación repetitiva) con el propósito de producir la proteína. También es concebible un método
20 semi-continuo como el que se describe en el documento GB-A-1009370. Un resumen de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel ("Bioprosesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) o en el libro de texto de Storhas ("Bioreaktoren und periphere Einrichtungen", Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).

25 El medio nutritivo que vaya a utilizarse debe cumplir las necesidades de las cepas particulares de una manera adecuada. Las descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidas en el libro de referencia "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., Estados Unidos de América, 1981).

30 El medio nutritivo puede comprender carbohidratos, tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como, por ejemplo, glicerol y metanol, hidrocarburos, tales como metano, aminoácidos, tales como L-glutamato o L-valina, o ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, como una fuente de carbono. Estas sustancias pueden usarse individualmente o en forma de una mezcla.

35 El medio nutritivo puede comprender compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio, como una fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como una mezcla.

40 El medio nutritivo puede comprender ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico o las sales que contienen sodio correspondientes como una fuente de fósforo. El medio nutritivo debe comprender además sales de metales, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, además de las sustancias mencionadas anteriormente, pueden emplearse sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. Además, pueden añadirse precursores adecuados al medio nutritivo. Las sustancias de partida mencionadas pueden añadirse al cultivo en forma de un único lote o pueden alimentarse durante el cultivo de una manera adecuada.

45 Algunos compuestos básicos, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoníaco o amoníaco acuoso, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se emplean de una manera adecuada para controlar el pH del cultivo. Pueden emplearse agentes antiespumantes, tales como, por ejemplo, poliglicol ésteres de ácidos grasos, para controlar el desarrollo de espuma. Pueden añadirse al medio, sustancias adecuadas que tienen una acción selectiva, tales como, por ejemplo, antibióticos, para mantener la estabilidad de los plásmidos. Se introducen
50 en el cultivo oxígeno o gas que contiene oxígeno, tales como, por ejemplo, aire, para mantener condiciones aeróbicas. Normalmente, la temperatura del cultivo es de 15 °C a 45 °C, y preferiblemente de 25 °C a 40 °C.

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de una mezcla, comprendiendo el método las etapas:

(A) producción de una proteína por el método descrito anteriormente;

55 (B) mezcla de la proteína con un componente de mezcla que difiere de la proteína.

La mezcla puede ser un producto alimentario, un pienso para animales, una composición farmacéutica, una composición para producción de alimentos, por ejemplo una mezcla que comprende enzimas amilolíticas y enzimas lipolíticas que se usan como sustitutos enzimáticos de monoglicéricos para conseguir perfiles de textura de miga en productos horneados fermentados con levadura, una composición de pegamento, una composición de acabado textil o una composición lignocelulósica.

La invención se explica ahora con mayor detalle con la ayuda de figuras y de ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra la detección de la fluorescencia en función de la concentración de una bacitracina (Bac) en la cepa pSen0706 de ATCC 13032 (véase el Ejemplo 1c).

La Figura 2 muestra la detección de la fluorescencia en función de la concentración de una vancomicina (Van) en la cepa pSen0706 de ATCC 13032 (véase el Ejemplo 1c).

La Figura 3 muestra la detección de la fluorescencia en función del nivel de secreción de AmyE o la concentración de AmyE en el lado trans de la membrana citoplásmica en la cepa pSen0706 pCLTON2-AmyE de ATCC 13032 (véase el Ejemplo 1e).

La Figura 4 muestra la detección de la fluorescencia en función del nivel de secreción de cutinasa o la concentración de cutinasa en el lado trans de la membrana citoplásmica en la cepa pSen0996_8 pCLTON2 de ATCC 13032 (Ejemplo 3d)

Ejemplo 1

Producción de una célula de acuerdo con la invención según la primera realización mediante el ejemplo de una célula en la que una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente está bajo el control del promotor *cg0706* y en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la presencia y concentración de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o de la concentración de α -amilasa (AmyE) en el lado *trans* de la membrana citoplásmica.

a) Construcción de vectores pSen0706 y pSen0706S

La construcción de la fusión del promotor P(*cg0706*) con el gen indicador *eyfp* (**SEQ ID NO 18**; secuencia de proteínas de la eYFP: **SEQ ID NO 19**) se consiguió mediante la amplificación de PCR de la secuencia promotora y posterior clonación en el vector pSenLys (Binder et al.: "A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level"; Genome Biology 13(5), R40, 2012). El ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 sirvió como plantilla y los oligonucleótidos 0706-Sal-fII (**SEQ ID NO 20**) y 0706-RBSNde-r (**SEQ ID NO 21**) sirvieron como cebadores. pSenLys ya comprende la secuencia que codifica *eyfp*.

0706-RBSNde r:
GCGCATATGATATCTCCTTCTTCTAGCGGGTCTGCCACATTGCTG

0706-Sal-fII:
GCGGTCGACGGGTAAACGTGGGATATAAA

Después de la purificación del fragmento amplificado en un gel de agarosa al 0,8 %, el fragmento se digirió con las enzimas de restricción *SalI* y *NdeI* y, después de la purificación de la mezcla de reacción, el fragmento se ligó al vector pSenLys, que también se había abierto con *SalI* y *NdeI*, y se desfosforiló. La mezcla de ligadura se usó directamente para transformar *E. coli* XL1-blue, y la selección de los transformantes se realizó en placas LB que contenían 50 μ g/ml de kanamicina. Las 32 colonias que crecieron en estas placas, y que por lo tanto eran resistentes a la kanamicina, se utilizaron para la PCR de las colonias. La PCR de las colonias se realizó con los cebadores SenCas-fw (**SEQ ID NO 24**) y TKP-seq-rv (**SEQ ID NO 25**), para comprobar si el fragmento de promotor se había insertado en el vector pSenLys. El análisis de PCR de las colonias en un gel de agarosa mostró el producto de PCR esperado con un tamaño de 343 pb en las muestras que se habían analizado, con lo cual se cultivaron cuatro colonias para preparaciones de plásmidos a mayor escala. Después de 16 h de cultivo, estos cultivos se recogieron mediante centrifugación y se preparó el ADN plasmídico. Dos de estas preparaciones de plásmidos se secuenciaron con los cebadores utilizados en la PCR de la colonia y la secuencia de los insertos mostró una identidad del 100 % con la secuencia esperada. El plásmido resultante se nombró pSen0706 (**SEQ ID NO 35**).

El plásmido pSen0706S, una variante de pSen0706 que transmite una resistencia a espectinomicina en lugar de la resistencia a kanamicina, se obtuvo mediante amplificación de la secuencia mediadora de la resistencia a la espectinomicina por PCR y la posterior clonación del producto de PCR en el vector pSen0706. El plásmido pEKEx3 sirvió como plantilla para la PCR y los oligonucleótidos Spc SacII-f (**SEQ ID NO 22**) y Spc Bgl-r (**SEQ ID NO 23**) sirvieron como cebadores.

Spc SacII-f:
GCGCCGCGGACTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG

Spc Bgl-r:

GCGAGATCTTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGAC

Después de la purificación del fragmento amplificado en gel de agarosa al 0,8 %, el fragmento se digirió con las enzimas de restricción *SacII* y *BglII* y, después de la purificación de la mezcla de reacción, el fragmento se ligó al vector pSen0706, que también se había digerido con *SacII* y *BglII*, y se desfosforiló. La mezcla de ligadura se usó directamente para transformar *E. coli* XL1-blue, y la selección de los transformantes se realizó en placas LB que contenían 100 µg /ml de espectinomicina. Se utilizaron 4 colonias que crecieron en estas placas, y que por lo tanto eran resistentes a la espectinomicina, para inocular cultivos líquidos (5 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de espectinomicina). Después de 16 h de cultivo, estos cultivos se centrifugaron y se preparó el ADN plasmídico. 2 de estas preparaciones de plásmidos se secuenciaron con cebadores SenCas-fw (**SEQ ID NO 24**) y TKP-seq-rv (**SEQ ID NO 25**) y la secuencia del inserto mostró un 100 % de identidad con la secuencia esperada. El plásmido resultante se nombró pSen0706S.

SenCas-fw:
GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATG

TKP-seq-rv:
CGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCG

b) Transformación de *Corynebacterium glutamicum* con pSen0706

Las células competentes de la cepa ATCC 13032 de *C. glutamicum* se prepararon según lo descrito por Tauch et al., 2002 (Curr Microbiol. 45(5) (2002), páginas 362-7. Estas células se transformaron por electroporación con pSen0706 según lo descrito por Tauch et al.. La selección de los transformantes se realizó sobre placas BHIS con 25 µg/ml de kanamicina. Los clones obtenidos de este modo se nombraron ATCC 13032 pSen0706.

c) Detección de la fluorescencia en función de la concentración de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida de su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana.

El análisis de la emisión de fluorescencia *in vivo* se realizó cultivando las células de la cepa ATCC 13032 pSen0706 con 0,8 ml de medio CGXII (Keilhauer et al, 1993, J. Bacteriol. 175: 5595-603) en dimensión de microtitulación (Flowerplate® MTP-48-B) en el sistema BioLector (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, Alemania). Este sistema permite el cultivo paralelo de 48 cultivos y mediciones ópticas regulares y automatizadas del crecimiento del cultivo así como de la fluorescencia. Se inocularon 10 cultivos con células de la cepa ATCC 13032 pSen0706 en una DO de 0,1 y se cultivaron durante 24 horas. Después de 4 horas, se añadieron las sustancias antibióticas vancomicina o bacitracina a los cultivos. Las concentraciones de vancomicina se ajustaron a 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20 µg/ml y las concentraciones de bacitracina se ajustaron a 0; 1; 4 µg/ml. Cada 10 minutos se midieron las densidades celulares de los cultivos y la fluorescencia. La fluorescencia se excitó con luz de una longitud de onda de 485 nm, la medición de la emisión de fluorescencia de EYFP se realizó a 520/10 nm. La fluorescencia de los cultivos se ha registrado por medio del software BioLecton V.2.4.1.0. Se observó que las emisiones de fluorescencia de cultivos con diferentes concentraciones de vancomicina o bacitracina también eran diferentes (figuras 1 y 2).

d) Transformación de ATCC 13032 pSen0706 con pCLTON2-AmyE

Las células competentes de la cepa ATCC 13032 pSen0706 de *C. glutamicum* como se han descrito anteriormente se transformaron mediante electroporación con el vector pCLTON2-AmyE como se ha descrito anteriormente. Este vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima amilolítica α -amilasa (AmyE) de *Bacillus subtilis* y el péptido señal nativo específico de Sec para permitir la exportación de la proteína sobre la ruta Sec de *Corynebacterium glutamicum*. El pCLTON2-AmyE se preparó mediante amplificación de la secuencia codificante de AmyE a partir de ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* con los cebadores AmyE-HpaI-f (**SEQ ID NO 33**) y AmyE-SacI-r (**SEQ ID NO 34**), restricción con *HpaI* y *SacI* y ligadura en el vector pCLTON2 cortado por *SmaI*/*SacI*, un derivado de pCLTON1 que confiere resistencia a espectinomicina (Un vector de expresión inducible por tetraciclina para *Corynebacterium glutamicum* que permite una expresión génica fuertemente regulable. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2): 142-7). Los clones obtenidos de este modo se nombraron ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE.

AmyE-Hpa-f:
GCGCGTTAACCGAAGGAGATATAGATATGTTTGC

AmyE-Sac-r:
CAGTGAATTTCGAGCTCCTAGTG

e) Detección de la fluorescencia en función del nivel de secreción de AmyE o la concentración de AmyE en el lado trans de la membrana citoplásmica (variación de parámetros)

El análisis de la emisión fluorescencia *in vivo* se realizó cultivando las células de la cepa ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE con 0,8 ml de medio CGXII (Keilhauer et al, 1993, J. Bacteriol. 175: 5595-603) en dimensión de microtitulación (Flowerplate® MTP-48-B) en el sistema BioLector (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, Alemania). Se inocularon 3 cultivos con células de la cepa ATCC 13032 pSen0706 pCLTON2-AmyE en una DO de 0,1 y se cultivaron

durante 24 horas. Después de 4 horas, se indujo la expresión de AmyE mediante la adición de anhidrotetraciclina (ATc). Las concentraciones de ATc se ajustaron a 0, 100, 250 ng/ml para provocar intensidades de expresión diferentes. Cada 10 minutos se midieron las densidades celulares de los cultivos y la fluorescencia. La fluorescencia se excitó con luz de una longitud de onda de 485 nm, la medición de la emisión de fluorescencia de EYFP se realizó a 520/10 nm. La fluorescencia de los cultivos se ha registrado por medio del software BioLector V.2.4.1.0. Se observó que también son diferentes las emisiones de fluorescencia de los cultivos que se habían inducido de manera diferente (figura 3). Después de 24 horas, los cultivos en la Flowerplate se centrifugaron para sedimentar las células y para obtener sobrenadantes de cultivo libres de células. Se utilizaron 20 µl de cada sobrenadante de cultivo para cuantificar la actividad enzimática de la AmyE secretada por medio de un ensayo de amilasa (Phadebas Amylase Test, Magle AB, Lund, Suecia). Se observó que, en estas condiciones de cultivo seleccionadas, deben considerarse como una correlación óptima con mayores emisiones de fluorescencia, actividades más altas de amilasa en el sobrenadante del cultivo inducidas por concentraciones de ATc.

Ejemplo 2

Producción de una célula de acuerdo con la invención según la primera realización mediante el ejemplo de una célula en la que una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente está bajo el control del promotor *cg1325* y en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la presencia y concentración de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida a su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana o de la concentración de una determinada proteína en el lado *trans* de la membrana citoplásmica.

a) Construcción del vector pSen1325

La construcción de la fusión del promotor P(*cg1325*) con el gen indicador *eyfp* (**SEQ ID NO 18**; secuencia de proteínas de la eYFP: **SEQ ID NO 19**) se consiguió mediante la amplificación de PCR de la secuencia promotora y posterior clonación en el vector pSenLys (Binder et al.: "A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level"; Genome Biology 13(5), R40, 2012). El ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 sirvió como plantilla y los oligonucleótidos 1325-Sal-f (**SEQ ID NO 26**) y 1325-RBSNde-r (**SEQ ID NO 27**) sirvieron como cebadores. pSenLys ya comprende la secuencia que codifica *eyfp*.

1325-Sal-f:

GCGGTCGACGAGCTGTAAGGGTTTACTTG

1325-RBSNde-r:

GCGCATATGATATCTCCTTCTTAACCAGCGACGCCGCCGATCC

Después de la purificación del fragmento amplificado en un gel de agarosa al 1%, el fragmento se digirió con las enzimas de restricción *SalI* y *NdeI* y, después de la purificación de la mezcla de reacción, el fragmento se ligó al vector pSenLys, que también se había digerido con *SalI* y *NdeI*, y se desfosforiló. La mezcla de ligadura se usó directamente para transformar *E. coli* XL1-blue, y la selección de los transformantes se realizó en placas LB que contenían 50 µg/ml de kanamicina. Las 48 colonias que crecieron en estas placas, y que por lo tanto eran resistentes a la kanamicina, se utilizaron para la PCR de las colonias. La PCR de las colonias se realizó con los cebadores SenCas-fw (**SEQ ID NO 24**) y TKP-seq-rv (**SEQ ID NO 25**) para comprobar si el fragmento de promotor se había insertado en el vector pSenLys. El análisis de PCR de las colonias en un gel de agarosa mostró el producto de PCR esperado con un tamaño de 250 pb en las muestras que se habían analizado, con lo cual se cultivaron cuatro colonias para preparaciones de plásmidos a mayor escala. Después de 16 h de cultivo, estos cultivos se recogieron mediante centrifugación y se preparó el ADN plasmídico. Dos de estas preparaciones de plásmidos se secuenciaron con los cebadores utilizados en la PCR de la colonia y la secuencia de los insertos mostró una identidad del 100 % con la secuencia esperada. El plásmido resultante se nombró pSen1325 (**SEQ ID NO 36**).

b) Transformación de *Corynebacterium glutamicum* con pSen1325

Las células competentes de la cepa ATCC 13032 de *C. glutamicum* se prepararon según lo descrito por Tauch et al., 2002 (Curr Microbiol. 45(5) (2002), páginas 362-7. Estas células se transformaron por electroporación con pSen1325 según lo descrito por Tauch et al.. La selección de los transformantes se realizó sobre placas BHIS con 50 µg/ml de kanamicina. Los clones obtenidos de este modo se nombraron ATCC 13032 pSen1325.

c) Detección de la fluorescencia en función de la concentración de un compuesto que se caracteriza por una actividad antibiótica debida de su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana.

El análisis de la emisión de fluorescencia *in vivo* se realizó cultivando las células de la cepa ATCC 13032 pSen1325 con 0,8 ml de medio CGXII (Keilhauer et al, 1993, J. Bacteriol. 175: 5595-603) en dimensión de microtitulación (Flowerplate® MTP-48-B) en el sistema BioLector (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, Alemania). Se inocularon 13 cultivos con células de la cepa ATCC 13032 pSen1325 en una DO de 0,1 y se cultivaron durante 24 horas. Después de 4 horas, se añadieron las sustancias antibióticas vancomicina o bacitracina a los cultivos. Las concentraciones de vancomicina se ajustaron a 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20 µg/ml y las concentraciones de bacitracina se ajustaron a 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg/ml. Cada 10 minutos se midieron las densidades celulares de los cultivos y la fluorescencia. La fluorescencia se excitó con luz de una longitud de onda de 485 nm, la medición de la emisión de fluorescencia de

EYFP se realizó a 520/10 nm. La fluorescencia de los cultivos se ha registrado por medio del software BioLector V.2.4.1.0. Se observó que las emisiones de fluorescencia de cultivos con diferentes concentraciones de vancomicina o bacitracina también eran diferentes.

Ejemplo 3

- 5 Producción de una célula de acuerdo con la invención según la primera realización mediante el ejemplo de una célula en la que una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente está bajo el control común del promotor *cg0996* y el promotor *cg0998* y en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la concentración de una determinada proteína en el lado *trans* de la membrana citoplásmica.

a) Construcción de vectores pSen0996_8, pSen0996_8c y pSen0996_8e

- 10 Las construcciones de las fusiones de los promotores P(*cg0996*) y P(*cg0998*) con el gen indicador *eyfp* (**SEQ ID NO 18**; secuencia de proteínas de la eYFP: **SEQ ID NO 19**) se consiguieron por medio de síntesis químicas de fragmentos de ADN sintético (**SEQ ID NO 28** para pSen0996_8, **SEQ ID NO 29** para pSen0996_8c y **SEQ ID NO 30** para pSen0996_8e) y su ligadura en el vector pSenLys (Binder et al.: "A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level"; Genome Biology 13(5), R40, 2012). pSenLys ya
15 comprende la secuencia que codifica *eyfp*.

- Después de la escisión de los fragmentos de ADN sintetizados con las enzimas de restricción *Sall* y *NdeI* y la posterior purificación de la mezcla de reacción, los fragmentos de ADN que se habían recortado se usaron en reacciones de ligadura individuales con el vector pSenLys que también se había digerido con *Sall/NdeI* y se desfosforilaron. Las
20 mezclas de ligaduras se usaron directamente para transformar por separado *E. coli* XL1-blue, y las selecciones de transformantes se realizaron en placas LB que contenían 50 µg/ml de kanamicina. Se utilizaron 8 colonias que crecieron en cada una de estas placas, y que por lo tanto eran resistentes a la kanamicina, para las PCR de las colonias. Las PCR de las colonias se realizaron usando los cebadores SenCas-fw (**SEQ ID NO 24**) y TKP-seq-rv (**SEQ ID NO 25**) para verificar que los fragmentos de ADN sintetizados estaban insertados en el pSenLys.

- El análisis de PCR de las colonias en un gel de agarosa mostró los productos de PCR esperados con un tamaño de
25 872 pb en el caso de pSen0996_8, un tamaño de 413 pb en el caso de pSen0996_8c y un tamaño de 2774 en el caso de pSen0996_8e en las muestras que se habían analizado, por lo cual se cultivaron ocho colonias cada una para preparaciones de plásmidos a mayor escala. Después de 16 h de cultivo, estos cultivos se recogieron mediante centrifugación y se preparó el ADN plasmídico. Una de cada una de estas preparaciones de plásmidos se secuenció con los cebadores JPS0003 (**SEQ ID NO 31**) y JPS0004 (**SEQ ID NO 32**) y la secuencia de los insertos mostró un 100
30 % de identidad con la secuencia esperada. Los plásmidos resultantes se nombraron pSen0996_8 (**SEQ ID NO 37**), pSen0996_8c (**SEQ ID NO 38**) y pSen0996_8e (**SEQ ID NO 39**).

JPS0003:
CTGAACCTTGTGGCCGTTTAC

- JPS0004:
35 TTGTTGCCGGAAGCTAGAG

b) Transformación de *Corynebacterium glutamicum* con pSen0996_8, pSen0996_8c y pSen0996_8e

Las células competentes de la cepa ATCC 13032 de *C. glutamicum* se prepararon según lo descrito por Tauch et al., 2002 (Curr Microbiol. 45(5) (2002), páginas 362-7. Estas células se transformaron por electroporación con pSen0996_8 o pSen0996_8c o pSen0996_8e según lo descrito por Tauch et al..

- 40 c) Transformación de ATCC 13032 pSen0996_8 o ATCC 13032 pSen0996_8c o ATCC 13032 pSen0996_8e con pCLTON2-FsCut

- Las cepas competentes de la cepa ATCC 13032 pSen0996_8 o ATCC 13032 pSen0996_8c o ATCC 13032 pSen0996_8e de *C. glutamicum* como se ha descrito anteriormente se transformaron mediante electroporación con el vector pCLTON2-FsCut como se ha descrito anteriormente. Este vector comprende una secuencia de ácido nucleico
45 que codifica enzima lipasa cutinasa (FsCut) de *Fusarium solani pisi* y el péptido señal NprE específico de Sec para la exportación de la proteína sobre la ruta Sec de *Corynebacterium glutamicum*. pCLTON2-FsCut se consiguió por medio de síntesis química de un fragmento de ADN sintético (**SEQ ID NO 33**), restricción del fragmento de ADN sintético DNA con *PstI/SacI* y ligadura del fragmento restringido al vector pCLTON2 digerido de igual manera, un derivado de pCLTON1 que confiere resistencia a espectinomicina (Un vector de expresión inducible por tetraciclina para *Corynebacterium glutamicum* que permite una expresión génica fuertemente regulable. Lausberg F, Chattopadhyay
50 AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2): 142-7). Los clones obtenidos de este modo se nombraron ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut, ATCC 13032 pSen0996_8c pCLTON2-FsCut o ATCC 13032 pSen0996_8e pCLTON2-FsCut.

- 55 d) Detección de la fluorescencia en función del nivel de secreción de cutinasa o la concentración de cutinasa en el lado trans de la membrana citoplásmica (variación de parámetros)

El análisis de la emisión de fluorescencia *in vivo* se realizó cultivando las células de la cepa ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut con 0,8 ml de medio CGXII (Keilhauer et al, 1993, J. Bacteriol. 175: 5595-603) en dimensión de microtitulación (Flowerplate® MTP-48-B) en el sistema BioLector (m2p-labs GmbH, 52499 Baesweiler, Alemania). Se inocularon 3 cultivos con células de la cepa ATCC 13032 pSen0996_8 pCLTON2-FsCut a una DO de 0,1 y se cultivaron durante 24 horas. Después de 4 horas, se indujo la expresión de cutinasa mediante la adición de anhidrotetraciclina (ATc). Las concentraciones de ATc se ajustaron a 0, 100, 250 mM para provocar intensidades de expresión diferentes. Cada 10 minutos se midieron las densidades celulares de los cultivos y la fluorescencia. La fluorescencia se excitó con luz de una longitud de onda de 485 nm, la medición de la emisión de fluorescencia de EYFP se realizó a 520/10 nm. La fluorescencia de los cultivos se ha registrado por medio del software BioLector V.2.4.1.0. Se observó que también son diferentes las emisiones de fluorescencia de los cultivos que se habían inducido de manera diferente (figura 4). Después de 24 horas, los cultivos en la Flowerplate se centrifugaron para sedimentar las células y para obtener sobrenadantes de cultivo libres de células. Se utilizaron 20 µl de cada sobrenadante de cultivo para cuantificar la actividad enzimática de la cutinasa secretada por medio de un ensayo de palmitato de p-nitrofenilo (pNPP). Se observó que, en estas condiciones de cultivo seleccionadas, deben considerarse como una correlación óptima con mayores emisiones de fluorescencia, actividades más altas de cutinasa en el sobrenadante del cultivo inducidas por concentraciones de ATc.

SECUENCIAS

SEQ ID No. 01

```
gcgggtctgc caccatttgc gaaaagtacc agttgcaagg tgtggtgttg gagcttcata 60
accagggttg gcaaaaggga tgaatccctg gttgtggttg ggctcctgaa aagtactcat 120
agactctatt gtggagtgtt gaggctgata agtgaatggg ggaaagccct gaaaagggtg 180
cggttcagggt cttccctgat g 201
```

SEQ ID No. 02

```
accttaaatt catcgcttac aaccttttgc aggttaagaat ttaacaagag ccagttatct 60
tctcttaaaa tgaggaggta actggcttct ttagtcttaa gaggtgttag cataagttaa 120
atatgttcca acgcgtggac gtcttaattg ggaggagtc tgtcacggac tggaagacga 180
aaagggtatc gatg 194
```

SEQ ID No. 03

```
gggaacccat tcgcagcggg ttcgaaaatg tcgatgatta aaccactaaa gagctcacag 60
gaagtgttca gactacttag agtgacgcc cagccacagg gtccataatc aaatcatg 118
```

SEQ ID No. 04

```
accagcgacg ccgccgatcc atttgcgggt ggtgcttcgg gcgagtcgtc gagattgtgc 60
tgggaaaagtc atcgggatca agctccctta tggctgattg agtttttctt tcttcttcaa 120
tcacgcgcaa taagaaccta gagcacatcg gggatttccc ctctcctaac ccctaaaaac 180
ccctgagaaa acgctccaag taaaccctta cagctc 216
```

SEQ ID No. 05

```
atggttgatg tgttttttgt cgatgaccac tccgtgtttc gctccggcgt caaagcagaa 60
ctaggcaacg ccgtcacagt agtcggcgaa gcagggacgg tggcgcagcg cgtagccggc 120
atcaaggcaa gcaaaccaga ggtagtgtct ctgcagctcc acatgcccgga cggcggcggc 180
ctcgagtgcc tccagcagat caacgactcc gatgtggaca ccattttctt ggcactcagt 240
gtctctgatg ctgcggaaga tgtcatcgcc atcatccgtg gcggtgccag gggatacgtg 300
accaaatcaa tctccggtga agaactcatc gaagccatca accgcgtgaa atccggcgac 360
gcattcttct caccacgcct ggcaggcttc gtctcgacg ccttcgccgc ccccgattcc 420
gcagctggcg caggcattgt cgacgcaccc gaaaaagacg ccgcgcgtaga atccggaaaa 480
atcctcgacg acccagttgt cgacgccttc acccgccgag aactcgaagt cctccgccta 540
ctagcccgcg gctacaccta caaagaaatc ggcaagaac tgttcatttc cgtcaaaacc 600
gtggaaaacc acgcctcaaa cattctgcgg aaaacccaac aatccaaccg ccacgcgttg 660
accgggtggg ctactcgag ggtcttgac taa 693
```

SEQ ID No. 06

```
atgttccaac gcgtggacgt cttaattggg aggaagtctg tcacggactg gaagacgaaa 60
agggtatcga tgaaaatttt agttgttgat gacgagcaag ctgtacgtga ctccctgcga 120
```

ES 2 758 096 T3

cggtcccttt	cggtcaacgg	atacaacggt	gttctcgcag	aagaaggcat	ccaagcacta	180
gagatgattg	acaaggaaca	gcctgctttg	gtgatccctg	atgtcatgat	gcctgggatg	240
gaaggacttg	aggtctgtcg	ccaccttcgc	agcgaaggcg	atgatcggcc	aattcttatt	300
cttactgccc	gcgataatgt	ttctgatcgt	gttgggtggc	tcgatgcagg	cgcagatgac	360
tatttggtta	aaccatttgc	tcttgaagag	ctgttggcgc	gcgtccgttc	actgggtcgt	420
cgctctgcag	tggaatcaaa	tcagagttcc	agcattgaac	aggctctatt	atcttattggc	480
gatttgacgc	ttgacccaga	aagtcgagat	gtctaccgca	acggacgcgc	catcagcctt	540
actcgaaacg	agttcgcgct	cctgcaattg	ctcctcaaaa	accaaaggaa	agtgcctact	600
cgcgcccaga	ttttggaaga	ggtatggggc	tgcgatttcc	ccacttcagg	caatgccttc	660
gaggtctaca	ttggatacct	tcgacgcaag	actgaattgg	aaggagaaga	ccgcctgatc	720
catacagtac	gaggagtcgg	atacgtcctg	cgagagaccg	ctccgtga		768

SEQ ID No. 07

atggataact	atcgtgatga	aaacagaacg	aaaggtaatg	agaatgaggt	ctttttaacg	60
aaagagaacg	atcagagcgc	ctcctactcg	gcccgcgaatg	tcattcatga	tcaggagaag	120
aaaaaacgag	gattcggatg	gttcagaccg	ttgcttggcg	gagtgatcgg	cggcagtcctt	180
gctcttggca	tttacacggt	tacaccgctt	ggtgaccatg	attctcagga	cactgcaaaa	240
caatcatcca	gccagcagca	aacgcaatct	gttacagcaa	caagcacctc	ctctgaatct	300
aaaaaaagct	caagcagctc	atctgcattc	aagagcggag	actcttctaa	aatctcagat	360
atggtagaag	acctttcacc	agcgattgtc	ggtattacaa	atcttcaggc	acaatcaaac	420
agctctttgt	tcggctctag	ttcttctgat	tcagcggaag	atacagaaag	cgggttcaggg	480
tcagggtgca	ttttcaaaaa	agagaatggc	aaggcttata	tcattacaaa	taaccacgtc	540
gtagaagggg	catcatcact	gaaggatatct	ttatatgacg	gcactgaggt	tactgcaaaag	600
ctggtaggca	gtgactcggt	aactgattta	gccgtcctcc	aatcagtgga	tgaccacgctc	660
acaaaagtgg	caaaacttcgg	tgattcatct	gatcttagaa	caggcgagac	cgttattcgcg	720
attggggatc	cgcttggaaa	agacctgtcc	cgcacagtaa	cacaaggaat	tgtaagcggc	780
gtggacagaa	cggtttcaat	gtctacatca	gccggcgaaa	cgagcattaa	cgctattcag	840
acagacgcag	caattaatcc	aggtaacagc	ggcggtcctt	tgtaaaatc	agacggcaaaa	900
attgtcggca	ttaacagtat	gaaaatcagt	gaggatgatg	ttgagggtat	cggattcggcc	960
attccaagca	atgacgtaaa	accgattgct	gaagaattgc	tgctctaaag	acaaattgaa	1020
cgctccatata	tcgggtgcag	catgcttgat	ctagagcaag	tgccgcacaaa	ttaccaagaa	1080
ggcacactcg	gcctgttcgg	cagccagctg	aataaaggcg	tttaccatccg	tgaggtcgcct	1140
tcaggctctc	ctgctgaaaa	ggcgggatta	aaagcggagg	atattatcat	cggcctaaaaa	1200
ggtaaagaaa	ttgatacagg	cagtgaattg	cgcaatatct	tatataaaga	cgcaaagatc	1260
ggtgataccg	ttgaagtga	aattctccga	aacggcaaa	aaatgacgaa	aaaaattaaa	1320
ctggatcaaa	aagaagagaa	aacttcgtaa				1350

SEQ ID No. 08

ttgtcataca	ccatttatct	agttgaagat	gaggataacc	tgaatgaact	gctgacgaag	60
tatttagaga	atgagggctg	gaacattaca	tcttttacga	aagggtgaaga	cgccagaaag	120
aaaatgacac	cgtctcccca	cctatggatt	ctcgatatca	tgctgccgga	taccgacggc	180
tatacatata	taaaagaaat	caaggcgaaa	gatcctgacg	tgccgggtcat	ttttatttcc	240
gcccagagatg	cggatattga	cagagtgcct	ggcttagagc	ttggcagcaa	tgactacatt	300
tcaaaagcgt	ttttgcgcgc	ggagctgatt	atccgtgtgc	aaaagctgct	gcagctcgta	360
tataagggaag	ctcctcctgt	ccaaaaaaat	gaaattgcgc	tctcctcgta	tcgggtcgcct	420
gaagacgccc	gcgaggtcta	tgacgaaaa	gggaatatca	tcaatttgac	gtcaaaggaa	480
tttgatctgc	tgctattatt	tatccatcat	aaagggcac	catactctcg	tgaggatata	540
ctcctaaaa	tggtggggaca	tgactacttc	ggaacagacc	gggtcgttga	tgatctcgtc	600
cggagactgc	gcagaaagat	gcctgaattg	aagggtggaga	cgatttacgg	tttcggctac	660
aggatgatgt	catcatga					678

SEQ ID No. 09

tcgggtgcga	gatacgactc	cggtcttata	taaaaatcaa	tctctgattc	gttttgcata	60
tcttccaact	tgtataagat	gaagacaagg	aaaacgaaag	gaggatctgc	atg	113

SEQ ID No. 10

gtgattcgcg	tattattgat	tgatgatcat	gaaatggtca	gaatggggct	cgcggctttt	60
ttggaggcgc	agccgatgat	tgaagtcac	ggcgaagcat	cggacggcag	cgaagggtgtt	120
cggcttgcgt	tggaactgtc	gcctgatgtc	attttaatgg	accttgcctc	ggagggcatg	180
gatggcattg	aagctacaaa	gcaaatttgc	cgggagcttt	cgcacccgaa	aattattgtg	240
ctcactagct	tcatgatga	tgacaaaagt	taccgggtta	ttgaagctgg	cgcgctcagc	300
tatctgttga	aaacctcaaa	agcggcagaa	atcgccgatg	ccatccgcgc	cgcgaagcaag	360
ggagagccga	agctggagtc	aaaagtggcg	ggaaaagtat	tatccaggct	gcgccactca	420
ggtgaaaacg	cgcctccgca	tgaatcgctt	acaaaacggg	agctcgaaat	actctgcctg	480
atcgagaga	gaaagacaaa	caaagaaata	ggcgaggaac	tgtttattac	gattaaaaca	540
gtcaaaaac	atattacgaa	tattttatca	aagctggatg	tcagtgaccg	gacgcaggcg	600
gcgggtgtacg	cacaccgaaa	tcactctcgtg	aattag			636

ES 2 758 096 T3

SEQ ID No. 11

atgacaaaaa	aacagcttct	cggattgata	attgctttat	tcggcatcag	tatgtttttg	60
caaattatcg	gaataggcga	tctgctgttt	tgcccgctct	ttttctgat	tgccggctat	120
ttccttaaaa	aatattcccg	tgattggctt	ggctccgtca	tgtatatctt	tgccggcttt	180
ctatttttga	aaaacctctt	cagcatcacc	tttaatttat	tcggctatgc	gtttgccgca	240
tttctgattt	acgccggcta	caggcttata	aaagggaagc	cgatatttga	accgaatgag	300
aaacaggcca	atctcaataa	aaaagaacat	catgagccgc	caaaagatgt	aaaacatccc	360
gacatgcgca	gcttttttat	cggtgagctg	caaatgatga	agcagccgtt	tgacctgaac	420
gattttaaag	tctctgggtt	tatcggtgat	atcaaaatcg	atttatctaa	agcgatgatt	480
cccagaggag	aaagtacaat	cgtcattagc	ggagtcattg	gtaacgttga	tatttatgta	540
ccatcggacc	ttgaagtggc	tgtcagctcg	gctgttttta	taggagacat	taatctgata	600
ggctcgaaga	aaagcggatt	aagcacgaag	gtatatgccg	cgtaactga	tttttagcgag	660
tcaaagcgcc	gggtaaaagt	gtccgtttcc	ttatttatcg	gtgatgtgga	tgtgaagtac	720
gtatga						726

SEQ ID No. 12

atgagaaaaa	aaatgcttgc	cagcctccaa	tgccgcgcga	tcgcgatgac	aacgggaatc	60
agcctgctcc	ttttgtttg	cctgatttcc	tttatgatgt	tttactatcg	gctcgatccg	120
cttgttttgc	tgatcatcaag	ctggttcgga	attccgttta	tcttgatttt	gcttctgata	180
agcgtgaccg	tcggtttcgc	ctcagggtat	atgtacggca	accggttgaa	gacaaggatt	240
gatacattaa	ttgaatccat	tttaaccttt	gaaaaacggc	atttcgctta	tcggataccg	300
ccgctcgggtg	atgatgaaat	cggcctggct	gctgatcagc	tgaacgaaat	ggcgaagcgc	360
gtggagcttc	aagtcgcata	cctccagaaa	ctttccaatg	aacgtgcgga	atggcaggct	420
caaatgaaga	agtcggttat	ctcagaagaa	cgccagcgat	tgccagaga	tcttcatgat	480
gcggtcagcc	agcagctctt	tgccatatcg	atgatgacat	cagccgtgct	ggaacatgtc	540
aaggatgctg	atgacaaaac	agtcaagcgg	atcaggatgg	tcgagcatat	ggcaggcgaa	600
gccccaaatg	agatgagggc	gctgctgctc	catttacggc	ctgttaccct	tgaaggaaaa	660
gggctgaagg	agggccttac	ggagcttttg	gacgagttcc	gaaaaaagca	gccgattgat	720
attgagtggg	atatacagga	cacagcgata	tccaagggtg	ttgaagacca	cttgttcaga	780
atcgtgcagg	aggccctttc	aaacgtattt	agacattcaa	aagcgtcaaa	agtaaccgtg	840
attctgggca	taaaagaacag	ccagctccgt	ctgaagggtg	ttgataatgg	aaaaggcttt	900
aaaatggacc	aggtgaaagc	ctcctcatac	ggcttgaatt	ctatgaaaga	acgtgcaagt	960
gaaatcgccg	gtgtcgccga	agtgatttca	gtagaaggaa	aaggcactca	aatcgaagtg	1020
aaggctcccg	tttttcggga	agaaaaagga	gagaacgaac	gtgatttcgag	tattattgat	1080
tga						1083

SEQ ID No. 13

ggacatcgag	aactctcggg	gttcggcgaa	cgttatctca	gtggaatctc	agtcacgcgc	60
cgcaacctag	ttgtgcagtt	actgttgaaa	gccacaccca	tgccagtcca	cgcatag	116

SEQ ID No. 14

atgtggtggt	tccgccgcgc	agaccgggcg	cgcgtgcgcg	ccaccagctc	attatccctg	60
cggtggcggg	tcattgctgct	ggcgatgtcc	atggtgcgca	tggtggttgt	gctgatgtcg	120
ttcgccgtct	atgcggtgat	ctcgccgcgc	ctctacagcg	acatcgacaa	ccaactgcag	180
agccggggcg	aactgctcat	cgccagtggc	tcgctggcag	ctgatccggg	taaggcaatc	240
gagggtagcg	cctattogga	tgtcaacgcg	atgctggtca	accccgccca	gtccatctac	300
accgctcaac	agccggggca	gacgctgccc	gtcgtgtgct	ccgagaaggc	ggtgatccgt	360
ggcgagtgtg	tcattgctgcg	gcgcaccacc	gccgaccaac	gggtgcttgc	catccgtctg	420
accaacggta	gttcgctgct	gatctccaaa	agtctcaagc	ccaccgaagc	agtcatgaac	480
aagctgcgtt	gggtgctatt	gatcgtgggt	gggatcgggg	tgccggctgc	cgcggtggcc	540
gggggggatg	tcaccggggc	cgggctgagg	cgggtgggccc	gcctcaccga	agcgcccgag	600
cggttgggcg	gaaccgacga	cctgcggccc	atcccgctct	tcggcagcga	cgaattggcc	660
aggctgacag	aggcattcaa	tttaattgctg	cgggcgctgg	ccgagtcacg	ggaacggcag	720
gcaaggctgg	ttaccgacgc	cggacatgaa	ttgcgtaccc	cgctaaccgt	gctgcgcacc	780
aatgtcgaa	tcttgatggc	ctcgatggcc	cggggggctc	cgcggctacc	caagcaggag	840
atggtcgacc	tgcgtgccga	tgtgctggct	caaatcgagg	aattgtccac	actggtaggc	900
gatttggtgg	acctgtcccg	aggcgacgcc	ggagaagtgg	tgacagagcc	ggtcgacatg	960
gctgacgtcg	tcgaccgcag	cctggagcgg	gtcaggcgcc	ggcgcaacga	tatccttttc	1020
gacgtcgagg	tgattgggtg	gcaggtttat	ggcgataccg	ctggattgtc	gcggatggcg	1080
cttaacctga	tggacaacgc	cgcgaagtgg	agcccgcccg	cgggccacgt	gggtgtcagg	1140
ctgagccagc	tcgacgcgtc	gcacgctgag	ctggtggttt	ccgaccgcgg	ccggggcatt	1200
cccggtgcagg	agcgccgtct	ggtgtttgaa	cggttttacc	ggtcggcatc	ggcacgggcg	1260
ttgccgggtt	cgggcctcgg	gttgccgata	gtcaaacagg	tggtgctcaa	ccacggcgga	1320
ttgctgcgca	tcgaagacac	cgacccaggc	ggccagcccc	ctggaacgtc	gatttacgtg	1380
ctgctccccc	gccgtcggtg	gcgattcccg	cagcttcccc	gtgcgacggc	tggcgctcgg	1440
agcacggaca	tcgagaactc	tcggggttcg	gcgaacgtta	tctcagtggg	atctcagtec	1500
accgcgcgaa	cctag					1515

SEQ ID No. 15

atggaactcc	tcggcggacc	cggggttggg	aatacggaat	cgcaactttg	cgttgccgac	60
ggtgacgact	tgccaaactta	ttgcagtgca	aattcggagg	atctcaatat	cacgaccatc	120
acgaccttga	gtccgaccag	catgtctcat	ccccaacagg	tccgcgatga	ccagtgggtg	180
gagccgtctg	accaatttga	gggcaccgcc	gtattcgacg	ccaccgggga	caaggccacc	240
atgccgtctc	gggatgagct	ggtccgtcag	cacgcccata	gggtgtaccg	gctggtttat	300
cggctctccg	gcaaccagca	cgatgccgaa	gacctgaccc	aggagacctt	tatcagggtg	360
ttccggtcgg	tcagaaatta	ccagccgggc	accttcgaag	gctggctaca	ccgcataacc	420
accaacttgt	tccctggacat	ggtccgccc	cgggctcgca	tcgggatgga	ggcggttacc	480
gaggactacg	accgggtgcc	cgccgatgag	cccaaccccc	agcagatcta	ccacgacgca	540
cggctgggag	ctgacctgca	ggctgccttg	gcctcgctgc	cgcgggagtt	togtgcgcgg	600
gtgggtgctg	gtgacatcga	gggtctgtcg	taccaggaga	tcggcgccac	actggcgctg	660
aagctcggga	cggtagctag	ccggatacac	cgcggacgcc	aggcactgcg	ggactacctg	720
gcagcgcacc	ccgaacatgg	cgaagtgcga	gttcacgtca	accagtttcg	ctga	774

SEQ ID No. 16

gtaaattacc	gtcagattct	cctgagtttc	cgctatggga	atattattac	cgttgccgcc	60
tgtgtcagga	ttatatcagc	ggtatgaccg	acctctatgc	gtgggatgaa	taccgacgtc	120
tgatggccgt	agaacaataa	ccaggctttt	gtaaaagcga	acaataaatt	tttacctttt	180
gcagaaactt	tatttcggaa	cttcaggcta	taaaacgaat	ctgaagaaca	cagcaatttt	240
gcgttatctg	ttaatcgaga	ctgaaataca	tg			272

SEQ ID No. 17

atgaataaaa	tctgttagt	tgatgatgac	cgagagctga	cttccttatt	aaaggagctg	60
ctcgagatgg	aaggcttcaa	cgtgattgtt	gcccacgatg	gggaacaggc	gcttgatctt	120
ctggacgaca	gcattgattt	acttttgctt	gacgtaatga	tgccgaagaa	aaatggtatc	180
gacacattaa	aagcacttcg	ccagacacac	cagacgcctg	tcattatggt	gacggcgccg	240
ggcagtgaac	ttgatcgctg	tctcggcctt	gagctggggc	cagatgacta	tctcccgaaa	300
cogtttaatg	atcgtgagct	ggtggcacgt	attcgcgcga	tcttcgcgcg	ttcgcactgg	360
agcgagcaac	agcaaaaaca	cgacaacggt	tcaccgacac	tcggaagttg	tcgcttagtg	420
ctgaatccag	gccgtcagga	agccagcttc	gacgggcaaa	cgcgtggagt	aaccggtact	480
gagtttaccc	tgccttatct	gctggcacag	catctgggtc	aggtgggttc	ccgtgaacat	540
ttaagccagg	aagtgttggg	caaacgcctg	acgccttttc	accgcgctat	tgatatgcac	600
atttccaacc	tgctgcgtaa	actgcgggat	cgtaaagatg	gtcaccgctg	gtttaaaacc	660
ttgcgtggtc	gcggctatct	gatggtttct	gcttcatga			699

ES 2 758 096 T3

SEQ ID No. 18

gtgagcaagg	gcgaggagct	gttcaccggg	gtggtgcccc	tcctgggtcga	gctggacggc	60
gacgtaaacg	gccacaagtt	cagcgtgtcc	ggcgaggggc	agggcgatgc	cacctacggc	120
aagctgaccc	tgaagttcat	ctgcaccacc	ggcaagctgc	ccgtgccctg	gccaccctc	180
gtgaccacct	tcggctacgg	cctgcagtgc	ttcgcccgt	accccgacca	catgaagcag	240
cacgacttct	tcaagtcgc	catgcccga	ggctacgtcc	aggagcgac	catcttcttc	300
aaggacgacg	gcaactacaa	gacccgcgcc	gaggtgaagt	tcgagggcga	caccctggtg	360
aaccgcacgc	agctgaagg	catcaacttc	aaggaggacg	gcaacatcct	ggggcacaag	420
ctggagtaca	actacaacag	ccacaacgtc	tatatcatgg	ccgacaagca	gaagaacggc	480
atcaaggtga	acttcaagat	ccgccacaac	atcgagggcg	gcagcgtgca	gctcgccgac	540
cactaccagc	agaacacccc	catcgccgac	ggccccgtgc	tgctgcccga	caaccactac	600
ctgagctacc	agtcgcgcct	gagcaaagac	cccaacgaga	agcgcgatca	catggtcctg	660
ctggagttcg	tgaccgccgc	cgggatcact	ctcgcatgg	acgagctgta	caagtaataa	720

SEQ ID No. 19

VSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GEGEGDATYG	KLTLKFICTT	GKLPVPWPTL	60
VTTFGYGLQC	FARYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFF	KDDGNYKTRA	EVKFEGDTLV	120
NRIELKGINF	KEDGNILGHK	LEYNYNSHNV	YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IEGGSVQLAD	180
HYQNTPIGD	GPVLLPDNHY	LSYQSALS KD	PNEKRDMVL	LEFVTAAGIT	LGMDELYK	238

SEQ ID NO 20

gcggtcgacg ggtaaactgt ggaataaaa 29

5 SEQ ID NO 21

gcgcatatga tatctcttc ttctagcggg tctgccacat ttgctg 46

SEQ ID NO 22

gcgccgcgga ctaataactg aacgtgactg gcaagag 37

SEQ ID NO 23

10 gcgagatct ctgcctcgtg aagaagggtg tgctgac 37

SEQ ID NO 24

gtcgccgtcc agctcgacca ggaatg 25

SEQ ID NO 25

cggaagcta gagtaagtag ttcg 24

15 SEQ ID NO 26

gcggtcgacg agctgtaagg gtttacttg 29

SEQ ID NO 27

gcgcatatga tatctcttc ttctaaccag cgacgccgcc gatcc 45

SEQ ID No. 28

gaatttaaca	agagccagtt	atcttctctt	aaaatgagga	ggtaactggc	ttctttatgc	60
ttaagaggtg	ttagcataag	tgaaatatgt	tccaacgcgt	ggacgtctta	attgggagga	120
agtctgtcac	ggactggaag	acgaaaagg	tatcgatgaa	aatttttagt	gttgatgacg	180
agcaagctgt	acgttaactc	atcgcccggt	cagctcccg	tccatgccgg	gatcgggatt	240
aggtcttgcc	atcgtgaatc	aggttggtga	tcggcatggt	ggccaactcg	ttgtgggtga	300
atcagatgat	ggcggaacga	gaatcactat	tgatttgcca	ggggaaccca	ttcgacgcgg	360
gttcgaaaat	gtcgatgatt	aaggtaccac	cactaaagag	ctcacaggaa	gtgttcagac	420
tacttagagt	gacgccccag	ccacagggtt	cataatcaaa	tcatgacaaa	tcaattcccc	480
acaaacaacg	gtgagaaccc	ggaccgtgca	tcggaaactc	catcagaaac	caactccggt	540
acctgaactt	taagaaggag	atatcatatg				570

SEQ ID No. 29

caatttaaca	agagccagtt	atcttctctt	aaaatgagga	ggtaactggc	ttctttatgc	60
ttaagaggtg	ttagcataag	tgaaatatgt	tccaacgcgt	ggacgtctta	attgggagga	120
agtctgtcac	ggactggaag	acgaaaagg	tatcgatgtg	aaccatttcg	cagcgggttc	180

20

ES 2 758 096 T3

gaaaatgtcg	atgattaagg	taccaccact	aaagagctca	caggaagtgt	tcagactact	240
tagagtgcg	ccccagccac	agggttcata	atcaaatcat	g		281

SEQ ID No. 30

aatttaacaa	gagccagtta	tcttctctta	aatgaggag	gtaactggct	tctttatgct	60
taagagggtg	tagcataagt	gaaatatgtt	ccaacgcgtg	gacgtcttaa	ttgggaggaa	120
gtctgtcacg	gactggaaga	cgaaaaggg	atcgatgaaa	atttttagttg	ttgatgacga	180
gcaagctgta	cgtgactcct	tgcgacgttc	cctttcgttc	aacggataca	acgttggtct	240
cgcagaagac	ggcatccaag	cactagagat	gattgacaag	gaacagcctg	ccttggtgat	300
cctcgatgtc	atgatgcctg	gtatggacgg	acttgaggtc	tgctgccacc	ttcgcagcga	360
aggcgatgat	cggccaattc	ttattcttac	tgcccgcgat	aatgtttctg	atcgtgttgg	420
tggtcctgat	gcaggcgag	atgactattt	ggctaacca	tttgcctctg	aagagctgtt	480
ggcgcgctgc	cgttcactgg	tgcgtcgctc	tgcatggaa	tcaaatcaga	gttccagcat	540
tgaacaggct	ctattatctt	gtggcgattt	gacgcttgac	ccagaaagtc	gagatgtcta	600
ccgcaacgga	cgcgccatca	gccttactcg	aacagagttc	gcgctcctgc	aattgtcctt	660
caaaaaccaa	aggaaagtgc	tcactcgcg	ccagattttg	gaagaggtat	ggggctgcga	720
tttccccact	tcaggcaatg	ccctcgaggt	ctacattgga	taccttcgac	gcaagactga	780
attggaagga	gaagaccgcc	tgatccatac	agtacgagga	gtcggatacg	tcctgcgaga	840
gaccgctcgg	tgacattaag	gcgaatcggc	gcaggggaaa	atgggcctgc	ccctaccgaa	900
agtgatgact	ccgacggttc	aatgtcgttg	cgttggcgct	tggttttgc	gagcgccact	960
ttggtagctt	tcgctgttgg	tggttattact	gttgcgtcat	attggtctgt	ctccagctat	1020
gtcaccaact	caatcgatcg	tgatctggaa	aaacaagcgg	atgcaatgct	tgacagagcc	1080
agtgaagcgg	gattctatgc	aaccgcagaa	accgaaattg	ctctgttagg	tgaatatgcc	1140
agtgacactc	gaatcgctt	aatcccaact	gggtgggaat	acgtcatcgg	tgaatccata	1200
tcactgctcg	attcagattt	ccttaagagt	aaagaagcgg	ggaaacagat	cctcgtaaca	1260
agtgtctgagc	gcattctcat	gaaacgagat	agctcgggca	cagtgggtgt	ttttgctaaa	1320
gatatgtgtg	ataccgatcg	gcagctcacg	gtgcttgccg	tcattctctt	gatcattggc	1380
ggcagtggtg	ttttggcgtc	gattctgctt	ggtttcatca	ttgcgaagga	ggggctgaaa	1440
ccactgtcaa	agctgcagcg	tgccgtcgaa	gagatcgaac	gaactgatga	gcttcgtgcg	1500
attcccgctg	tggaatatga	tgagttcgct	aagttgactc	gtagtttcaa	tgacatgctc	1560
aaggcactgc	gggagtctcg	taccgggcaa	tctcagttgg	tgccagatgc	aggacacgag	1620
ctgaaaactc	cactgacctc	aatgcggaca	aatattgaat	tgctgttgat	ggcaaccaac	1680
agtggaggat	cgggaatccc	caagggaagaa	ttggatggcc	ttcagcgtga	tgtattggcg	1740
cagatgaccg	aaatgtctga	tttgatttgt	gatcttggtg	atcttgccgc	tgaagaaacc	1800
gccgaaaactg	caagcattgt	agatctcaac	caagtgttgg	aaattgcgct	tgaccgaatg	1860
gaaagccgtc	gcattgacgg	gcggatagat	gtttccgaga	ctgtggattg	gaaactgctg	1920
ggcgatgatt	tttccttaac	cagggcatta	gtaaatgttt	tggaatagc	cattaaatgg	1980
tcgcctgaga	atggcattgt	tcgagtgtcg	atgtcacaga	tcgacaaagc	aacggctcgc	2040
attgttattg	atgattcagg	gcctggaatt	gctgaaaaag	aacgaggatt	agttttggaa	2100
cggttctatc	gcgcgctcag	ctcccgttcc	atgccgggat	cgggattagg	tcttgccatc	2160
gtgaatcagg	ttgtgaatcg	gcattggtgc	caactcggtg	tggttggaatc	agatgatggc	2220
ggaacgagaa	tcactattga	tttgccaggg	gaacccattc	gcagcgggtt	cgaaaatgtc	2280
gatgattaaa	ccactaaaga	gctcacagga	agtgttcaga	ctacttagag	tgacgcccc	2340
gccacagggt	tcataatcaa	atcatgacaa	atcaattccc	cacaaacaac	ggtgagaacc	2400
cggaccgtgc	atcgaaaact	ccatcagaaa	ccaactccgg	tacctgaact	ttaagaagga	2460
gatatcatat	g					2471

SEQ ID NO 31

ctgaacttgt ggccgtttac 20

5 SEQ ID NO 32

ttgttccgg gaagctagag 20

SEQ ID NO 33

gcgcgttaac cgaaggagat atagatatgt ttgc 34

SEQ ID NO 34

10 cagtgaattc gagctcctag tg 22

ES 2 758 096 T3

SEQ ID No. 35

ggatccttat	tacttgtaca	gctcgtccat	gccgagagt	atcccggcgg	cggtcacgaa	60
ctccagcagg	accatgtgat	cgcgcttctc	ggtggggtct	ttgctcaggg	cggactggta	120
gctcaggttag	tggttgtcgg	gcagcagcac	ggggccgctc	ccgatggggg	tggtctgctg	180
gtagtggctg	gcgagctgca	cgtcgccgcc	ctcgatgttg	tgccggatct	tgaagtacac	240
cttgatgcgc	ttcttctgct	tgctggccat	gatataagac	ttgtggctgt	tgtagttgta	300
ctccagcttg	tgccccagga	tggtgcccgc	ctccttgaag	ttgatgccct	tcagctcgat	360
gcggttcacc	aggggtgcgc	cctcgaaact	cacctcggcg	cgggtcttgt	agttgccgct	420
gtccttgaag	aagatgggtg	gctcctggac	gtagccttcg	ggcatggcgg	acttgaagaa	480
gtcgtgctgc	ttcatgtggg	cggggtagcg	ggcgaagcac	tgacggccgt	agccgaagg	540
ggtcacgagg	gtgggccagg	gcacgggcag	cttgccgggt	gtgcagatga	acttcagggt	600
cagcttgccg	taggtggcat	cgccctcgcc	ctcgccggac	acgctgaact	tgtagccggt	660
taagtcgcgc	tcagctcgca	ccaggatggg	caccaccccg	gtgaacagct	cctcgccctt	720
gctcaccata	tgatatctcc	ttcttctagc	gggtctgcca	catttgctga	aaagtaccag	780
ttgcaagggt	tggtgttggg	gcttcataac	cagggtgggc	aaaagggatg	aatccctggt	840
tggtgtgggg	ctcctgaaaa	gtactcatag	actctattgt	ggagtgttga	ggctgataag	900
tgaatggggg	aaagccctga	aaagggtggc	ttcagggtct	tcctgatgg	tttgggtgcg	960
caggggcatg	acatgatcga	agatatgagt	aacacacctg	cgccttatac	cccgacgctt	1020
gcggggcaag	cgggtgcctt	atatcccacg	tttaccgctc	gacctgcagc	aatggcaaca	1080
acgttgcgca	aactattaac	tggcgaacta	cttactctag	cttcccgcca	acaattaata	1140
gactggatgg	agggcgataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tcgggctggc	1200
tggtttattg	ctgataaatc	tgagaccggg	gagcgtgggt	ctcgcgggat	cattgcagca	1260
ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatc	gtagtatatc	acacgacggg	gagtcaggca	1320
actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggt	cctcactgat	taagcattgg	1380
taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	attttaaact	tcatttttaa	1440
ttttaaaggga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacccaaat	cccttaacgt	1500
gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	ttaataagat	gatcttcttg	agatcgtttt	1560
ggctctgcgc	taatctcttg	ctctgaaaaa	gaaaaaaccc	ccttgacagg	cggtttttcg	1620
aaggttctct	gagctaccaa	ctctttgaac	cgaggtaact	ggcttggagg	agcgcagtea	1680
ccaaaacttg	tcctttcagt	ttagccttaa	ccggcgcatg	acttcaagac	taactcctct	1740
aaatcaatta	ccagtggctg	ctgccagtgg	tgcttttgca	tgtctttccg	ggttggactc	1800
aagacgatag	ttaccgggata	aggcgcagcg	gtcggactga	acgggggggt	cgtgcataca	1860
gtccagcttg	gagcgaactg	cctacccgga	actgagtgtc	aggcgtggaa	tgagacaaac	1920
gcggccataa	cagcggaaat	acaccggtaa	accgaaaggc	aggaacagga	gagcgcacga	1980
gggagccgcc	agggggaaac	gcctggtatc	tttatagtcc	tgctgggttt	cggccaccat	2040
gatttgagcg	tcagatttcg	tgatgcttgt	cagggggggc	gagcctatgg	aaaaacggct	2100
ttgccgcggc	cctctcaact	ccctgttaag	tatcttcctg	gcattctcca	ggaaatctcc	2160
gccccgttcg	taagccattt	ccgctcgccg	cagtcgaacg	accgagcgta	gcgagtcagt	2220
gagcgaggaa	gcggaatata	tcctgtatca	catattctgc	tgacgcaccg	gtgcagcctt	2280

ES 2 758 096 T3

ttttctctcg	ccacatgaag	cacttcaactg	acaccctcat	cagtgccaac	atagtaagcc	2340
agtatacaact	ccgctagcgc	tgaggtctgc	ctcgtgaaga	aggtgttgct	gactcatacc	2400
aggcctgaat	cgcccatca	tccagccaga	aagtgaggga	gccacggttg	atgagagctt	2460
tgttgtaggt	ggaccagttg	gtgattttga	acttttgcct	tgccacggaa	cggtctgcgt	2520
tgtcgggaag	atgcgtgac	tgatccttca	actcagcaaa	agttcgattt	attcaacaaa	2580
gccacgttgt	gtctcaaaat	ctctgatgtt	acattgcaca	agataaaaaat	atatcatcat	2640
gaacaataaa	actgtctgct	tacataaaca	gtaatacaag	gggtgttatg	agccatattc	2700
aacgggaaac	gtcttgctcg	aggccgcgat	taaattccaa	catggatgct	gattttatatg	2760
ggtataaatg	ggctcgcgat	aatgtcgggc	aatcaggtgc	gacaatctat	cgattgtatg	2820
ggaagcccg	tgcgccagag	ttgtttctga	aacatggcaa	aggtagcggt	gccaatgatg	2880
ttacagatga	gatggtcaga	ctaaactggc	tgacggaatt	tatgcctctt	ccgaccatca	2940
agcattttat	ccgtactcct	gatgatgcat	ggttactcac	cactgcgac	cccgggaaaa	3000
cagcattcca	ggtattagaa	gaatctcctg	attcaggtga	aaatattgtt	gatgcgctgg	3060
cagtgttctt	gcgcgggttg	cattcgattc	ctgtttgtaa	ttgtcctttt	aacagcgatc	3120
gcgtatttctg	tctcgtcag	gcgcaatcac	gaatgaataa	cggtttgggt	gatgcgagtg	3180
atttttagta	cgagcgtaat	ggctggcctg	ttgaacaagt	ctggaaaaga	atgcataagc	3240
ttttgccatt	ctcacgggat	tcagtcgtca	ctcatggtga	tttctcactt	gataacctta	3300
tttttgacga	ggggaaatta	ataggttgta	ttgatgttgg	acgagtcgga	atcgcagacc	3360
gataccagga	tcttgccatc	ctatggaact	gcctcggtga	gttttctcct	tcattacaga	3420
aacggctttt	tcaaaaatat	ggtattgata	atcctgatat	gaataaattg	cagtttcatt	3480
ttgatgctga	tgagtttttc	taatcagaat	tggttaattg	gttgtaacac	tggcagagca	3540
ttacgctgac	ttgacgggac	ggcggtttg	ttgaataaat	cgaacttttg	ctgagttgaa	3600
ggatcagatc	acgcatcttc	ccgacaacgc	agaccgttcc	gtggcaaagc	aaaagttaa	3660
aatcaccaac	tggtccacct	acaacaaagc	tctcatcaac	cgtggctccc	tcactttctg	3720
gctggatgat	ggggcgattc	aggcctggta	tgagtcagca	acaccttctt	cacgaggcag	3780
acctcagcgc	tcaaagatgc	aggggtaaaa	gctaaccgca	tctttaccga	caaggcatcc	3840
ggcagttcaa	cagatcgga	aggcctggat	ttgctgagga	tgaaggtgga	ggaaggtgat	3900
gtcattcttg	tgaagaagct	cgaccgtctt	ggccgcgaca	ccgcgcgacat	gatccaactg	3960
ataaaagagt	ttgatgctca	gggtgtagcg	gttcggttta	ttgacgacgg	gatcagtacc	4020
gacggtgata	tggggcaaat	ggtggtcacc	atcctgtcgg	ctgtggcaca	ggctgaacgc	4080
cggaggatca	agtgcgtcaa	gccaagcgca	accagcgcca	ccgcgcgcgag	caacgtcgca	4140
agggcgatca	ggggacgatt	tttgcgaaga	atttccacgg	taagaatcca	atctctcgaa	4200
tttagggtga	aagaagcttg	gcataggggt	gtgcacgaac	tcggtggagg	aaatttccgc	4260
ggggcaaggc	ttcgcgaagc	ggagtgcgg	cagtggtctt	gaagatcttt	gggagcagtc	4320
cttgtgcgct	tacgaggtga	gcccgtgggg	aaccgttatt	tgcttatggt	gtgagccccc	4380
ctagagagct	tcaagagcaa	tcagcccagc	ctagaaagga	ggccaagaga	gagaccoccta	4440
cggggggaaac	cgttttctgc	ctacgagatg	gcacatttac	tgggaagctt	tacggcgctc	4500
tcgtggaaagt	tcaatgccc	cagacttaag	tgctctattc	acggtctgac	gtgacacgct	4560
aaattcagac	atagcttcat	tgattgtcgg	ccacgagcca	gtctctccct	caacagtcac	4620
aaaccaacct	gcaatggtca	agcgatttcc	tttagctttc	ctagcttgtc	gttgactgga	4680
cttagctagt	ttttctcgct	gtgctcgggc	gtactcaactg	tttgggtctt	tccagcgctc	4740
tgcggccttt	ttaccgccac	gtcttcccat	agtggccaga	gcttttccgc	ctcggtctgt	4800
ctgcgtctct	gtctgacgag	cagggacgac	tggtggcct	ttagcgacgt	agccgcgcac	4860
acgtcgcgcc	atcgtctggc	ggtcacgcat	cggcgccaga	tcaggctcac	ggcgcgtctgc	4920
tccgaccgcc	tgagcgacgg	tgtaggcacg	ctcgtaggcg	tcgatgatct	tggtgtcttt	4980
taggcgctca	ccagcgcgtt	ttaactggtg	tcccacagtc	aaagcgtggc	gaaaagcgt	5040
ctcatcacgg	gcggcacgcc	ctggagcagt	ccagaggaca	cggacgcct	cgatcagctc	5100
tccagacgct	tcagcggcgc	tcggcagct	tgcttcaagc	gtggcaagtg	cttttgcttc	5160
cgcagtggt	tttcttgccg	cttcgatagc	tgcccgctcg	ctagaaaact	cctgctcata	5220
gcgtttttta	ggtttttctg	tgctgagat	catgcgagca	acctccataa	gatcagctag	5280
gcgatccacg	cgattgtgct	gggcatgcca	gcggtacgcg	gtgggatcgt	cggagacgtg	5340
cagtggccac	cggctcagcc	tatgtgaaaa	agcctggtca	gcgccgaaaa	cgcgggtcat	5400
ttcctcggtc	ggtgcagcca	gcaggcgcat	attcgggctg	ctcatgcctg	ctgcggcata	5460
caccggatca	atgagccaga	tgagctggca	tttcccgtc	agtggattca	cgccgatcca	5520

ES 2 758 096 T3

agctggcgct	ttttccaggc	gtgccagcg	ctccaaaatc	gcgtagacct	cggggtttac	5580
gtgctcgatt	ttcccgcgg	cctgggtggt	cggcacatca	atgtccagga	caagcacggc	5640
tgcgtgctgc	gcgtgctgca	gagcaacata	ctggcacogg	gcaagcgatt	ttgaaccaac	5700
tcgggtataac	ttcggctgtg	tttctcccg	gtccgggtct	ttgatccaag	cgctggcgaa	5760
gtcgcgggtc	ttgtgccc	ggaaattttc	tctgcccagg	tgagcgagga	attcgcggcg	5820
gtcttcgctc	gtccagccac	gtgatcgca	cgcgagctcg	ggatgggtgt	cgaacagatc	5880
agcggaaaat	ttccaggccg	gtgtgtcaat	gtctcgtgaa	tccgctagag	tcatttttga	5940
gcgctttctc	ccagggttgg	actgggggtt	agccgacgcc	ctgtgagtta	ccgctcacgg	6000
ggcgttcaac	atttttcagg	tattcgtgca	gcttatcgct	tcttgccgcc	tgtgcgcttt	6060
ttcgacgcgc	gacgctgctg	ccgattcggt	gcaggtggtg	gcggcgctga	cacgtcctgg	6120
gcggccacgg	ccacacgaaa	cgcggcattt	acgatgtttg	tcatgcctgc	gggcaccgcg	6180
ccacgatcgc	ggataattct	cgtgcccgt	tccagctctg	tgacgacccat	ggccaaaatt	6240
tcgctcgggg	gacgcacttc	cagcgccatt	tgcgacctag	ccgcctccag	ctcctcggcg	6300
tggcgtttgt	tggcgcgctc	gcggctggct	gcggcacgac	acgcatctga	gcaatatttt	6360
gcgcgcgctc	ctcgcgggtc	aggccgggga	ggaatcaggc	caccgcagta	ggcgcaactg	6420
attcgatcct	ccactactgt	gcgtcctcct	ggcgctgcgc	agcacgcagc	tcgtcagcca	6480
gctcctcaag	atccgccacg	agagtttcta	ggctcgtcgc	ggcactggcc	cagtcctcgtg	6540
atgctggcgc	gtccgtcgta	tcgagagctc	ggaaaaatcc	gatcaccggt	tttaaatcga	6600
cggcagcacc	gagcgcgtcg	gactccagcg	cgacatcaga	gagatccata	gctgatgatt	6660
cgggcccaatt	ttggtacttc	gtcgtgaagg	tcatgacacc	attataacga	acgttcgtta	6720
aagttttttg	cggaaaatca	cgcggcacga	aaattttcac	gaagcgggac	tttgccgagc	6780
tcagggtgtc	taaaaatttt	gtatcgcact	tgatttttcc	gaaagacaga	ttatctgcaa	6840
acggtgtgtc	gtattttctg	cttggttttt	aaaaaatctg	gaatcgaaaa	tttgccggggc	6900
gaccgagaag	ttttttacaa	aaggcaaaaa	ctttttcggg	atcgacagaa	ataaaacgat	6960
cgacggtaac	caacaaaaaa	gcgtcaggat	cgcgctagag	cgattgaaga	ccgtcaacca	7020
aaggggaagc	ctccaatcga	cgcgacgcgc	gctctacggc	gatcctgacg	cagattttta	7080
gctatctgtc	gcagcgccct	cagggacaag	ccaccgcac	aacgtcgcga	gggcgatcag	7140
cgacgcgcga	ggg					7153

SEQ ID No. 36

ggatccttat	tacttgtaca	gctcgtccat	gccgagagtg	atcccgccgg	cggtcacgaa	60
ctccagcagg	accatgtgat	cgcgcttctc	ggttgggtct	ttgctcagg	cggactggta	120
gctcaggtag	tggttgtcgg	gcagcagcac	ggggccgctc	ccgatggggg	tgttctgctg	180
gtagtgtcgc	gcgagctgca	cgtgcccgc	ctcgatgttg	tggcggatct	tgaagttcac	240
cttgatgcgc	ttcttctgct	tgctggccat	gatatagacg	ttgtggctgt	tgtagtgtta	300
ctccagcttg	tgccccagga	tgttgccgtc	ctccttgaag	ttgatgccct	tcagctcgat	360
gcggttcacc	aggggtgtgc	cctcgaaact	cacctcggcg	cgggtcttgt	agttgccgtc	420
gtccttgaag	aagatgggtc	gctcctggac	gtagccttcg	ggcatggcgg	acttgaagaa	480
gtcgtgctgc	ttcatgtggt	cggggtagcg	ggcgaagcac	tgcaggccgt	agccgaaggt	540
ggtcacgagg	gtgggccagg	gcacgggcag	cttgccgggt	gtgcagatga	acttcagggt	600
cagcttgccg	taggtggcat	cgcctcgcgc	ctgcgggac	acgctgaact	tgtggccgtt	660
taogtcgccc	tcagctcgca	ccaggatggg	caccaccccg	gtgaacagct	cctcgccctt	720
gctcaccata	tgatatctcc	ttcttctaac	cagcgacgcc	gccgatccat	ttgtcgggtg	780
tgtctcgggc	gagtcgtcga	gattgtgctg	ggaaagtcat	cgggatcaag	ctcctttatg	840
gctgattgag	tttttctttc	ttcttcaatc	atcgccaata	agaacctaga	gcacatcggg	900
gatttccctc	ctcctaacc	ctaaaaacc	ctgagaaaac	gtcccaagta	aaccttaca	960
gctcgtcgac	ctgcagcaat	ggcaacaacg	ttgcgcgaac	tattaactgg	cgaactactt	1020
actctagctt	cccggaaca	attaatagac	tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	1080
cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	1140
cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcaact	gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	1200
gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgtcgag	1260
ataggtgcct	cactgattaa	gcatttgtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	1320
tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	1380

ES 2 758 096 T3

aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccacctta	1440
ataagatgat	cttcttgaga	tcgttttggg	ctgcgcgtaa	tctcttgctc	tgaaaacgaa	1500
aaaaccgcct	tgcaaggcgg	tttttcgaag	gttctctgag	ctaccaactc	tttgaaccga	1560
ggtaactggc	ttggaggagc	gcagtcacca	aaacttgtec	tttcagttta	gccttaaccg	1620
gcgcgatgact	tcaagactaa	ctcctctaaa	tcaattacca	gtggctgctg	ccagtgggtc	1680
ttttgcatgt	ctttccgggt	tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgcagcggtc	1740
ggactgaacg	gggggttcgt	gcatacagtc	cagcttggag	cgaactgcct	acccggaact	1800
gagtgtcagg	cgtggaatga	gacaaacgcg	gccataacag	cggaaatgaca	ccggtaaac	1860
gaaaggcagg	aacaggagag	cgcacgaggg	agccgccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1920
atagtcctgt	cgggtttcgc	caccactgat	ttgagcgtca	gatttcgtga	tgcttgctag	1980
gggggcggag	cctatggaaa	aacggccttg	ccgcggccct	ctcacttccc	tgtaaagtat	2040
cttcttgcca	tcttccagga	aatctccgcc	ccgttcgtaa	gccatttccg	ctcgccgcag	2100
tcgaacgacc	gagcgtagcg	agtcagttag	cgaggaaagc	gaatataatc	tgtatcacat	2160
attctgtctga	cgcacccgtg	cagccttttt	tctcttgcca	catgaagcac	ttcactgaca	2220
ccctcatcag	tgccaacata	gtaagccagt	atacactccg	ctagcgtcga	ggctcgctc	2280
gtgaagaagg	tgttgctgac	tcataccagg	cctgaatcgc	cccatcatcc	agccagaaag	2340
tgaggggagcc	acggttgatg	agagctttgt	tgtaggtgga	ccagttgggt	atthttgaact	2400
tttgctttgc	cacggaacgg	tctgcgttgt	cgggaagatg	cgtgatctga	tccttcaact	2460
cagcaaaagt	tcgattttatt	caacaaagcc	acgttgtgtc	tcaaaatctc	tgatgttaca	2520
ttgcacaaga	taaaaatata	tcacatgaa	caataaaact	gtctgcttac	ataaacagta	2580
ataagagggg	tgttatgagc	catattcaac	gggaaacgtc	ttgctcgagg	ccgcgattaa	2640
attccaacat	ggatgctgat	ttatatgggt	ataaatgggc	tcgcgataat	gtcgggcaat	2700
caggtgagac	aatctatcga	ttgtatggga	agcccgatgc	gccagagttg	tttctgaaac	2760
atggcaagg	tagcgttgcc	aatgatgtta	cagatgagat	ggtcagacta	aactggctga	2820
cggaaatttat	gcctcttccg	accatcaagc	atthttatccg	tactcctgat	gatgcattgg	2880
tactcaccac	tgcatcctcc	gggaaaacag	cattccagggt	attagaagaa	tatcctgatt	2940
caggtgaaaa	tattgttgat	gcgctggcag	tgthctctgc	ccggttgcat	tcgattcctg	3000
tttgtaattg	tccttttaac	agcgatcgcg	tatttcgtct	cgctcaggcg	caatcacgaa	3060
tgaataacgg	tttggttgat	gcgagtgatt	ttgatgacga	gcgtaatggc	tggcctgttg	3120
aacaagctcg	gaaagaaatg	cataagcttt	tgccattctc	accggattca	gtcgtcactc	3180
atgggtgattt	ctcacttgat	aaccttattt	ttgacgaggg	gaaattaata	gggtgtattg	3240
atgthtgacg	agtcggaatc	gcagaccgat	accaggatct	tgccatccta	tggaactgcc	3300
tcggtgagtt	ttctccttca	ttacagaaac	ggctttttca	aaaatatggt	attgataatc	3360
ctgatatgaa	taaattgcag	tttcatttga	tgctcgatga	gtttttctaa	tcagaattgg	3420
ttaattgggt	gtaaacactgg	cagagcatta	cgctgacttg	acgggacggc	ggctttgttg	3480
aataaatcga	acttttgctg	agttgaagga	tcagatcacg	catcttcccg	acaacgcaga	3540
ccgttcogtg	gcaaagcaaa	agttcaaaat	caccaactgg	tcacactaca	acaaagctct	3600
catcaaccgt	ggctccctca	ctthctggct	ggatgatggg	gcgattcagg	cctgggtatga	3660
gtcagcaaca	ccttcttcac	gaggcagacc	tcagcgtca	aagatgcagg	ggtaaaagct	3720
aaccgcatct	ttaccgacaa	ggcatccggc	agttcaacag	atcggaagg	gctggatttg	3780
ctgaggatga	aggtggagga	aggtgatgtc	attctggtga	agaagctcga	ccgtcttgge	3840
cgcgacaccg	ccgacatgat	ccaactgata	aaagagtttg	atgctcaggg	tgtagcgggt	3900
cggthttattg	acgacgggat	cagtaccgac	ggtgatatgg	ggcaaatggt	ggtcaccatc	3960
ctgtcggctg	tggcacaggc	tgaacgcggg	aggatcaagt	cggtaagcc	aagcgcaacc	4020
agcggcaccg	ccgcgagcaa	cgtcgcaagg	gcgatcaggg	gacgattttt	gcgaagaatt	4080
tcacgcgtaa	gaatccaatc	tctcgaattt	aggtgaaaag	aagcttgcca	taggggtgtg	4140
cacgaactcg	gtggaggaaa	tttccgcggg	gcaaggtctc	gcgaagcgga	gtcgcggcag	4200
tggtctttgaa	gatctttggg	agcagtcctt	gtgcgcttac	gaggtgagcc	gggtgggaac	4260
cgttatctgc	ctatggtgtg	agcccccta	gagagcttca	agagcaatca	gcccgccta	4320
gaaaggaggc	caagagagag	acccctacgg	ggggaaccgt	tttctgccta	cgagatggca	4380
catttactgg	gaagctttac	ggcgtcctcg	tggaagtcca	atgcccgag	acttaagtgc	4440
tctattcacg	gtctgacgtg	acacgctaaa	ttcagacata	gcttcattga	ttgtcggcca	4500
cgaagccagtc	tctccctcaa	cagtcataaa	ccaacctgca	atggtcaagc	gatttccttt	4560
agctthtcta	gcttgctggt	gactggactt	agctaagttt	tctcgtgtg	ctcgggcgta	4620

ES 2 758 096 T3

ctcactgttt	gggtctttcc	agcgttctgc	ggccttttta	ccgccacgtc	ttcccatagt	4680
ggccagagct	tttcgcoctc	ggctgtctctg	cgtctctgtc	tgacgagcag	ggacgactgg	4740
ctggccttta	gcgacgtagc	cgcgcacacg	tcgcgccatc	gtctggcgggt	cacgcacgtg	4800
cggcagatca	ggctcaacggc	cgtctgtctcc	gaccgcctga	gcgacgggtgt	aggcacgctc	4860
gtaggcgctcg	atgatcttgg	tgtcttttag	gcgctcacca	gccgctttta	actggtatcc	4920
cacagtcaaa	gcgtggcgaa	aagccgtctc	atcacgggcg	gcacgccttg	gagcagttcca	4980
gaggacacgg	acgccgtcga	tcagctctcc	agacgcttca	gcggcgctcg	gcaggcttgc	5040
ttcaagcgtg	gcaagtgtct	ttgcttccgc	agtggctttt	cttgccgctt	cgatacgtgc	5100
ccgtccgcta	gaaaactcct	gctcatagcg	ttttttaggt	ttttctgtgc	ctgagatcat	5160
gcgagcaacc	tcataagat	cagctaggcg	atccacgcga	ttgtgctggg	catgccagcg	5220
gtacgcggtg	ggatcgtcgg	agacgtgcag	tggccaccgg	ctcagcctat	gtgaaaaagc	5280
ctggctcagcg	ccgaaaacgc	gggtcatttc	ctcggtcgtt	gcagccagca	ggcgcatatt	5340
cgggctgtctc	atgcctgtctg	cggcatacac	cggatcaatg	agccagatga	gctggcattt	5400
cccgtctcagt	ggattcacgc	cgatccaagc	tggcgctttt	tcaggcgctg	cccagcgctc	5460
caaaatcgcg	tagacctcgg	ggtttacgtg	ctcgattttc	ccgcggcct	ggtggctcgg	5520
cacatcaatg	tcagggacaa	gcacggctgc	gtgctgcgcg	tgctcagag	caacatactg	5580
gcaccgggca	agcgattttg	aaccaactcg	gtataacttc	ggctgtgttt	ctcccggtgc	5640
cgggctctttg	atccaagcgc	tggcgaagtc	gcgggtcttg	ctgccctgga	aattttctct	5700
gcccaggtga	gcgaggaatt	cgcgcggtc	ttcgctcgtc	cagccacgtg	atcgacgcgc	5760
gagctcggga	tgggtgtcga	acagatcagc	ggaaaatttc	caggccggtg	tgtcaatgtc	5820
togtgaatcc	gctagagtca	tttttgagcg	ctttctccca	ggtttggact	gggggttagc	5880
cgacgccctg	tgagttaccg	ctcacggggc	gttcaacatt	tttcaggtat	tcgtgcagct	5940
tatcgcttct	tgcgcctgt	gcgctttttc	gacgcgcgac	gctgctgccg	attcggtgca	6000
ggtggtggtg	gcgctgacac	gtcctgggcg	gccacggcca	cacgaaacgc	ggcatttaacg	6060
atgtttgtca	tgcttgcggg	cacgcgcgca	cgatcgcgga	taattctcgc	tgccgcttcc	6120
agctctgtga	cgaccatggc	caaaatttctg	ctcgggggac	gcacttccag	cgccatttgc	6180
gacctagcgc	cctccagctc	ctcggcgttg	cgtttgttgg	cgcgctcgcg	gctggctgcg	6240
gcacgacacg	catctgagca	atattttgcg	cgccgtcctc	gcgggtcagg	ccggggagga	6300
atcaggccac	cgcagtaggc	gcaactgatt	cgatcctcca	ctactgtgcg	tcctcctggc	6360
gctgccgagc	acgcagctcg	tcagccagct	cctcaagatc	cgccacgaga	gtttcttaggt	6420
cgtctgcggc	actggcccag	tctcgtgatg	ctggcgcgctc	cgctcgtatc	agagctcgga	6480
aaaatccgat	caccgttttt	aaatcgacgg	cagcatcgag	cgcgctcgac	tcacgcgcga	6540
catcagagag	atccatagct	gatgattcgg	gccaattttg	gtacttcgtc	gtgaagggtca	6600
tgacaccatt	ataacgaacg	ttcgttaaag	tttttgcgcg	aaaatcacgc	ggcacgaaaa	6660
ttttcacgaa	gcgggacttt	gcgcagctca	ggggtgctaa	aaattttgta	tcgcacttga	6720
tttttccgaa	agacagatta	tctgcaaacg	gtgtgtcgtg	tttctggcct	ggtttttaaa	6780
aaatctggaa	tcgaaaattt	gcggggcgac	cgagaagtgt	tttacaaaag	gcaaaaactt	6840
tttcgggac	gacagaaata	aaacgatcga	cggtacgcaa	caaaaaagcg	tcaggatcgc	6900
cgtagagcga	ttgaagaccg	tcaaccaaag	gggaagcctc	caatcgacgc	gacgcgcgct	6960
ctacggcgat	cctgacgcag	attttttagct	atctgtcgca	gcgcctcag	ggacaagcca	7020
ccgcacaaac	gtcgcgaggg	cgatcagcga	cgccgcaggg			7060

SEQ ID No. 37

ccctgcggcg	tcgctgatcg	ccctgcgcac	ggtgtgcggg	tggcttgtcc	ctgagggcgc	60
tgcgacagat	agctaaaaat	ctgcgtcagg	atcgccgtag	agcgcgcgtc	gcgtcgattg	120
gaggttccc	ctttggttga	cggtcttcaa	tcgctctacg	gcgatacctga	cgcttttttg	180
ttgcgtaccg	tcgatcgttt	tatttctgtc	gatcccgaaa	aagtttttgc	cttttgtaaa	240
aaacttctcg	gtcgccccgc	aaattttcga	ttccagattt	tttaaaaacc	aagccagaaa	300
tacgacacac	cgtttgcaga	taatctgtct	ttcggaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
ttagcaccce	tgagctgcgc	aaagtcccgc	ttcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
ccgccaaaaa	cttttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	480
caaaattggc	ccgaatcatc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtccgacgcg	540
ctcgatgctg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggtttt	tccgagctct	cgatacgcag	600

ES 2 758 096 T3

gacgcgccag	catcacgaga	ctggggccagt	gccgcgagcg	acctagaaac	tctcgtggcg	660
gatcttgagg	agctggctga	cgagctgcgt	gctcggcagc	gccaggagga	cgcacagtag	720
tggaggatcg	aatcagttgc	gcctactcgc	gtggcctgat	tcctcccccg	cctgaccgcg	780
gaggacggcg	cgcaaaatat	tgctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
ccaacaaacg	ccacgccgag	gagctggagg	cggctagggtc	gcaaatggcg	ctggaagtgc	900
gtcccccgcg	cgaaattttg	gccatggctg	tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	960
tccgcgatcg	tggcgcggtg	cccgcaggca	tgacaaacat	cgtaaattgcc	gcgtttcgtg	1020
tggccgtggc	cgcccaggac	gtgtcagcgc	cgccaccacc	tgaccogaat	cggcagcagc	1080
gtcgcgcgtc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
aatgttgaac	gccccgtgag	cggtaaactca	caggggcgtcg	gctaaccccc	agtccaaacc	1200
tgggagaaaag	cgctcaaaaa	tgactctagc	ggattcacga	gacattgaca	caccggcctg	1260
gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcccagagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
gacgagcgaa	gaccgcgcgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tccagggcag	1380
caagaccgcg	gacttcgccca	gcgcttggtat	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
gaagttatac	cgagttgggt	caaaaatcgct	tgcccgcgtgc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
cgcgcagcac	cgagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	ccgagccacc	aggccggcgg	1560
gaaaatcgag	cacgtaaacc	ccgaggtcta	cgcgattttg	gagcgcgtggg	cacgcctgga	1620
aaaagcgcca	gcttggtatcg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgccagc	tcattctggct	1680
cattgatccg	gtgtatgccg	cagcaggcat	gagcagcccgc	aatatgcgcc	tgctggcgtc	1740
aacgaccgag	gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgtgaccag	gctttttcac	atagggtgag	1800
ccggttgcca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgtggcatg	cccagcaca	1860
tcgcgtggat	cgccatagctg	atcttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgctatgagc	aggagttttc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cgagcgccgc	2040
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggactgctc	cagggcgtgc	2100
cgcccgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataaccagt	taaaagcggc	2160
tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgacgcctac	gagcgtgcct	acaccgtcgc	2220
tcaggcggtc	ggagcagacg	gccgtgagcc	tgatctgcgc	ccgatgcgtg	accgccagac	2280
gatggcgcgga	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaggccag	ccagtgcgtc	ctgctcgtca	2340
gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
taaaaaggcc	gcagaacgct	ggaaagaccc	aaacagttag	tacgcccag	cacagcgaga	2460
aaaactagct	aagtccagtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaatc	gcttgaccat	2520
tgacggttgg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tggccgacaa	tcaatgaagc	2580
tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgcgggcat	2640
tgaacttcca	cgaggacgcc	gtaaagcttc	ccagttaaag	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
acggttcccc	ccgtaggggt	ctctctcttg	gcctcctttc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
tgaagctctc	tagggggggt	cacaccatag	gcagataacg	gttccccacc	ggctcacctc	2820
gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgcgcgcgc	tccgcttcgc	2880
gaagccttgc	cccgcgga	tttctctcac	cgagttcgtg	cacaccccta	tgccaagctt	2940
ctttcacccct	aaattcgaga	gattggattc	ttaccgtgga	aattcttcgc	aaaaatcgtc	3000
ccctgatcgc	ccttgcgacg	ttgctcgcgc	cgggtgcgcgt	ggttgcgctt	ggcttgaccg	3060
acttgatcct	ccggcggttca	gcctgtgcca	cagccgacag	gatggtgacc	accatttgcc	3120
ccatattcacc	gtcgggtactg	atcccgtcgt	caataaaccg	aaccgctaca	ccctgagcat	3180
caaactcttt	tatcagtttg	atcatgtcgc	cgggtgtcgc	gccaagacgg	tcgagcttct	3240
tcaccagaat	gacatcacct	tcctccacct	tcattcctcag	caaatccagc	ccttcccgat	3300
ctgttgaaact	gccggatgcc	ttgtcggtaa	agatgcgggt	agcttttacc	cctgcattct	3360
tgagcgcgtga	ggtctgcctc	gtgaagaagg	tggtgctgac	tcataaccag	cctgaatcgc	3420
cccatcatcc	agccagaaaag	tgagggagcc	acggttgatg	agagctttgt	tgtagtgga	3480
ccagttggtg	atattgaact	tttgctttgc	cacggaacgg	tctgcgttgt	cgggaagatg	3540
cgtgatctga	tccttcaact	cagcaaaagt	tcgatttatt	caacaaagcc	gccgtcccgt	3600
caagtcagcg	taatgctctg	ccagtgttac	aaccaattaa	ccaattctga	ttagaaaaac	3660
tcattcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	accatatttt	3720
tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcacoga	ggcagttcca	taggatggca	3780
agatcctggg	atcgggtctgc	gattccgact	cgtccaacat	caatacaacc	tatttaatttc	3840

ES 2 758 096 T3

ccctcgtcaa	aaataagggt	atcaagtgag	aaatcaccat	gagtgcagac	tgaatccggt	3900
gagaatggca	aaagcttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	gccattacgc	3960
tcgtcatcaa	aatcaactcgc	atcaacccaaa	ccgttattca	ttcgtgattg	cgcctgagcg	4020
agacgaaata	cgcgatcgct	gttaaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	atgcaaccgg	4080
cgcaggaaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	ttcttctaata	4140
acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtagta	accatgcac	atcaggagta	4200
cggataaaat	gcttgatggt	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	tagtctgacc	4260
atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	caactctggc	4320
gcacccggct	tcccatataa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgc	attatcgca	4380
gcccatttat	acccatataa	atcagcatcc	atggttgaat	ttaatcgcg	cctcgagcaa	4440
gacgtttccc	gttgaatatg	gctcataaca	cccttgatat	tactgtttat	gtaagcagac	4500
agttttattg	ttcatgatga	tatatTTTTA	tcttgtagca	tgtaacatca	gagattttga	4560
gacacaacgt	ggctttgttg	aataaatcga	acttttgctg	agttgaagga	tcagatcacg	4620
catcttcccg	acaacgcaga	ccgttccgtg	gcaaaagcaa	agttcaaaat	caccaactgg	4680
tccacctaca	acaaagctct	catcaaccgt	ggctccctca	ctttctggct	ggatgatggg	4740
gcgatttcagg	cctggtatga	gtcagcaaca	ccttcttcac	gaggcagacc	tcagcgtag	4800
cggagtgat	actggttac	tatggttgca	ctgatgagg	tgtagtgaa	gtgcttcacg	4860
tgccaggaga	aaaaaggctg	caccgggtcg	tcagcagaat	atgtgatata	ggatatattc	4920
cgttctcccg	ctcactgact	cgtacgcctc	ggtcgttcga	ctgcggcgag	cggaaatggc	4980
ttacgaacgg	ggcggagatt	tcctggaaga	tgccaggaa	atacttaaca	gggaagtga	5040
agggcccgcg	caaagccgtt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacaagca	tcacgaaatc	5100
tgacgctcaa	ttcagtggtg	gcgaaaccgg	acagactat	aaagatacca	ggcgtttccc	5160
cctggcggt	ccctcgtgcg	ctctcctggt	cctgccttcc	ggtttaccgg	tgctattccg	5220
ctgttatggc	cgcgtttgtc	tcattccacg	cctgacactc	agttccgggt	agggcagttc	5280
ctccaagctg	gactgtatgc	acgaaccccc	cgttcagtc	gaccgctgcg	ccttatccgg	5340
taactatcgt	cttgagtcca	accgggaaag	acatgcaaaa	gcaccactgg	cagcagccac	5400
tggtaatgta	tttagaggag	ttagtcttga	agtcatgcgc	cgtttaaggc	taaactgaaa	5460
ggacaagttt	tggtgactgc	gctcctccaa	gccagttacc	tcggttcaaa	gagttggtag	5520
ctcagagAAC	cttcgaaaaa	ccgccttgca	aggcggtttt	ttcgttttca	gagcaagaga	5580
ttacgcgcag	acccaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taaggggtct	gacgctcagt	5640
ggaaacgaaa	ctcagcttaa	gggatttttg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
agatcccttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	5760
ggctctgacg	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	5820
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	5880
catctggccc	cagtgtctga	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	5940
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaaggggcg	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	6000
cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagttagttc	ccagtttaata	6060
gtttgcgcaa	cgttggtgcc	attgctgcag	gtcgaccatg	cgccgttccc	agtggaaggc	6120
cgacaatgct	gcccttcagg	aggctcaagat	cgacggtcag	accgttcgca	tcccacgcgg	6180
tctggttaag	gcagcacagc	tcggtctcgt	ggacgtagag	cagttctaaa	ccttaaatcc	6240
atcgccctaca	accttttgta	ggtaagaatt	taacaagagc	cagttatctt	ctcttaaaat	6300
gaggaggtaa	ctggcttctt	tatgcttaag	agggttagc	ataagtgaag	tatgttccaa	6360
cgcgtggacg	tcttaattgg	gaggaagtct	gtcacggact	ggaagacgaa	aagggtatcg	6420
atgaaaattt	tagttgttga	tgacgagcaa	gctgtacgtt	aatctatcgc	gccgtcagct	6480
ccggttccat	gccgggatcg	ggattaggtc	ttgccatcgt	gaatcaggtt	gtgaatcggc	6540
atgggtggca	actcgttggt	ggtgaatcag	atgatggcgg	aacgagaatc	actattgatt	6600
tgccaggggga	acccattcgc	agcgggttcg	aaaatgtcga	tgattaaagt	accaccacta	6660
aagagctcac	aggaagtgtt	cagactactt	agagtgcgc	cccagccaca	gggttcataa	6720
tcaaatcatg	acaaatcaat	tccccacaaa	caacggtgag	aacccggacc	gtgcatcgga	6780
aactccatca	gaaaccaact	ccggtacctg	aactttaaga	aggagataatc	atatggtgag	6840
caagggcgag	gagctgttca	ccgggttggt	gcccacccct	gtcgagctgg	acggcgacgt	6900
aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	ggcgaggggc	gatgccacct	acggcaagct	6960
gaccctgaag	ttcatctgca	ccaccggcaa	gctgcccgtg	ccctggccca	ccctcgtgac	7020
caccttcggc	tacggcctgc	agtgcttcgc	ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	7080
cttcttcaag	tcggccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcaaggga	7140
cgcggaac	tacaagaccc	gcgcccaggt	gaagtccgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	7200
catcgagctg	aagggcacat	acttcaaggga	ggacggcaac	atcctggggc	acaagctgga	7260
gtacaactac	aacagccaca	acgtctatat	catggccgac	aagcagaaga	acggcatcaa	7320
ggtgaacttc	aagatccgcc	acaacatcga	ggcggcagc	gtgcagctcg	ccgaccacta	7380
ccagcagaac	accccatcgc	gcgacggccc	cgtgctgctg	cccgaacaac	actacctgag	7440
ctaccagctc	gcctgagca	aagaccccaa	cgagaagcgc	gatcacatgg	tcctgctgga	7500
gttcgtgacc	gccgcccggga	tcactctcgg	catggacgag	ctgtacaagt	aataaggatc	7560
c						7561

ES 2 758 096 T3

SEQ ID No. 38

ccctgcggcg	tcgctgatcg	ccctcgcgac	ggtgtgcggg	tggtttgtcc	ctgagggcgc	60
tgcgacagat	agctaaaaat	ctgcgtcagg	atgcgcgtag	agcgcgcgtc	gcgtcgattg	120
gaggcttccc	ctttgggttga	cggtcttcaa	tcgctctacg	gcgatcctga	cgcttttttg	180
ttgcgtaccg	tcgatcgttt	tatttctgtc	gatcccga	aaagttttgc	cttttgtaaa	240
aaactttctcg	gtcgccccgc	aaatttttga	ttccagattt	tttaaaaacc	aagccagaaa	300
tacgacacac	cgtttgcaga	taatctgtct	ttcggaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
ttagcacccc	tgagctgcgc	aaagtcccgc	ttcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
ccgccaaaaa	ctttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgaccttcac	gacgaagtac	480
caaaattggc	ccgaatcatc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtccgacgcg	540
ctcgatgctg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcggatttt	tccgagctct	cgatacgacg	600
gacgcgccag	catcacgaga	ctgggccagt	gccgcgagcg	acctagaaac	tctcgtggcg	660
gatcttgagg	agctggttga	cgagctgcgt	gctcggcagc	gccaggagga	cgcacagtag	720
tgagggatcg	aatcagttgc	gcctactgcg	gtggcctgat	tcctcccgcg	cctgaccgcg	780
gaggacggcg	cgcaaaatat	tgctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
ccaacaaacg	ccacgcgag	gagctggagg	cggctagggtc	gcaaattggcg	ctggaagtgc	900
gtcccccgag	cgaaattttg	gccatggtcg	tcacagagct	ggaagcggca	gcgagaatta	960
tccgcgatcg	tgccgcggtg	cccgcaggca	tgacaacat	cgtaaatgcc	gcgtttcgtg	1020
tgcccggtgc	cgcccaggac	gtgtcagcgc	cgccaccacc	tgaccggaat	cggcagcagc	1080
gtcgcgcgtc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
aatgtttgaac	gccccgtgag	cggtaaactca	cagggcgctcg	gctaaccctcc	agtccaaacc	1200
tgggagaaaag	cgctcaaaaa	tgactctagc	ggattcacga	gacattgaca	caccgcgctg	1260
gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcccagagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
gacgagcgaa	gaccgcgcgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tccagggcag	1380
caagaccgcg	gacttcgcca	gcgcttggtg	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
gaagtattac	cgagttggtt	caaaatcgct	tgcccgtgtc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
cgcgcgacac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	ccgagccacc	aggccggcgg	1560
gaaaatcgag	cacgtaaacc	ccgaggtcta	cgcgattttg	gagcgcgtgg	cacgcctgga	1620
aaaagcgcca	gcttggtatcg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgccagc	tcactctggt	1680
cattgatccg	gtgtatgccg	cagcaggcat	gagcagcccg	aatatgcgcc	tgctggctgc	1740
aacgaccgag	gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgcgtgaccg	gctttttcac	ataggctgag	1800
ccggtggcca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgctggcatg	cccagcacia	1860
tcgcgtggat	cgcttagctg	atcttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgctatgagc	aggagttttc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cgagcgcgcg	2040
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggaactgctc	cagggcgtgc	2100
cgcgcgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160
tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgacgcctac	gagcgtgcct	acaccgtcgc	2220
tcaggcggtc	ggagcagacg	gccgtgagcc	tgatctgcgc	ccgatgcgtg	accgccagac	2280
gatggcgcga	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaggccag	ccagtcgtcc	ctgctcgtca	2340
gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
taaaagggcc	gcagaaacgt	ggaaagaccc	aaacagttag	tacgcccag	cacagcgaga	2460
aaaactagct	aagtccagtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaatc	gcttgaccat	2520

ES 2 758 096 T3

tgcaggttg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tgcccgacaa	tcaatgaagc	2580
tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgcgggcat	2640
tgaacttcca	cgaggacgcc	gtaaagcttc	ccagtaaatg	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
acggttcccc	ccgtaggggt	ctctctcttg	gcctcctttc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
tgaagctctc	taggggggct	cacaccatag	gcagataacg	gttccccacc	ggctcacctc	2820
gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgccgcgac	tccgcttcgc	2880
gaagccttgc	cccgcggaag	tttctctcac	cgagttcgtg	cacaccccta	tgccaagctt	2940
ctttcacctc	aaattcgaga	gattggattc	ttaccgtgga	aattcttcgc	aaaaatcgtc	3000
ccctgatcgc	ccttgcgacg	ttgctcgcgg	cgggtgccgt	ggttgcgctt	ggcttgaccg	3060
acttgatcct	ccggcggttca	gcctgtgcca	cagccgacag	gatgggtgacc	accatttgcc	3120
ccatatcacc	gtcgggtactg	atcccgctcg	caataaaccg	aaccgctaca	ccctgagcat	3180
caaactcttt	tatcagtttg	atcatgtcgg	cgggtgtcgg	gccaaagacg	tcgagcttct	3240
tcaccagaat	gacatcacct	tcctccacct	tcctcctcag	caaatccagc	ccttcccgat	3300
ctggttgaact	gccggtatgcc	ttgtcggtaa	agatgcgggt	agctttttacc	cctgcatctt	3360
tgagcgctga	ggtctgcctc	gtgaagaagg	tggttgcgtg	tcataaccag	cctgaatcgc	3420
cccatcctcc	agccagaaag	tgagggagcc	acggttgatg	agagctttgt	tgtagtgga	3480
ccagttgggtg	atattgaact	tttgctttgc	cacggaacgg	tctgcgttgt	cggaagatg	3540
cgtgatctga	tccttcaact	cagcaaaaagt	tcgatttatt	caacaaagcc	gccgtcccgt	3600
caagtcagcg	taatgctctg	ccagtgttac	aaccaattaa	ccaattctga	ttagaaaaac	3660
tcacgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	accatatttt	3720
tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca	taggatggca	3780
agatcctggt	atcggctctgc	gattccgact	cgtccaacat	caatacaacc	tattaatttc	3840
ccctcgtcaa	aaataagggt	atcaagttag	aatcaccat	gagtgcgac	tgaatccggt	3900
gagaatggca	aaagcttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	gccattacgc	3960
tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaaccaa	ccgttattca	ttcgtgattg	cgccgtgagc	4020
agacgaaata	cgcatcgct	gttaaaaagg	caattacaaa	caggaatcga	atgcaaccgg	4080
cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	ttcttcta	4140
acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcatc	atcaggagta	4200
cggataaaat	gcttgatggt	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	tagtctgacc	4260
atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	caactctggc	4320
gcacgggct	tcacatacaa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccagc	attatcgcca	4380
gcccatttat	acccatataa	atcagcatcc	atgttggaat	ttaatcgcg	cctcgagcaa	4440
gacgtttccc	gttgaatatg	gtcataaaca	ccccttgat	tactgtttat	gtaagcagac	4500
agtttttatg	ttcatgatga	tatattttta	tcttggtcaa	tgtaacatca	gagattttga	4560
gacacaacgt	ggctttgttg	aataaatcga	acttttgctg	agttgaagga	tcagatcacg	4620
catcttcccg	acaaacgcaga	ccgttccgtg	gcaaaagcaa	agttcaaaat	caccaactgg	4680
tcacactaca	acaaagctct	catcaaccgt	ggctccctca	ctttctggct	ggatgatggg	4740
gcgattcagg	cctggtatga	gtcagcaaca	ccttcttcac	gaggaagacc	tcagcgctag	4800
cggagtgtat	actggcttac	tatgttgga	ctgatgaggg	tgtagtgaa	gtgcttcatg	4860
tgccagagga	aaaaaggtcg	caccggtcg	tcagcagaat	atgtgatata	ggatatattc	4920
cgttctcctg	ctcactgact	cgtacgctc	ggctgttcga	ctgcggcgag	cggaatggc	4980
ttacgaacgg	ggcgagagatt	tcctggaaga	tgccaggaag	atacttaaca	gggaagttag	5040
agggcccgcg	caaagccggt	ttccataggg	ctccgcccc	ctgacaagca	tcacgaaatc	5100
tgacgctcaa	atcagtggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	5160
cctggcggtc	ccctcgtgcg	ctctcctgtt	cctgcctttc	ggtttaccgg	tgctattccg	5220
ctgttatggc	cgcgtttgtc	tcattccacg	cctgacactc	agttccgggt	aggcagttcg	5280
ctccaagctg	gactgtatgc	acgaaccccc	cgttcagtec	gaccgctgcg	ccttatcccg	5340
taactatcgt	cttgagtcca	acccggaag	acatgcacaa	gcaccactgg	cagcagccac	5400
tggttaattga	tttagaggag	ttagtcttga	agtcatgcgc	cggtaagggc	taactgaaa	5460
ggacaagttt	tggtgactgc	gctcctccaa	gccagttacc	tcggttcaaa	gagttggttag	5520
ctcagagaa	cttcgaaaaa	cgcctcgtga	aggcgttttt	ttcgttttca	gagcaagaga	5580
ttacgcgcag	acaaaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taaggggtct	gacgctcagt	5640
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcattgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaaact	5760

ES 2 758 096 T3

ggctctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	5820
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	5880
catctggccc	cagtgcctgca	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	5940
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	6000
cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	6060
gtttgcgcaa	cgttggtgcc	attgctgcag	gtcgacaatt	taacaagagc	cagttatctt	6120
ctcttaaaat	gaggaggtaa	ctggcttctt	tatgcttaag	aggtgttagc	ataagtgaag	6180
tatgtttcaa	cgcgtggacg	tcttaattgg	gaggaagtct	gtcacggact	ggaagacgaa	6240
aagggatctg	atgtgaaccc	attcgcagcg	ggttcgaaaa	tgctgatgat	taaggtacca	6300
ccactaaaga	gctcacagga	agtgttcaga	ctacttagag	tgacgcccc	gccacagggt	6360
tcataatcaa	atcatgggtga	gcaagggcga	ggagctgttc	accgggggtg	tgcccatcct	6420
ggctgagctg	gacggcgacg	taaacggcca	caagttcagc	gtgtccggcg	agggcgaggg	6480
cgatgccacc	tacggcaagc	tgacctgaa	gttcatctgc	accaccggca	agctgcccgt	6540
gccctggccc	accctcgtga	ccaccttcgg	ctacggcctg	cagtgttctg	cccgtatccc	6600
cgaccacatg	aagcagcacg	acttcttcaa	gtccgccatg	cccgaaggct	acgtccagga	6660
gcgcaccatc	ttcttcaagg	acgaagcga	ctacaagacc	cgcgcgagg	tgaagttcga	6720
ggcgacaccc	ctggtgaacc	gcacgcagct	gaagggcatc	aacttcaagg	aggacgcaa	6780
catcctgggg	cacaagctgg	agtacaacta	caacagccac	aacgtctata	tcatggccga	6840
caagcagaag	aacggcatca	aggtgaactt	caagatccgc	cacaacatcg	agggcgagcg	6900
cgtgcagctc	gccgaccact	accagcagaa	cacccccatc	ggcgacggcc	ccgtgtgtgt	6960
gcccagacaac	cactacctga	gctaccagtc	cgcctcgagc	aaagacccca	acgagaagcg	7020
cgatcacatg	gtcctgctgg	agttcgtgac	cgcgcggggg	atcaactctcg	gcatggacga	7080
gctgtacaag	taataaggat	cc				7102

SEQ ID NO. 39

ccctgcggcg	tcgctgatcg	ccctgcgcac	ggtgtgcggg	tggtttgtcc	ctgagggcgc	60
tgcgacagat	agctaaaaat	ctgcgtcagg	atcgccgtag	agcgcgcgct	gcgtcgattg	120
gaggtctccc	ctttggttga	cggctcttcaa	tcgctctacg	gcgacccctga	cgcttttttg	180
ttgcgtaccg	tcgatcgttt	tatttctgtc	gatcccgaaa	aagttttttg	cttttgtaaa	240
aaactttctg	gtcgcccgcg	aaatttttoga	ttccagattt	tttaaaaacc	aagccagaaa	300
tacgacacac	cgtttgcaga	taatctgtct	ttcggaaaaa	tcaagtgcga	tacaaaattt	360
ttagcaccoc	tgagctgcgc	aaagtcccg	ttcgtgaaaa	ttttcgtgcc	gcgtgatttt	420
ccgccaaaaa	ctttaacgaa	cgttcgttat	aatggtgtca	tgacottcac	gacgaagtac	480
caaaattggc	ccgaatcatc	agctatggat	ctctctgatg	tcgcgctgga	gtccgacgcg	540
ctcgatgctg	ccgtcgattt	aaaaacggtg	atcgattttt	tcgagctct	cgatacgacg	600
gacgcgccag	catcacgaga	ctgggccagt	gccgcgagcg	acctagaaac	tctcgtggcg	660
gatcttgagg	agctggctga	cgagctgcgt	gctcggcagc	gccaggagga	cgcacagtag	720
tgaggagatg	aatcagttgc	gcctactcg	gtggcctgat	tcctcccccg	cctgaccocg	780
gaggacggcg	cgcaaaatat	tgctcagatg	cgtgtcgtgc	cgcagccagc	cgcgagcgcg	840
ccaacaaacg	ccacgcgag	gagctggagg	cggctaggtc	gcaaatggcg	ctggaagtgc	900
gtcccccgag	cgaaattttg	gccatggtcg	tcacagagct	ggaagcgga	gcgagaatta	960
tcgcgcgatg	tgccgcgggtg	cccgcaggca	tgacaaaacat	cgtaaattgcc	gcgtttcgtg	1020
tgcccggtgc	cgcccaggac	gtgtcagcgc	cgcaccacc	tgcaaccgaat	cggcagcagc	1080
gtcgcgcgtc	gaaaaagcgc	acaggcggca	agaagcgata	agctgcacga	atacctgaaa	1140
aatgtttgaac	gccccgtgag	cggtaactca	caggcgctcg	gctaaccccc	agtcacaaac	1200
tgggagaaaag	cgtctaaaaa	tgactctagc	ggattcaoga	gacattgaca	cacocggcctg	1260
gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcocgagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
gacgagcgaa	gaccgcgcgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tccagggcag	1380
caagaccocg	gacttcgcca	gocgttggtg	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
gaagttatc	cgaagttggt	caaaatcgct	tgcccggtgc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
cgcgcagcac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	ccgagccacc	agggcgcgcg	1560
gaaaatcgag	cacgtaaaacc	ccgaggtcta	cgcgattttg	gagcgcgtgg	cacgcctgga	1620
aaaagcgcca	gcttggtatg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgccagc	tcatctggct	1680

ES 2 758 096 T3

cattgatccg	gtgtatgccg	cagcaggcat	gagcagccc	aatatgcgcc	tgctggctgc	1740
aacgaccgag	gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgctgaccag	gctttttcac	ataggctgag	1800
ccggtggcca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgctggcatg	cccagcacia	1860
tcgcgtggat	cgcttagctg	atcttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgctatgagc	aggagtttcc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cgagcgccgc	2040
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggaactgctc	cagggcgctgc	2100
cgcccgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160
tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgacgcctac	gagcgtgcct	acaccgtcgc	2220
tcaggcggtc	ggagcagacg	gccgtgagcc	tgatctgccg	ccgatgcgtg	accgccagac	2280
gatggcgcca	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaggccag	ccagtcgtcc	ctgctcgtoa	2340
gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
taaaaaggcc	gcagaacgct	ggaaaagacc	aaacagttag	tacgcccag	cacagcgaga	2460
aaaactagct	aagtccagtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaaac	gcttgaccat	2520
tgcaggttgg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tgcccgacaa	tcaatgaagc	2580
tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgcggcgat	2640
tgaacttcca	cgaggacgcc	gtaaaagcttc	ccagtaaagt	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
acggttcccc	ccgtaggggt	ctctctcttg	gcctccttcc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
tgaagctctc	taggggggct	cacaccatag	gcagataacg	gttccccacc	ggctcacctc	2820
gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgcgcgcac	tcgcttcgc	2880
gaagccttgc	ccgcgggaaa	tttccctccac	cgagttcgtg	cacaccctta	tgccaagctt	2940
ctttcacctc	aaattcgaga	gattggattc	ttaccgtgga	aattcttcgc	aaaaatcgctc	3000
ccctgatcgc	ccttgcgacg	ttgctcgcgg	cggtgccgct	ggttgcgctt	ggcttgaccg	3060
acttgatcct	ccgcggttca	gcctgtgcca	cagccgacag	gatggtgacc	accatttgcc	3120
ccatatcacc	gtcgttactg	atcccgtcgt	caataaacgc	aaccgctaca	ccctgagcat	3180
caaactcttt	tatcagttgg	atcatgtcgg	cggtgtcgcg	gccaaagacg	tcgagcttct	3240
tcaccagaat	gacatcacct	tcctccacct	tcattcctcag	caaattccagc	ccttcccgat	3300
ctgttgaaact	gccggatgcc	ttgtcggtaa	agatgcgggt	agctttttacc	cctgcactctt	3360
tgagcgctga	ggtctgcctc	gtgaagaagg	tggtgtgac	tcataccagg	cctgaatcgc	3420
cccatcatcc	agccagaaaag	tgagggagcc	acggttgatg	agagctttgt	tgtaggtgga	3480
ccagttgggtg	attttgaact	tttgctttgc	cacggaacgg	tctgcgttgt	cggggaagatg	3540
cgtgatctga	tcttcaact	cagcaaaaagt	tcgattttatt	caacaaagcc	gccgtcccgt	3600
caagtcagcg	taatgctctg	ccagtgttac	aaccaattaa	ccaattctga	ttagaaaaac	3660
tcatcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	accatatttt	3720
tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcacoga	ggcagttcca	taggatggca	3780
agatcctggt	atcgggtctgc	gattccgact	cgtccaacat	caatacaacc	tattaatttc	3840
ccctcgtaaa	aaataaggtt	atcaagttag	aaatcaccat	gagtgacgac	tgaatccggt	3900
gagaatggca	aaagcttatg	catttcttcc	cagacttggt	caacaggcca	gccattacgc	3960
tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaacccaa	ccgttatcca	ttcgtgattg	cgctgagcgc	4020
agacgaaata	cgcgatogct	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	atgcaaccgc	4080
cgcaggaaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	ttcttctaata	4140
acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcac	atcaggagta	4200
cggataaaaat	gcttgatggt	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	tagtctgacc	4260
atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	caactctggc	4320
gcatcgggct	tcccatataa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgac	attatcgoga	4380
gccattttat	acccatataa	atcagcatcc	atggtggaat	ttaatcgcg	cctcgagcaa	4440
gacgtttccc	gttgaatatg	gctcataaca	ccccttgat	tactgtttat	gtaagcagac	4500
agttttattg	ttcatgatga	tatatatttt	tcttggtgaa	tgtaacatca	gagattttga	4560
gacacaacgt	ggctttggtg	aataaatcga	acttttgctg	agttgaagga	tcagatcacg	4620
catcttccc	acaacgcaga	ccgttccgtg	gcaaagcaaa	agttcaaaa	caccaactgg	4680
tccacctaca	acaaagctct	catcaaccgt	ggctccctca	ctttctggct	ggatgatggg	4740
gcgattcagg	cctgggtatga	gtcagcaaca	ccttcttcc	gaggcagacc	tcagcgctag	4800
cggagtgtat	actggcttac	tatgttgga	ctgatgagg	tgtaagtga	gtgcttcatg	4860
tggcaggaga	aaaaaggctg	caccggtgcg	tcagcagaat	atgtgatata	ggatatattc	4920

ES 2 758 096 T3

cgcttcctcg	ctcactgact	cgctacgctc	ggctcgttoga	ctgcggcgag	cggaatggc	4980
ttacgaacgg	ggcggagatt	tcctggaaga	tgccaggaag	atacttaaca	gggaagtgag	5040
agggcccgcg	caaaagccgtt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacaagca	tcacgaaatc	5100
tgacgctcaa	atcagtgggtg	gcgaaccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	5160
cctggcggtc	ccctcgtg	ctctcctgtt	cctgcctttc	ggtttaccgg	tgctattccg	5220
ctgttatggc	cgcgtttgtc	tcattccacg	cctgacactc	agttccgggt	aggcagttcg	5280
ctccaagctg	gactgtatgc	acgaaccccc	cgttcagtec	gaccgctg	ccttatccgg	5340
taactatcgt	cttgagcca	accgggaaag	acatgcacaa	gcaccactgg	cagcagccac	5400
tggttaattga	tttagaggag	ttagtcttga	agtcacgcgc	cgtttaaggc	taaactgaaa	5460
ggacaagttt	tggtgactgc	gctcctccaa	gccagttacc	tcggttcaaa	gagttggtag	5520
ctcagagaac	cttcgaaaaa	cgcgccctga	aggcggtttt	ttcgttttca	gagcaagaga	5580
ttacgcgcag	accaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taagggtct	gacgctcagt	5640
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	tcacgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
agatcccttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaaact	5760
ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgctattttc	5820
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggttac	5880
catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	5940
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaaggccg	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	6000
cctccatcca	gtctattaat	tggtgcccgg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	6060
gtttgcgcaa	cgttggtgcc	attgctgcag	gtcgaccatg	cgcggttccc	agtgggaaggc	6120
cgacaatgtc	gcccttcagg	aggtcaagat	cgacggtcag	accgttcgca	tcccacgcgg	6180
tctggttaag	cgcgcacagc	tcggtctcgt	ggacgttagag	cagttctaaa	ccttaaatct	6240
atcgccctaca	accttttgta	ggtaagaatt	taacaagagc	cagttatctt	ctcttaaaat	6300
gaggaggtaa	ctggcttctt	tatgcttaag	aggtgttagc	ataagtgaag	tatgttccaa	6360
cgcgtggacg	tcttaattgg	gaggaagctt	gtcacggact	ggaagacgaa	aagggtatcg	6420
atgaaaattt	tagttgttga	tgacgagcaa	gctgtacgtg	actccttgcg	acgttccctt	6480
tcgttcaacg	gatacaacgt	tggtctcgca	gaagacggca	tcaaagcact	agagatgatt	6540
gacaagggaac	agcctgcttt	ggtgatccct	gatgtcatga	tgccctggtat	ggacggactt	6600
gaggtctgtc	gccaccttcg	cagcgaaggc	gatgatcggc	caattcttat	tcttactgcc	6660
cgcgataatg	tttctgatcg	tggtggtggc	ctcgatgcag	gcgcagatga	ctatttggtt	6720
aaaccatttg	ctcttgaaga	gctgttgccg	cgcgtccgtt	cactggtg	tcgctctgca	6780
gtggaatcaa	atcagagttc	cagcattgaa	caggctctat	tatcttggtg	cgatttgacg	6840
cttgacccag	aaagtcgaga	tgctaccgc	aacggacgcg	ccatcagcct	tactcgaaac	6900
gagttcgcgc	tcctgcaatt	gctcctcaaa	aaccaaaggga	aagtgtctac	tcgcgcccag	6960
atatttggaag	aggtatgggg	ctgcgatttc	cccacttcag	gcaatgccct	cgaggtctac	7020
attggataacc	ttcgacgcaa	gactgaattg	gaaggagaag	accgcctgat	ccatacagta	7080
cgaggagtcg	gatacgtcct	gcgagagacc	gctccgtgac	attaaggcga	atcggcgag	7140
gggaaaatgg	gcctgcccct	accgaaagtg	atgactccga	cggttcaatg	tcgttgcggt	7200
ggcgcttggc	tttgcctgagc	gccacttttg	tagctttcgc	cgttggtggt	attactgttg	7260
ctgcatattg	gtctgtctcc	agctatgtca	ccaactcaat	cgatcgtgat	ctggaaaaac	7320
aagcggatgc	aatgcttgga	cgagccagtg	aagcgggatt	ctatgcaacc	gcagaaaccg	7380
aaattgctct	gttaggtgaa	tatgccagtg	acactcgaat	cgccttaatc	ccacctgggt	7440
gggaatacgt	catcggtgaa	tccatcac	tgctgattc	agatttcctt	aagagtaaa	7500
aagcggggaa	acagatccct	gtaacaagtg	ctgagcgcac	tctcatgaaa	cgagatagct	7560
cgggcacagt	ggtggttttt	gctaaagata	tggtggatgc	cgatcggcag	ctcacggtgc	7620
ttggcgctcat	tctcttgatc	attggcggca	gtggtgtttt	ggcgctcgatt	ctgcttggtt	7680
tcacattg	gaaggagggg	ctgaaaccac	tgctaaagct	gcagcgtgcc	gtcgaagaga	7740
tcgaacgaac	tgatgagctt	cgtgcgattc	ccgtggtggg	aaatgatgag	ttcgctaagt	7800
tgactcgtag	tttcaatgac	atgctcaagg	cactgcggga	gtctcgtacc	cggcaatctc	7860
agttggtggc	agatgcagga	cacgagctga	aaactccact	gacctcaatg	cggacaaaata	7920
ttgaattgct	gttgatggca	accaacagtg	gaggatcggg	aatccccaag	gaagaattgg	7980
atggccttca	gcgtgatgta	ttggcgcaga	tgaccgaaat	gtctgatttg	attggtgatc	8040
ttgttgatct	tgccggtgaa	gaaaccgccc	aaacgtcaag	cattgtagat	ctcaaccaag	8100
tggttgaaat	tgccgttgac	cgaatggaaa	gccgtgcac	gacggtgcgg	atagatgttt	8160

ES 2 758 096 T3

cagagactgt	ggattggaaa	ctgctgggcg	atgatttttc	cttaaccagg	gcattagtaa	8220
atgtttttga	taatgccatt	aaatggtcgc	ctgagaatgg	cattgttcga	gtgtcgatgt	8280
cacagatcga	caaagcaacg	gtccgcattg	ttattgatga	ttcagggcct	ggaattgctg	8340
aaaaagaacg	aggattagtt	ttggaacggt	tctatcgcg	cgtcagctcc	cgttccatgc	8400
cgggatcggg	attaggtctt	gccatcgta	atcaggttgt	gaatcggcat	ggtggccaac	8460
tcgttggtgg	tgaatcagat	gatggcgga	cgagaatcac	tattgatttg	ccaggggaa	8520
ccattcgag	cggttcgaa	aatgtcgatg	attaaaccac	taaagagctc	acaggaagtg	8580
ttcagactac	ttagagtga	gccccagcca	cagggttcat	aatcaaatca	tgacaaatca	8640
attccccaca	aacaacggtg	agaacccgga	ccgtgcacg	gaaactccat	cagaaaccaa	8700
ctccggtacc	tgaactttta	gaaggagata	tcatatggtg	agcaagggcg	aggagctggt	8760
caccggggtg	gtgcccattc	tggtcgagct	ggacggcgac	gtaaacggcc	acaagttcag	8820
cggtgtccgc	gagggcgagg	gcgatgccac	ctacggcaag	ctgaccctga	agttcatctg	8880
caccacgggc	aagctgccc	tgccctggcc	cacctcgtg	accaccttcg	gctacggcct	8940
gcagtgtctc	gcccgtacc	ccgaccacat	gaagcagcac	gacttcttca	agtccgccat	9000
gcccgaaggc	tacgtccagg	agcgcacat	cttcttcaag	gacgacggca	actacaagac	9060
ccgcgccgag	gtgaagtctg	agggcgacac	cctggtgaac	cgcatcgagc	tgaagggcac	9120
caacttcaag	gaggacggca	acatcctggg	gcacaagctg	gagtacaact	acaacagcca	9180
caacgtctat	atcatggccg	acaagcagaa	gaacggcatc	aaggtgaact	tcaagatccg	9240
ccacaacatc	gagggcgga	gcgtgcagct	cgccgaccac	taccagcaga	acaccccat	9300
cggcgacggc	cccgtgctgc	tgcccgacaa	ccactacctg	agctaccagt	ccgccttgag	9360
caaagacccc	aacgagaagc	gcgatcacat	ggtcctgctg	gagttcgtga	ccgcgcggcg	9420
gatcactctc	ggcatggagc	agctgtacaa	gtaataagga	tcc		9463

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Forschungszentrum Jülich GmbH
- 5 <120> SENSORES PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SECRECIÓN MICROBIOLÓGICA DE PROTEÍNAS
- <130> F13156EP
- <160> 39
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
<211> 201
<212> ADN
<213> Corynebacterium
- 15 <220>
<221> misc_feature
<223> secuencia de ADN del promotor cg0706
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gcgggtctgc | cacatttgct | gaaaagtacc | agttgcaagg | tgtggtgttg | gagcttcata | 60 |
| accaggttgg | gcaaaaggga | tgaatccctg | gttgtggtgg | ggctcctgaa | aagtactcat | 120 |
| agactctatt | gtggagtgtt | gaggttgata | agtgaatggg | ggaaagccct | gaaaaggtgg | 180 |
| cgttcagggg | cttccctgat | g | | | | 201 |
- 20
- <210> 2
<211> 194
<212> ADN
<213> Corynebacterium
- 25 <220>
<221> misc_feature
<223> secuencia de ADN del promotor thecg0996
- <400> 2

ES 2 758 096 T3

		accttaaatt catcgctac aaccttttgt aggtaagaat ttaacaagag ccagttatct	60
		tctcttaaaa tgaggaggtg actggcttct ttatgcttaa gaggtgttag cataagtga	120
		atatgttcca acgcgtggac gtcttaattg ggaggaagtc tgtcacggac tggaagacga	180
		aaagggatc gatg	194
5	<210> 3 <211> 118 <212> ADN <213> Corynebacterium		
	<220> <221> misc_feature <223> secuencia de ADN del promotor g0998		
10	<400> 3		
		gggaacccat tcgcagcggg ttcgaaaatg tcgatgatta aaccactaaa gagctcacag	60
		gaagtgttca gactacttag agtgacgccc cagccacagg gttcataatc aaatcatg	118
15	<210> 4 <211> 216 <212> ADN <213> Corynebacterium		
	<220> <221> misc_feature <223> secuencia de ADN del promotor cg1325		
20	<400> 4		
		accagcgacg ccgccgatcc atttgctggg ggtgcttcgg gcgagtcgtc gagattgtgc	60
		tgggaaagtc atcgggatca agctccttta tggctgattg agtttttctt tcttcttcaa	120
		tcacgcgcaa taagaaccta gagcacatcg gggatttccc ctctcctaac ccctaaaaac	180
		ccctgagaaa acgctccaag taaaccctta cagctc	216
25	<210> 5 <211> 693 <212> ADN <213> Corynebacterium		
	<220> <221> misc_feature <223> secuencia de ADN del regulador cg0706-cg1325		
30	<400> 5		

ES 2 758 096 T3

```

atggttgatg tgtttttggg cgatgaccac tccgtgtttc gctccggcgt caaagcagaa      60
ctaggcaacg ccgtcacagt agtcggcgaa gcagggacgg tggccgacgc cgtagccggc      120
atcaaggcaa gcaaaccaga ggtagtgctt ctcgacgtcc acatgccga cggcggcggc      180
ctcgcagtgc tccagcagat caacgactcc gatgtggaca ccattttctt ggcaactcagt      240
gtctctgatg ctgcggaaga tgtcatcgcc atcatccgtg gcggtgccag gggatacgtg      300
accaaataca tctccggtga agaactcatc gaagccatca accgcgtgaa atccggcgac      360
gcattcttct caccacgcct ggcaggcttc gtccctcgacg ccttcgcgcg ccccgattcc      420
gcagctggcg caggcattgt cgacgcaccc gaaaaagacg ccgccgtaga atccggaaaa      480
atcctcgacg acccagttgt cgacgccctc acccgccgcg aactcgaagt cctccgccta      540
ctagcccgcg gctacaccta caaagaaatc ggcaaagaac tgttcatttc cgtcaaaacc      600
gtggaaaccc acgcctcaaa cattctgcgg aaaacccaac aatccaaccg ccacgcgttg      660
acccggtggg ctcaactcgag ggatcttgac taa                                  693

```

5 <210> 6
 <211> 768
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del regulador cg0996-cg0998

10 <400> 6

```

atgttccaac gcgtggacgt cttaattggg aggaagtctg tcacggactg gaagacgaaa      60
agggtatcga tgaaaatttt agttgttgat gacgagcaag ctgtacgtga ctccctgcga      120
cgttcccttt cgttcaacgg atacaacggt gttctcgcag aagacggcat ccaagcacta      180
gagatgattg acaaggaaca gcctgctttg gtgatcctcg atgtcatgat gcctgggatg      240
gacggacttg aggtctgtcg ccaccttcgc agcgaaggcg atgatcggcc aattcttatt      300
cttactgccc gcgataatgt ttctgatcgt gttggtggcc tcgatgcagg cgcagatgac      360
tatttggtta aaccatttgc tcttgaagag ctggtggcgc gcgtccgttc actggtgcgt      420
cgctctgcag tggaatcaaa tcagagttcc agcattgaac aggctctatt atcttgtggc      480
gatttgacgc ttgaccaga aagtcgagat gtctaccgca acggacgcgc catcagcctt      540
actcgaacag agttcgcgct cctgcaattg ctcccaaaa accaaaggaa agtgctcact      600
cgcgccca ttttggaaga ggtatggggc tgcgatttcc ccacttcagg caatgccctc      660
gaggtctaca ttggatacct tcgacgcaag actgaattgg aaggagaaga ccgcctgatc      720
catacagtac gaggagtcgg atacgtcctg cgagagaccg ctccgtga                    768

```

15 <210> 7
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Bacillus
 <220>

<221> misc_feature
<223> secuencia de ADN del promotor htrA

<400> 7

5 atggataact atcgtgatga aaacagaacg aaaggtaatg agaatgaggt ctttttaacg 60
aaagagaacg atcagagcgc ctctactcgc gcccgcaatg tcattcatga tcaggagaag 120
aaaaaacgag gattcggatg gttcagaccg ttgcttggcg gagtgatcgg cggcagtcctt 180
gctcttgga tttacacgtt tacaccgctt ggtgaccatg attctcagga cactgcaaaa 240
caatcatcca gccagcagca aacgcaatct gttacagcaa caagcacctc ctctgaatct 300
aaaaaagct caagcagctc atctgcattc aagagcgagg actcttctaa aatctcagat 360
atggtagaag acctttcacc agcgattgtc ggtattacaa atcttcaggc acaatcaaac 420
agctctttgt tcggctctag ttctctgat tccagcgaag atacagaaag cggttcaggg 480
tcagggtgtca ttttcaaaaa agagaatggc aaggcctata tcattacaaa taaccacgtc 540
gtagaagggg catcatcact gaaggatatct ttatatgacg gcaactgaggt tactgcaaac 600
ctggtaggca gtgactcgtt aactgattta gccgtcctcc aaatcagtga tgaccacgtc 660
acaaaagtgg caaacttcgg tgattcatct gatcttagaa caggcgagac cgttattgcg 720
attggggatc cgcttggaag agacctgtcc cgcacagtaa cacaaggaat tgtaagcggc 780
gtggacagaa cggtttcaat gtctacatca gccggcgaaa cgagcattaa cgtcattcag 840
acagacgcag caattaatcc aggtaacagc ggccgtcctt tgttaaatac agacggcaaa 900
attgtcggca ttaacagtat gaaaatcagt gaggatgatg ttgaggggat cggattcgcc 960
attccaagca atgacgtaaa accgattgct gaagaattgc tgtctaaagg acaaattgaa 1020
cgtccatata tcgggtgtcag catgcttgat ctagagcaag tgccgcaaaa ttaccaagaa 1080
ggcacactcg gcctgttcgg cagccagctg aataaaggcg tttacatccg tgaggctcgt 1140
tcaggctctc ctgctgaaaa ggccggatta aaagcggagg atattatcat cggcctaaaa 1200
ggtaaagaaa ttgatacagg cagtgaattg cgcaatatct tatataaaga cgcaaagatc 1260
ggtgataccg ttgaagtga aattctccga aacggcaaaag aaatgacgaa aaaaattaaa 1320
ctggatcaaa aagaagagaa aacttcgtaa 1350

<210> 8
<211> 678
<212> ADN
<213> Bacillus

<220>
<221> misc_feature
<223> secuencia de ADN del regulador Css

<400> 8

ES 2 758 096 T3

```

ttgtcataca ccatttatct agttgaagat gaggataacc tgaatgaact gctgacgaag      60
tatttagaga atgagggctg gaacattaca tcttttacga aaggtgaaga cgccagaaaag      120
aaaatgacac cgtctcccca cctatggatt ctcgatatca tgctgccgga taccgacggc      180
tatacattaa taaaagaaat caaggcgaat gatcctgacg tgccggtcat ttttatttcc      240
gcccagagatg cggatattga cagagtgtct ggcttagagc ttggcagcaa tgactacatt      300
tcaaagccgt ttttgccgcg ggagctgatt atccgtgtgc aaaagctgct gcagctcgta      360
tataaggaag ctctctctgt ccaaaaaaat gaaattgccg tctcctcgta tcgggtcgct      420
gaagacgccc gcgaggtcta tgacgaaaac gggaatatca tcaatttgac gtcaaaggaa      480
tttgatctgc tgctattatt tatccatcat aaagggcatc catactctcg tgaggatctc      540
ctcctaaaag tgtggggaca tgactacttc ggaacagacc gggtcgttga tgatctcgtc      600
cggagactgc gcagaaagat gcctgaattg aaggtggaga cgatttacgg ttccgggtac      660
aggatgatgt catcatga                                     678

```

5 <210> 9
 <211> 113
 <212> ADN
 <213> Bacillus

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del promotor liaL

```

<400> 9
tccggtgcga gatacgactc cggctcttata taaaaatcaa tctctgattc gttttgcata      60
tcttccaact tgtataagat gaagacaagg aaaacgaaaag gaggatctgc atg          113

```

15 <210> 10
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> Bacillus

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN que codifica el regulador LiaR
 <400> 10

ES 2 758 096 T3

```

gtgattcgag tattattgat tgatgatcat gaaatgggtca gaatggggct cgcggccttt 60
ttggaggcgc agcccgatat tgaagtcata ggccaagcat cggacggcag cgaagggtgtt 120
cggcttgctg tggaactgtc gcctgatgtc attttaatgg accttgatcat ggaggggcatg 180
gatggcattg aagctacaaa gcaaatttgc cgggagcttt cgcacccgaa aattattgtg 240
ctcactagct tcattgatga tgacaaagtg taccgggtta ttgaagctgg cgcgctcagc 300
tatctgttga aaacctcaaa agcggcagaa atcgccgatg ccatccgcgc cgcaagcaag 360
ggagagccga agctggagtc aaaagtggcg ggaaaagtat tatccaggct gcgccactca 420
ggtgaaaacg cgctcccgca tgaatcgctt acaaaacggg agctcgaaat actctgcctg 480
atcgcagaag gaaagacaaa caaagaaata ggcgaggaac tgtttattac gattaaaaca 540
gtcaaaacac atattacgaa tattttatca aagctggatg tcagtgaccg gacgcaggcg 600
gcggtgtacg cacaccgaaa tcctctcgtg aattag 636

```

<210> 11
 <211> 726
 <212> ADN
 <213> Bacillus

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN que codifica la proteína LiaF

<400> 11

```

atgacaaaaa aacagcttct cggattgatc attgctttat tcggcatcag tatgtttttg 60
caaattatcg gaataggcga tctgctgttt tggccgctct tttttctgat tgccggctat 120
ttccttaaaa aatattcccg tgattggctt ggctccgtca tgtatatctt tgcccgcttt 180
ctatttttga aaaacctctt cagcatcacc tttaatttat tcggctatgc gtttgccgca 240
tttctgattt acgccggcta caggttatc aaaggaagc cgatatttga accgaatgag 300
aaacaggtca atctcaataa aaaagaacat catgagccgc caaaagatgt aaaacatccc 360
gacatgcgca gcttttttat cggtgagctg caaatgatga agcagccgtt tgacctgaac 420
gatttaaatg tctctggttt tatcggtgat atcaaaatcg atttatctaa agcgatgatt 480
cccgagggag aaagtacaat cgtcattagc ggagtcattg gtaacgttga tatttatgta 540
ccatcggacc ttgaagtggc tgtcagctcg gctgttttta taggagacat taatctgac 600
ggctcgaaga aaagcggatt aagcacgaag gtatatgccg cgtcaactga ttttagcgag 660
tcaaagcgcc gggtaaaaagt gtccgtttcc ttatttatcg gtgatgtgga tgtgaagtac 720
gtatga 726

```

<210> 12
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Bacillus

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN que codifica la proteína LiaS

ES 2 758 096 T3

<400> 12

```

atgagaaaaa aaatgcttgc cagcctccaa tggcgcgcca tccgcatgac aacgggaatc      60
agcctgctcc tttttgtttg cctgatttcc tttatgatgt tttactatcg gctcgatccg      120
cttgttttgc tgtcatcaag ctggttcgga attccgttta tcctgatttt gcttctgac      180
agcgtgaccg tcggtttcgc ctcagggtat atgtacggca accggttgaa gacaaggatt      240
gatacattaa ttgaatccat tttaaccttt gaaaacggca atttcgctta tcggataaccg      300
ccgctcgggtg atgatgaaat cggcctggct gctgatcagc tgaacgaaat ggcgaagcgc      360
gtggagcttc aagtcgcac cctccagaaa ctttccaatg aacgtgcgga atggcaggct      420
caaatgaaga agtcggttat ctcagaagaa cgccagcgat tggccagaga tcttcatgat      480
gcggtcagcc agcagctctt tgccatatcg atgatgacat cagccgtgct ggaacatgtc      540
aaggatgctg atgacaaaac agtcaagcgg atcaggatgg tcgagcatat ggcaggcgaa      600
gcccaaaatg agatgagggc gctgctgctc catttacggc ctgttaccct tgaaggaaaa      660
gggctgaagg agggccttac ggagcttttg gacgagttcc gaaaaaagca gccgattgat      720
attgagtggtg atatacagga cacagcgata tccaagggtg ttgaagacca cttgttcaga      780
atcgtgcagg aggccctttc aaacgtatth agacattcaa aagcgtcaaa agtaaccgtg      840
attctgggca taaagaacag ccagctccgt ctgaagggtg ttgataatgg aaaaggcttt      900
aaaatggacc aggtgaaagc ctctcatcac ggcttgaatt ctatgaaaga acgtgcaagt      960
gaaatcggcg gtgtcgccga agtgatttca gtagaaggaa aaggcactca aatcgaagtg     1020
aagggtccga tttttccgga agaaaaagga gagaacgaac gtgattcgag tattattgat     1080
tga                                                                    1083

```

5

<210> 13
 <211> 116
 <212> ADN
 <213> Mycobakterium

10

<220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN que codifica el promotor mprA

<400> 13

```

ggacatcgag aactctcggg gttcggcgaa cgttatctca gtggaatctc agtccacgcg      60
cgcaacctag ttgtgcagtt actgttgaaa gccacacca tgccagtcca cgcagtg      116

```

15

<210> 14
 <211> 1515
 <212> ADN
 <213> Mycobakterium

20

<220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del regulador MprB

<400> 14

25

ES 2 758 096 T3

```

atgtggtggt tccgccgcgc agaccgggcg ccgctgcgcg ccaccagctc attatccctg      60
cggtaggggg tcatgctgct ggcgatgtcc atggtcgcga tggtaggtgt gctgatgtcg      120
ttcgccgtct atgcggtgat ctcgccgcgc ctctacagcg acatcgacaa ccaactgcag      180
agccggggcg aactgctcat cggcagtggc tcgctggcag ctgatccggg taaggcaatc      240
gagggtagcg cctattcgga tgtcaacgcg atgctggtca accccggcca gtccatctac      300
accgctcaac agccggggcca gacgctgccg gtcggtgctg ccgagaaggc ggtgatccgt      360
ggcgagttgt tcatgtcgcg gcgcaccacc gccgaccaac gggtagcttg catccgtctg      420
accaacggta gttcgtgct gatctccaaa agtctcaagc ccaccgaagc agtcatgaac      480
aagctgcgtt gggtagctatt gatcgtgggt gggatcgggg tggcggtcgc cgcggtggcc      540
ggggggatgg tcacccgggc cgggctgagg ccggtgggcc gcctcaccga agcggccgag      600
cgggtggcgc gaaccgacga cctgcggccc atcccgctct tcggcagcga cgaattggcc      660
aggctgacag aggcattcaa tttaatgctg cgggcgctgg ccgagtcacg ggaacggcag      720
gcaaggctgg ttaccgacgc cggacatgaa ttgctgacct cgctaacgct gctgcgcacc      780
aatgtcgaac tcttgatggc ctcgatggcc ccgggggctc cgcggtacc caagcaggag      840
atggtcgacc tgcgtgccga tgtgctggct caaatcgagg aattgtccac actggtaggc      900
gatttggtgg acctgtcccg aggcgacgcc ggagaagtgg tgcacgagcc ggtcgacatg      960
gctgacgtcg tcgaccgcag cctggagcgg gtcaggcgcc ggcgcaacga tatccttttc     1020
gacgtcgagg tgattgggtg gcaggtttat ggcgataccg ctggattgtc gcggatggcg      1080
cttaacctga tggacaacgc cgcgaagtgg agcccgccgg gcggccacgt ggtgtcagg      1140
ctgagccagc tcgacgcgtc gcacgtgag ctggtggttt ccgaccgcgg cccgggcatt      1200
cccgtagcag agcgccgtct ggtgtttgaa cggttttacc ggtcggcatc ggcacgggcg      1260
ttgccgggtt cgggcctcgg gttggcgatc gtcaaacagg tggtagctca ccacggcgga      1320
ttgctgcgca tcgaagacac cgaccagggc ggccagcccc ctggaacgct gatttacgtg      1380
ctgctccccg gccgtcggat gccgattccg cagcttcccc gtgcgacggc tggcgctcgg      1440
agcacggaca tcgagaactc tcggggttcg gcgaacgtta tctcagtgga atctcagtc      1500
acgcgcgcaa cctag                                         1515

```

- 5 <210> 15
 <211> 774
 <212> ADN
 <213> Mycobakterium
- 10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del factor sigma (SigE)
- <400> 15

ES 2 758 096 T3

```

atggaactcc tcggcggacc ccgggttggg aatacggaat cgcaactttg cgttgccgac      60
ggtgacgact tgccaactta ttgcagtgca aattcggagg atctcaatat caccgaccatc      120
acgacottga gtccgaccag catgtctcat ccccaacagg tccgcgatga ccagtgggtg      180
gagccgtctg accaattgca gggcacccgc gtattcgacg ccaccgggga caaggccacc      240
atgccgtcct gggatgagct ggtccgtcag cacgccgatc ggggtgtaccg gctggcttat      300
cggtctctccg gcaaccagca cgatgccgaa gacctgaccc aggagacott tatcagggtg      360
ttccgggtcgg tccagaatta ccagccgggc accttcgaag gctggctaca ccgcatcacc      420
accaaacttg tcttgacat ggtccgccgc cgggctcgca tccggatgga ggcgttaccc      480
gaggactacg accgggtgcc cgccgatgag cccaaccccg agcagatcta ccacgacgca      540
cggtcgggac ctgacctgca ggctgccttg gcctcgctgc cgccggagtt tcgtgccgcg      600
gtggtgctgt gtgacatcga gggctctgtc tacgaggaga tcggcggccac actgggcgtg      660
aagctcggga cggtagctag ccggatacac cgccgacgcc aggcactgcg ggactacctg      720
gcagcgcacc ccgaacatgg cgagtgcgca gttcacgtca acccagttcg ctga      774

```

5 <210> 16
 <211> 272
 <212> ADN
 <213> Escherichia

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del promotor htrA

<400> 16

```

gtaaattacc gtcagattct cctgagtttc cgctatggga atattattac cgttgccgcc      60
tgctgcagga ttatatcagc ggtatgaccg acctctatgc gtgggatgaa taccgacgtc      120
tgatggccgt agaacaataa ccaggctttt gttaaagacga acaataaatt tttaaccttt      180
gcagaaactt tagttcggaa cttcaggcta taaaacgaat ctgaagaaca cagcaatttt      240
gcgttatctg ttaatcgaga ctgaaataca tg      272

```

15 <210> 17
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Escherichia

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del regulador CpxR

<400> 17

ES 2 758 096 T3

```

atgaataaaa tctgttagt tgatgatgac cgagagctga cttccctatt aaaggagctg      60
ctcgagatgg aaggcttcaa cgtgattggt gccacgatg gggaacaggc gcttgatctt      120
ctggacgaca gcattgattt acttttgctt gacgtaatga tgccgaagaa aaatgggtatc      180
gacacattaa aagcacttcg ccagacacac cagacgcctg tcattatggt gacggcgcg      240
ggcagtgaac ttgatcgcgt tctcggcctt gagctgggcg cagatgacta tctcccgaaa      300
ccgtttaatg atcgtgagct ggtggcacgt attcgcgcga tctgcgcgg ttcgcactgg      360
agcgagcaac agcaaaacaa cgacaacggt tcaccgacac tggaagtga tgccttagtg      420
ctgaatccag gccgtcagga agccagcttc gacgggcaaa cgctggagtt aaccgggtact      480
gagtttaccg tgctctatct gctggcacag catctgggtc aggtgggttc ccgtgaacat      540
ttaagccagg aagtgttggg caaacgcctg acgcctttcg accgcgctat tgatatgcac      600
atttccaacc tgcgctgtaa actgccgat cgtaaagatg gtcacccgtg gtttaaaacc      660
ttgcgtggtc gcggtatct gatggtttct gcttcatga                               699

```

5 <210> 18
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> proteína amarilla fluorescente potenciada (eyfp)
 <400> 18

```

gtgagcaagg gcgaggagct gttcacccggg gtggtgcca tctggtcga gctggacggc      60
gacgtaaacy gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggcg agggcgatgc cacctacggc      120
aagctgacct tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc      180
gtgaccacct tcggctacgg cctgcagtgc ttgcgccgt accccgacca catgaagcag      240
cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaa ggctacgtcc aggagcgac catcttcttc      300
aaggacgacg gcaactacaa gaccgcgcgc gaggtgaagt tcgaggcgga caccctgggtg      360
aaccgcatcg agctgaaggg catcaacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag      420
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc      480
atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggcg gcagcgtgca gctcgccgac      540
cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgccga caaccactac      600
ctgagctacc agtccgcct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg      660
ctggagttcg tgaccgcgc cggtatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtaataa      720

```

10

15 <210> 19
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> secuencia de proteínas de la eYFP
 <400> 19

ES 2 758 096 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 0706-Sal-fil

10 <400> 20
gcggtcgacg ggtaaactgt ggatataaa

29

	<210> 21	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador 0706-RBSNde_r	
	<400> 21	
	gcgcataatga tatctccttc ttctagcggg tctgccacat ttgctg	46
10	<210> 22	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Spc SacII-f	
15	<400> 22	
	gcgccgcgga ctaataacgt aacgtgactg gcaagag	37
	<210> 23	
	<211> 37	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador Spc Bgl-r	
	<400> 23	
	gcgagatctt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgac	37
25	<210> 24	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador SenCas-fw	
	<400> 24	
	gtcgccgtcc agctcgacca ggatg	25
	<210> 25	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador TKP-seq-rv	
	<400> 25	
40	cgggaagcta gagtaagtag ttcg	24
	<210> 26	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador 1325-Sal-f	
	<400> 26	
	gcggtcgacg agctgtaagg gttacttg	29
	<210> 27	
50	<211> 45	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 1325-RBSNde-r	
	<400> 27	
5	gcgcatatga tatctccttc ttctaaccag cgacgcgcgc gatcc	45
	<210> 28	
	<211> 570	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Fragmento de ADN sintético para pSen0996_8	
	<400> 28	
	gaattttaaca agagccagtt atcttctctt aaaatgagga ggtaactggc ttcttttatgc	60
	ttaagaggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgcgt ggacgtctta attgggagga	120
	agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgaa aatttttagtt gttgatgacg	180
	agcaagctgt acgttaatct atcgcgcgcgt cagctcccgt tccatgccgg gatcgggatt	240
	aggtcttgcc atcgtgaatc aggttggtgaa tcggcatggt ggccaactcg ttgtgggtga	300
	atcagatgat ggcggaacga gaatcactat tgatttgcca ggggaaccca ttcgcagcgg	360
	gttcgaaaat gtcgatgatt aaggtaccac cactaaagag ctacaggaa gtgttcagac	420
	tacttagagt gacgccccag ccacaggggt cataatcaaa tcatgacaaa tcaattcccc	480
	acaaacaacg gtgagaaccc ggaccgtgca tcggaaactc catcagaaac caactccggt	540
	acctgaactt taagaaggag atatcatatg	570
15	<210> 29	
	<211> 281	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Fragmento de ADN sintético para pSen0996_8c	
	<400> 29	
	caattttaaca agagccagtt atcttctctt aaaatgagga ggtaactggc ttcttttatgc	60
	ttaagaggtg ttagcataag tgaaatatgt tccaacgcgt ggacgtctta attgggagga	120
	agtctgtcac ggactggaag acgaaaaggg tatcgatgtg aaccatttcg cagcgggttc	180
	gaaaatgtcg atgattaagg taccaccact aaagagctca caggaagtgt tcagactact	240
	tagagtgacg cccagccac agggttcata atcaaatcat g	281
25	<210> 30	
	<211> 2471	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Fragmento de ADN sintético para pSen0996_8e	
	<400> 30	

ES 2 758 096 T3

aattttaacaa gagccagtta tctttctotta aaatgaggag gtaactggct tctttatgct	60
taagaggtgt tagcataagt gaaatatgtt ccaacgcgtg gacgtcttaa ttgggaggaa	120
gtctgtcacg gactggaaga cgaaaagggg atcgatgaaa attttagtgt ttgatgacga	180
gcaagctgta cgtgactcct tgcgacgttc cctttcgttc aacggataca acgttggtct	240
cgcagaagac ggcattccaag cactagagat gattgacaag gaacagcctg ctttggtgat	300
cctcgatgtc atgatgcctg gtatggacgg acttgaggtc tgcgcccacc ttgcgacga	360
aggcgatgat cggccaattc ttattcttac tgcccgcat aatgtttctg atcgtgttg	420
tggcctcgat gcaggcgag atgactatct ggctaaacca tttgctcttg aagagctgtt	480
ggcgcgcgtc cgttactggt tgcgtcgtc tgcagtggaa tcaaatcaga gttccagcat	540
tgaacaggct ctattatctt gtggcgattt gacgcttgac ccagaaagtc gagatgtcta	600
ccgcaacgga cgcgccatca gccttactcg aacagagttc gcgctcctgc aattgctcct	660
caaaaaccaa aggaaagtgc tcaactcgcg ccagattttg gaagaggtat ggggctgcga	720
tttccccact tcaggcaatg ccctcgaggt ctacattgga taccttcgac gcaagactga	780
attggaagga gaagaccgcc tgatccatac agtacgagga gtcggatacg tcctgcgaga	840
gaccgctccg tgacattaag gcgaatcggc gcaggggaaa atgggcctgc cctaccgaa	900
agtgatgact ccgacggttc aatgtcgttg cgttggcgtc tggctttgct gagcgccact	960
ttggtagctt tcgccgttggt gtattact gttgctgcat attggtctgt ctccagctat	1020
gtcaccaact caatcgatcg tgatctggaa aaacaagcgg atgcaatgct tggacgagcc	1080
agtgaagcgg gattctatgc aaccgcagaa accgaaattg ctctgttagg tgaatatgcc	1140
agtgacactc gaatcgctt aatccacct ggggtgggaat acgtcatcgg tgaatccata	1200
tcaactgcctg attcagattt ccttaagagt aaagaagcgg ggaaacagat cctcgtaaca	1260
agtgtgagc gcattctcat gaaacgagat agctcgggca cagtgggtgt ttttgctaaa	1320
gatatggtgg ataccgatcg gcagctcacg gtgcttggtc tcattctctt gatcattggc	1380
ggcagtgggtg ttttggcgtc gattctgctt ggtttcatca ttgcgaagga ggggctgaaa	1440
ccactgtcaa agctgcagcg tgccgtcgaa gagatcgaac gaactgatga gcttcgtgcg	1500
attcccgtgg tgggaaatga tgagttcgtc aagttgactc gtagtttcaa tgacatgctc	1560
aaggcactgc gggagtctcg taccggcaa tctcagttgg tggcagatgc aggacacgag	1620
ctgaaaactc cactgacctc aatgcggaca aatattgaat tgctgttgat ggcaaccaac	1680
agtggaggat cgggaatccc caaggaagaa ttggatggcc ttcagcgtga tgtattggcg	1740

ES 2 758 096 T3

cagatgaccg aaatgtctga tttgattggg gatcttgttg atcttgccg tgaagaaacc 1800
gccgaaacgt caagcattgt agatctcaac caagtgttg aaattgcgct tgaccgaatg 1860
gaaagccgtc gcatgacggt gcgtagat gtttccgaga ctgtggattg gaaactgctg 1920
ggcgaatgatt ttctcttaac cagggcatta gtaaagtgtt tggataatgc cattaaatgg 1980
tcgcctgaga atggcattgt tcgagtgtcg atgtcacaga tcgacaaagc aacgggtccgc 2040
attgttattg atgattcagg gcctggaatt gctgaaaaag aacgaggatt agttttggaa 2100
cggttctatc gcgccgtcag ctcccgttcc atgccgggat cgggattagg tcttgccatc 2160
gtgaatcagg ttgtgaatcg gcatggtggc caactcgttg tgggtgaatc agatgatggc 2220
ggaacgagaa tcaactattga ttgtccaggg gaaccattc gcagcgggtt cgaaaatgtc 2280
gatgattaaa ccactaaaga gctcacagga agtggttcaga ctacttagag tgacgccccca 2340
gccacagggt tcataatcaa atcatgacaa atcaattccc cacaacaac ggtgagaacc 2400
cggaccgtgc atcggaaact ccatcagaaa ccaactccg tacctgaact ttaagaagga 2460
gatatcatat g 2471

5 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador JPS0003
10 <400> 31
ctgaacttgt ggccgtttac 20
<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Cebador JPS0004
<400> 32
ttgtgccgg gaagctagag 20
20 <210> 33
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador AmyE-HpaI-f
25 <400> 33
gcgcgttaac cgaaggagat atagatatgt ttgc 34
<210> 34
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador AmyE-SacI-r
<400> 34

cagtgaattc gagctcctag tg

22

<210> 35

<211> 7153

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de plásmido pSen0706

<400> 35

ggatccttat tacttgtaca gctcgtccat gccgagagtg atcccggcgg cggtcacgaa	60
ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttggggtct ttgctcaggg cggactggta	120
gctcaggtag tgggtgtcgg gcagcagcac ggggccgtcg ccgatggggg tgttctgctg	180
gtagtggtcg gcgagctgca cgctgccgcc ctogatgttg tggcggatct tgaagtccac	240
cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagacg ttgtggctgt tgtagttgta	300
ctccagcttg tgcccagga tgttgccgtc ctccctgaag ttgatgccct tcagctcgat	360
gcggttcacc aggggtgtcg cctcgaactt caccctcggcg cgggtcttgt agttgccgtc	420
gtccttgaag aagatggtgc gctcctggac gtagccttcg ggcattggcg acttgaagaa	480
gtcgtgctgc ttcattgtgt cggggtagcg ggcgaagcac tgcaggccgt agccgaaggt	540
ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt	600
cagcttgccg taggtggcat cgccctcgcc ctgcgggac acgctgaact tgtggccgtt	660
tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct cctcgccctt	720
gctcaccata tgatatctcc ttcttctagc ggggtctgcca catttctga aaagtaccag	780
ttgcaaggtg tgggtgttga gcttcataac caggttgggc aaaagggatg aatccctggt	840
tgtggtgggg ctccctgaaa gtactcatag actctattgt ggagtgttga ggctgataag	900
tgaatggggg aaagccctga aaaggtggcg ttcagggtct tccctgatgg tttggtgtcg	960
caggggcatg acatgatcga agatatgagt aacacacctg cgccttatac cccgcagcct	1020
gcggggcaag cgggtgccttt atatccacg tttaccgctc gacctgcagc aatggcaaca	1080
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata	1140
gactggatgg agggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggtggc	1200
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca	1260

10

ES 2 758 096 T3

ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	1320
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg	1380
taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa	1440
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt	1500
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc ttaataagat gatcttcttg agatcgtttt	1560
ggctctgcgcg taatctcttg ctctgaaaac gaaaaaacgg ccttgacagg cggtttttcg	1620
aaggttctct gagctaccaa ctctttgaac cgaggtaact ggcttgagg agcgcagtca	1680
ccaaaacttg tcctttcagt ttagccttaa ccggcgcatg acttcaagac taactcctct	1740
aaatcaatta ccagtggctg ctgccagtgg tgcttttgca tgtctttccg ggttggaactc	1800
aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcggactga acgggggggt cgtgcataca	1860
gtccagcttg gagegaactg cctaccggga actgagtgtc aggcgtggaa tgagacaaac	1920
gcggccataa cagcggaatg acaccggtaa accgaaaggc aggaacagga gagcgcacga	1980
gggagccgcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccaccact	2040
gatttgagcg tcagatttcg tgatgcttgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacggct	2100
ttgccgcggc cctctcaact ccctgttaag tatcttctg gcatcttcca ggaaatctcc	2160
gccccgttcg taagccatct ccgctcgcg cagtcgaacg accgagcgta gcgagtcagt	2220
gagcgaggaa gcggaatata tcctgtatca catattctgc tgacgcaccg gtgcagcctt	2280
ttttctctg ccacatgaag cacttcaact acaccctcat cagtgccaac atagtaagcc	2340
agtatacact ccgctagcgc tgaggctctgc ctgctgaaga aggtgttgct gactcatacc	2400
aggcctgaat cgcgccatca tccagccaga aagtgagga gccacgggtg atgagagctt	2460
tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggctctgct	2520
tgtcgggaag atgcgtgac tgatccttca actcagcaa agttcgattt attcaacaaa	2580
gccacgttgt gtctcaaaat ctctgatgtt acattgcaca agataaaaat atatcatcat	2640
gaacaataaa actgtctgct tacataaaca gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc	2700
aacgggaaac gtcttgctcg aggcgcgat taaattcaa catggatgct gatttatatg	2760
ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg	2820
ggaagcccg tgcccgagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg	2880
ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca	2940
agcattttat cgtactcct gatgatgcat ggttactcac cactgcgac cccgggaaaa	3000
cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatattgtt gatgcgctgg	3060
cagtgttct gcgcgggtt cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc	3120
gcgtatttcg tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg	3180

ES 2 758 096 T3

atattgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataagc	3240
ttttgccatt ctcaccggat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt gataacctta	3300
tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga atcgagagacc	3360
gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcggtga gttttctcct tcattacaga	3420
aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt	3480
tgatgctoga tgagttttct taatcagaat tggtaattg gttgtaacac tggcagagca	3540
ttacgctgac ttgacgggac ggcggctttg ttgaataaat cgaacttttg ctgagttgaa	3600
ggatcagatc acgcatcttc ccgacaacgc agaccgttcc gtggcaaagc aaaagttcaa	3660
aatcaccaac tgggtccact acaacaaagc tctcatcaac cgtgggtccc tcactttctg	3720
gctggatgat ggggcgattc aggcctggtg tgagtcagca acaccttctt cagcagcgag	3780
acctcagcgc tcaaagatgc aggggtaaaa gctaaccgca tctttaccga caaggcatcc	3840
ggcagttcaa cagatcgga agggctggat ttgctgagga tgaagggtga ggaaggatg	3900
gtcattctgg tgaagaagct cgaccgtctt ggcgcgaca ccgccgacat gatccaactg	3960
ataaaagagt ttgatgctca ggggtgtagc gttcggttta ttgacgacgg gatcagtagc	4020
gacggtgata tggggcaaat ggtggtcacc atcctgtcgg ctgtggcaca ggctgaacgc	4080
cggaggatca agtcgggtcaa gccaaagcga accagcggca ccgccgag caacgtcgca	4140
agggcgatca ggggacgatt tttgcgaaga atttcacgg taagaatcca atctctcgaa	4200
tttaggggtga aagaagcttg gcataggggt gtgcacgaac tcggtggagg aaatttccgc	4260
ggggcaaggc ttgcggaagc ggagtcggg cagtggcttt gaagatcttt gggagcagtc	4320
cttgtgcgt tactgaggtga gccggtggg aaccgttatc tgcctatggt gtgagcccc	4380
ctagagagct tcaagagcaa tcagcccgac ctagaagga ggccaagaga gagacccta	4440
cggggggaac cgttttctgc ctacgagatg gcacatttac tgggaagctt tacggcgtcc	4500
tcgtggaagt tcaatgccc cagacttaag tgctctattc acggtctgac gtgacacgt	4560
aaattcagac atagcttcat tgattgtcgg ccacgagcca gtctctccct caacagtc	4620
aaaccaacct gcaatggtca agcgatttcc tttagcttct ctagcttgct gttgactgga	4680
cttagctagt ttttctcgct gtgctcgggc gtactactg tttgggtctt tccagcgttc	4740
tgcggccttt ttaccgccac gtcttcccat agtggccaga gcttttcgcc ctgggtgct	4800
ctgctctct gtctgacgag cagggacgac tggtggcct ttagcgacgt agccgcgcac	4860
acgtcgcgcc atcgtctggt ggtcacgcat cggcggcaga tcaggctcac ggccgtctgc	4920
tccgaccgcc tgagcgacgg tgtaggcag ctcgtaggcg tcgatgatct tgggtgtctt	4980
taggcgtca ccagccgctt ttaactggta tcccacagtc aaagcgtggc gaaaagccgt	5040

ES 2 758 096 T3

etcatcacgg ggggcacgcc ctggagcagt ccagaggaca cggacgccgt cgtacagctc 5100
 tccagacgct tcagcggcgc tcggcaggct tgcttcaagc gtggcaagtg cttttgcttc 5160
 cgcagtggct tttcttgccg cttcgatacg tgcccgccg ctagaaaact cctgctcata 5220
 gcgtttttta ggtttttctg tgccctgagat catgcgagca acctccataa gatcagctag 5280
 gcgatccacg cgattgtgct gggcatgccg gcggtacgcg gtgggacgtg cggagacgtg 5340
 cagtggccac cggctcagcc tatgtgaaaa agcctggtca gcgccgaaaa cgcgggtcat 5400
 ttccctcggtc gttgcagcca gcaggcgcgt attcgggctg ctcatgcctg ctgcggcata 5460
 caccggatca atgagccaga tgagctggca tttcccgctc agtggattca cgcgatcca 5520
 agctggcgct tttccaggc gtgcccagcg ctccaaaatc gcgtagacct cggggtttac 5580
 gtgctcgatt tttcccgccg cctggtggct cggcacatca atgtccagga caagcacggc 5640
 tgctgctgc gcgtgcgtca gagcaacata ctggcaccgg gcaagcgatt ttgaaccaac 5700
 tcggtataac ttcggctgtg tttctcccggt gtccgggtct ttgatccaag cgtggcgaa 5760
 gtgcggggtc ttgctgccc ggaaattttc tctgccagg tgagcgagga attcggggcg 5820
 gtcttcgctc gtccagccac gtgatcgag cgcgagctcg ggtgggtgt cgaacagatc 5880
 agcgaaaaat ttcaggccg gtgtgtcaat gtctcgtgaa tccgctagag tcatttttga 5940
 gcgctttctc ccaggtttgg actgggggtt agccgacgcc ctgtgagtta ccgtcacgg 6000
 ggcgttcaac atttttcagg tattcgtgca gcttatcgct tcttgccgcc tgtgcgcttt 6060
 ttcgacggc gacgtgctg ccgattcgggt gcagggtgtg gcggcgctga cactgctgg 6120
 gcggccacgg ccacacgaaa cggggcattt acgatgtttg tcatgcctgc gggcaccgcg 6180
 ccacgatcgc ggataattct cgtgcctgt tccagctctg tgacgacct ggccaaaatt 6240
 tcgctcgggg gacgcacttc cagcgccatt tgcgacctag ccgcctccag ctctcggcg 6300
 tggcgtttgt tggcgcgctc gcggctggct gcggcacgac acgcatctga gcaatatttt 6360
 gcgcgccgtc ctgcgggtc aggcggggga ggaatcaggc caccgcagta ggcgcaactg 6420
 attcgatcct ccaactactgt gcgtctcct gcgctgccc agcacgcagc tcgtcagcca 6480
 gctctcaag atccgccacg agagtttcta ggtcgtcgc ggcactggcc cagtctcgtg 6540
 atgctggcgc gtccgtcgta tcgagagctc ggaaaaatcc gatcacctt tttaaatcga 6600
 cggcagcatc gagecgctcg gactccagcg cgacatcaga gagatccata gctgatgatt 6660
 cgggccaatt ttggtacttc gtctgaagg tcatgacacc attataacga acgttcgtta 6720
 aagtttttg cggaataatca cgcggcacga aaattttcac gaagcgggac tttgcgcagc 6780
 tcaggggtgc taaaaatttt gtatcgact tgatttttcc gaaagacaga ttatctgcaa 6840
 acggtgtgct gtatttctgg ctggttttt aaaaaatctg gaatcgaaaa tttcgggg 6900
 gaccgagaag ttttttaciaa aaggcaaaaa ctttttcggg atcgacagaa ataaaacgat 6960
 cgacggtagc caacaaaaaa gcgtcaggat cgcgtagag cgattgaaga ccgtcaacca 7020
 aaggggaagc ctccaatcga cgcgacgcgc gctctacggc gatcctgacg cagattttta 7080
 gctatctgtc gcagcgcct cagggacaag ccaccgcac aacgtcgcga gggcgatcag 7140
 cgacgccgca ggg 7153

<211> 7060
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia de ADN de plásmido pSen1325

<400> 36

```

ggatccttat tacttgtaca gtcggtccat gccgagagtg atcccggcgg cggtcacgaa      60
ctccagcagg accatgtgat cgcgcttctc gttgggggtct ttgctcaggg cggactggta      120
gctcaggtag tggttgtcgg gcagcagcac ggggccgctc ccgatggggg tgtcttgctg      180
gtagtggtcg gcgagctgca cgctgccgcc ctcgatgttg tggcggatct tgaagtccac      240
cttgatgccg ttcttctgct tgtcggccat gatatagacg ttgtggctgt tgtagttgta      300
ctccagcttg tgcccagga tgttgccgtc ctccctgaag ttgatgccct tcagctcgat      360
gcggttcacc aggggtgtcg cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt agttgccgtc      420
gtccttgaag aagatggtgc gtcctgggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa      480
gtcgtgctgc ttcattgtgt cggggtagcg ggcgaagcac tgcaggccgt agccgaagggt      540
ggtcacgagg gtgggccagg gcacgggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggt      600
cagcttgccg taggtggcat cgcctcgcc ctgcgcggac acgctgaact tgtggccgtt      660
tacgtcgccg tccagctcga ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct cctcgccctt      720
gctcaccata tgatatctcc ttcttctaac cagcgacgcc gccgatccat ttgtcgggtg      780
tgcttcgggc gagtcgtcga gattgtgctg ggaaagtcat cgggatcaag ctcccttatg      840
gctgattgag tttttctttc ttcttcaatc atcgccaata agaacctaga gcacatcggg      900
gatttccctt ctctaacc ctaaaaacc ctgagaaaac gtcctaagta aacccttaca      960
gctcgtcgac ctgcagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt     1020
actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca     1080
cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg ttattgctg ataaatctgg agccggtgag     1140
cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta     1200
gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag     1260
ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt     1320
    
```

ES 2 758 096 T3

tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	1380
aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agacccctta	1440
ataagatgat	cttcttgaga	tcgttttggt	ctgcgcgtaa	tctcttgctc	tgaaaacgaa	1500
aaaaccgcct	tgcaggcggg	tttttcgaag	gttctctgag	ctaccaactc	tttgaaccga	1560
ggtaactggc	ttggaggagc	gcagtcacca	aaacttgctc	tttcagttta	gccttaaccg	1620
gcgcagtact	tcaagactaa	ctcctctaaa	tcaattacca	gtggctgctg	ccagtgggtc	1680
ttttgcatgt	ctttccgggt	tggactcaag	acgatagtta	cgggataagg	cgcagcggtc	1740
ggactgaacg	gggggttcgt	gcatacagtc	cagcttggag	cgaactgcct	acccggaact	1800
gagtgctcag	cgtggaatga	gacaaacgcg	gccataacag	cggaaatgaca	ccggtaaacc	1860
gaaaggcagg	aacaggagag	cgcacgaggg	agccgccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1920
atagtcctgt	cgggtttcgc	caccactgat	ttgagcgtca	gatttcgtga	tgcttgctag	1980
gggggcggag	cctatggaaa	aacggctttg	ccgcggccct	ctcacttccc	tgtaagtat	2040
cttcctggca	tottccagga	aatctccgcc	ccgttcgtaa	gccatttccg	ctgcgcgag	2100
tcgaacgacc	gagcgtagcg	agtcagttag	caggaagcgc	gaatatatcc	tgatcacat	2160
attctgctga	cgcaccgggt	cagccttttt	tctcctgcc	catgaagcac	ttcactgaca	2220
ccctcatcag	tgccaacata	gtaagccagt	atacactccg	ctagcgtga	ggtctgcctc	2280
gtgaagaagg	tgttgctgac	tcataccagg	cctgaatcgc	cccatcatcc	agccagaaa	2340
tgaggagacc	acggttgatg	agagctttgt	tgtaggtgga	ccagttgggt	atthtgaact	2400
tttgctttgc	cacggaaacg	tctgcgttgt	cgggaagatg	cgtgatctga	tccttcaact	2460
cagcaaaaagt	tcgatttatt	caacaaaagc	acgttgtgtc	tcaaaatctc	tgatgttaca	2520
ttgcacaaga	taaaaatata	tcacatgaa	caataaaaact	gtctgcttac	ataaacagta	2580
atacaagggg	tgttatgagc	catattcaac	gggaaacgtc	ttgctcgagg	ccgcgattaa	2640
attccaacat	ggatgctgat	ttatatgggt	ataaatgggc	tcgcgataat	gtcgggcaat	2700
cagggtgcgac	aatctatcga	ttgtatggga	agcccgatgc	gccagagttg	tttctgaaac	2760
atggcaaagg	tagcgttgcc	aatgatgtta	cagatgagat	ggtcagacta	aactggctga	2820
cggaaatttat	gcctcttccg	accatcaagc	atthttatccg	tactcctgat	gatgcattgt	2880
tactcaccac	tgcatccccc	gggaaaacag	cattccaggt	attagaagaa	tatcctgatt	2940
caggtgaaaa	tattgttgat	gcgctggcag	tgthcctgcg	ccggttgcat	tcgattcctg	3000
tttgtaattg	tccttttaac	agcgatcgcg	tatttcgtct	cgtcaggcgc	caatcacgaa	3060
tgaataaacg	tttggttgat	gcgagtgatt	ttgatgacga	gcgtaatggc	tggcctgttg	3120
aacaagtctg	gaaagaaatg	cataagcttt	tgccattctc	accggattca	gtcgtcactc	3180
atggtgattt	ctcacttgat	aaccttattt	ttgacgaggg	gaaattaata	ggttgatttg	3240

ES 2 758 096 T3

atgttgagcg agtcggaatc gcagaccgat accaggatct tgccatccta tggaactgcc	3300
tcggtgagtt ttctccttca ttacagaaac ggctttttca aaaatatggg attgataatc	3360
ctgatatgaa taaattgcag ttctatttga tgctcgatga gtttttctaa tcagaattgg	3420
ttaattgggt gtaacactgg cagagcatta cgctgacttg acgggacggc ggctttgttg	3480
aataaatoga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg acaacgcaga	3540
ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg tccacctaca acaaagctct	3600
catcaacogt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg cctggtatga	3660
gtcagcaaca ctttcttcac gaggcagacc tcagcgctca aagatgcagg ggtaaaagct	3720
aaccgcatct ttaccgacaa ggcacccggc agttcaacag atcgggaagg gctggatttg	3780
ctgaggatga aggtggagga aggtgatgtc attctgggtga agaagctcga ccgtcttggc	3840
cgcgacaccg ccgacatgat ccaactgata aaagagtttg atgctcaggg tgtagcgggt	3900
cggtttattg acgacgggat cagtaccgac ggtgatatgg ggcaaatggg ggtcaccatc	3960
ctgtcggctg tggcacaggc tgaacgccgg aggatcaagt cggcgaagcc aagcgcaacc	4020
agcggcaccg ccgcgagcaa cgctcgaagg gcgatcaggg gacgattttt gcgaagaatt	4080
tccacggtaa gaatccaatc tctcgaattt aggggtgaaag aagcttggca taggggtgtg	4140
cacgaactcg gtggaggaaa tttccgcggg gcaaggcttc gcgaagcggg gtgcggcgag	4200
tggctttgaa gatctttggg agcagtcctt gtgcgcttac gaggtgagcc ggtggggaac	4260
cgttatctgc ctatggtgtg agcccccta gagagcttca agagcaatca gcccgacct	4320
gaaaggaggc caagagagag acccctacgg ggggaaccgt tttctgccta cgagatggca	4380
catttactgg gaagctttac ggcgtcctcg tggaagttca atgcccgag acttaagtgc	4440
tctattcacg gtctgacgtg acacgctaaa ttcagacata gcttcattga ttgtcggcc	4500
cgagccagtc tctccctcaa cagtcataaa ccaacctgca atggtcaagc gatttccttt	4560
agctttccta gcttgtcgtt gactggactt agctagtttt tctcgtctgt ctogggcgta	4620
ctcactgttt ggtcttttc agcgttctgc ggccttttta ccgccacgtc tcccatagt	4680
ggccagagct tttcgccctc ggctgctctg cgtctctgtc tgacgagcag ggacgactgg	4740
ctggccttta gcgacgtagc cgcgcacacg tcgcgccatc gtctggcggg cagcatcg	4800
cggcagatca ggctcacggc cgtctgctcc gaccgcctga gcgacggtgt aggcacgtc	4860
gtaggcgtcg atgatcttgg tgtcttttag gcgctacca gccgctttta actggtatcc	4920
cacagtcaaa gcgtggcgaa aagccgtctc atcacgggag gcacgccctg gagcagtcca	4980
gaggacacgg acgcgctcga tcagctctcc agacgcttca gcggcgctcg gcaggcttgc	5040
ttcaagcgtg gcaagtgcct ttgcttcgc agtggtcttt cttgcgcgtt cgatacgtgc	5100

ES 2 758 096 T3

```

ccgtccgcta gaaaactcct gctcatagcg ttttttaggt ttttctgtgc ctgagatcat 5160
gcgagcaacc tccataagat cagctaggcg atccacgcga ttgtgctggg catgccagcg 5220
gtacgcgggtg ggatcgctcg agacgtgcag tggccaccgg ctccagcctat gtgaaaaagc 5280
ctggtcagcg ccgaaaaagc gggtcatttc ctcggtcggt gcagccagca ggcgcattat 5340
cgggctgctc atgcctgctg cggcatacac cggatcaatg agccagatga gctggcattt 5400
cccgcctcagt ggattcacgc cgatccaagc tggcgctttt tccaggcggtg cccagcgctc 5460
caaaatcgcg tagacctcg ggtttactgt ctcgattttc ccgccggcct ggtggctcgg 5520
cacatcaatg tccaggacaa gcacgggtgc gtgctgcgcg tgcgtcagag caacatactg 5580
gcaccgggca agcgattttt aaccaactcg gtataacttc ggctgtgttt ctcccgctgc 5640
cgggctctttg atccaagcgc tggcgaagtc gcgggtcttg ctgccctgga aattttctct 5700
gcccaggtga gcgaggaatt cgcggcggtc ttgctcgtc cagccacgtg atcgcagcgc 5760
gagctcggga tgggtgtcga acagatcagc ggaaaatttc caggccgggtg tgtcaatgtc 5820
tcgtgaatcc gctagagtca tttttgagcg ctttctccca ggtttggact gggggttagc 5880
cgacgccctg tgagttaccg ctcccggggc gttcaacatt tttcaggtat tcgtgcagct 5940
tatcgcttct tgccgcctgt gcgctttttc gacgcgcgac gctgctgcgc attcggtgca 6000
ggtggtggcg gcgctgacac gtccctggcg gccacggcca cagcaaacgc ggcatttacg 6060
atgtttgtca tgccctcggg caccgcgcca cgatcgcgga taattctcgc tgccgcttcc 6120
agctctgtga cgaccatggc caaaatttcg ctcgggggac gcaottccag cgcattttgc 6180
gacctagccg cctccagctc ctggcggtgg cgtttgttgg cgcgctcgcg gctggctgcg 6240
gcacgacacg catctgagca atattttgcg cgcgctcctc gcgggtcagg ccggggagga 6300
atcaggccac cgcagtaggc gcaactgatt cgatcctcca ctactgtgcg tcctcctggc 6360
gctgccgagc acgcagctcg tcagccagct cctcaagatc cggccagaga gtttctaggt 6420
cgctcgcggc actggcccag tctcgtgatg ctggcgcgtc cgtcgtatcg agagctcgga 6480
aaaatccgat caccgttttt aaatcgacgg cagcatcgag cgcgtcggac tccagcgcca 6540
catcagagag atccatagct gatgattcgg gccaattttg gtacttcgtc gtgaaggcca 6600
tgacaccatt ataacgaacg ttcgttaaag tttttggcgg aaaatcacgc ggcacgaaaa 6660
ttttcacgaa gcgggacttt gcgcagctca ggggtgctaa aaattttgta tcgcacttga 6720
tttttcgaa agacagatta totgcaaacg gtgtgtcgta tttctggctt ggtttttaa 6780
aaatctggaa tcgaaaaatt gcggggcgac cgagaagttt ttacaaaaag gcaaaaactt 6840
tttcgggatc gacagaaata aaacgatcga cggtagcga caaaaaagcg tcaggatcgc 6900
cgtagagcga ttgaagaccg tcaaccaaag gggaagcctc caatcgacgc gacgcgcgct 6960
ctacggcgat cctgacgcag attttttagct atctgtcgca gcgccctcag ggacaagcca 7020
ccgcgacaa gtcgcgaggg cgatcagcga cgccgcaggg 7060

```

5
 <210> 37
 <211> 7561
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de ADN de plásmido pSen0996_8

ES 2 758 096 T3

<400> 37

ccctgcggcg tcgctgatcg ccctcgcgac gttgtgcggg tggcttgtec ctgagggcgc	60
tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgtc gcgtcgattg	120
gaggttccc ctttggttga cggctctcaa tcgctctacg gcgatcctga cgcttttttg	180
ttgcgtaccg tcgatcgttt tatttctgtc gatcccgaaa aagtttttgc cttttgtaaa	240
aaacttctcg gtcgccccgc aaattttcga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa	300
tacgacacac cgtttgacaga taatctgtct ttccgaaaaa tcaagtgcga tacaaaattt	360
ttagcacccc tgagctgcgc aaagtccgcg ttctgtgaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt	420
ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatgggtgtca tgaccttcac gacgaagtac	480
caaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg	540
ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggtattt tccgagctct cgatacgacg	600
gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg	660
gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggcagc gccaggagga cgcacagtag	720
tggaggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgacccgc	780
gaggacggcg cgcaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg	840
ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggttaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc	900
gtcccccgag cgaaattttg gccatggctg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta	960
tccgcgatcg tggcgcggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaatgcc gcgtttcgtg	1020
tggccgtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc	1080
gtcgcgcgtc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa	1140
aatgttgaac gcccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccccc agtccaaacc	1200
tgggagaaag cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg	1260
gaaattttcc gctgatctgt tcgacacca tcccgagctc gcgctcgat cacgtggctg	1320
gacgagcgaa gaccgccgcg aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag	1380
caagacccgc gacttcgcca gcgcttgat caaagacccg gacacgggag aaacacagcc	1440
gaagttatac cgagttggtt caaaatcgct tgcccgggtc cagtatgttg ctctgacgca	1500

ES 2 758 096 T3

cgcgagcac gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggcgggagg 1560
 gaaaatcgag cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgctggg cagccctgga 1620
 aaaagcgcca gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcactctggct 1680
 cattgatccg gtgtatgccg cagcagccat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc 1740
 aacgaccgag gaaatgaccc gcgttttcgg cgtgaccag gctttttcac ataggctgag 1800
 ccggtggcca ctgcacgtct ccgacgatcc caccgcgtac cgtggcatg cccagcacia 1860
 tcgctgggat cgcctagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 1920
 acctaaaaaa cgctatgagc aggagttttc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 1980
 aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cagccttgaa gcaagcctgc cgagcgccgc 2040
 tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtcttc tggactgctc cagggcgtgc 2100
 cgcccgatg gagacggctt ttgcgcacgc tttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 2160
 tggtagcggc ctaaaagaca ccaagatcat cgacgcctac gagcgtgcct acaccgtcgc 2220
 tcagcggtgc ggagcagacg gcgctgagcc tgatctgccg ccgatgcgtg accgccagac 2280
 gatggcgcca cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 2340
 gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
 taaaaaggcc gcagaacgct ggaaagaccc aaacagttag tacgcccagc cacagcgaga 2460
 aaaactagct aagtcacgtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 2520
 tgcaggtttg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgaaa tcaatgaagc 2580
 tatgtctgaa tttagcgtgt cagctcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
 tgaacttcca cgaggacgcc gtaaagcttc ccagtaaatg tgccatctcg taggcagaaa 2700
 acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gcctccttc taggtcgggc tgattgctct 2760
 tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg gttccccacc ggctcacctc 2820
 gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgcgcgac tccgcttcgc 2880
 gaagccttgc ccgcggaaa ttctctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 2940
 ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 3000
 ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcgg ccgtgcgcgt ggttgcgctt ggcttgaccg 3060
 acttgatcct ccggcgttca gcctgtgcca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
 ccataccacc gtcggtaact atcccgtcgt caataaaccc aaccgctaca ccctgagcat 3180
 caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg ccgtgtcgcg gccaaagacg tcgagcttct 3240
 tcaccagaat gacatcacct tcctccacct tcactctcag caaatccagc ccttcccgat 3300
 ctgttgaaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcatctt 3360
 tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420

ES 2 758 096 T3

cccatcatcc agccagaaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga 3480
 ccagttggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg 3540
 cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt 3600
 caagtacgag taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
 tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt 3720
 tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggacagttcca taggatggca 3780
 agatcctggt atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840
 ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagttag aaatcaccat gagtgaagac tgaatccggt 3900
 gagaatggca aaagcttatg cattttcttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 3960
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa cggttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 4020
 agacgaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaaatga atgcaaccgg 4080
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 4140
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 4200
 cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
 gcacggggt tcccatataa tcgatagatt gtgcacctg attgcccagc attatcgca 4380
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa 4440
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
 agttttattg ttcgatgatg tatattttta tctgtgcaa tgtaacatca gagattttga 4560
 gacacaacgt ggctttgtg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg 4620
 catcttccc acaacgcaga ccgttcctg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg 4680
 tccacctaca acaaagctct catcaacggt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
 gcgattcagg cctggtatga gtcagcaaca cttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
 cggagtgtat actggcttac tatgttggca ctgatgaggg tgcagtga gtgcttcag 4860
 tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920
 cgcttcctcg ctcaactgact cgctacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 4980
 ttacgaacgg gccggagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagttag 5040
 agggcccgcg caaagccgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
 tgacgctcaa atcagtgggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5160
 cctggcggtt ccctcgtgag ctctcctggt cctgcctttc gggttaccgg tgteattccg 5220
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280

ES 2 758 096 T3

ctccaagctg	gactgtatgc	acgaaccccc	cgttcagtc	gaccgctgcg	ccttatccgg	5340
taactatcgt	cttgagtcca	acccggaaa	acatgcaaaa	gcaccactgg	cagcagccac	5400
tggtaatga	tttagaggag	ttagtcttga	agtcatgcgc	cggttaaggc	taaactgaaa	5460
ggacaagttt	tggtgactgc	gtcctcccaa	gccagttacc	tcggttcaaa	gagttggtag	5520
ctcagagAAC	cttcgaaaaa	ccgccctgca	aggcggtttt	ttcgttttca	gagcaagaga	5580
ttacgcgcag	acaaaaacga	tctcaagaag	atcatcttat	taaggggtct	gacgctcagt	5640
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	5700
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	5760
ggctctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	5820
gttcacccat	agttgcctga	ctccccctcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggccttac	5880
catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	5940
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaaggcccg	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	6000
cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	6060
gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctgcag	gtcgaccatg	cgcggttccc	agtgggaaggc	6120
cgacaatgtc	gcccttcagg	aggtaagat	cgacggtcag	accgttcgca	tcccacgccg	6180
tctggttaag	gcagcacagc	tcggctctcg	ggacgtagag	cagttctaaa	ccttaaattc	6240
atcgcttaca	accttttgta	ggtaagaatt	taacaagagc	cagttatctt	ctcttaaaat	6300
gaggaggtaa	ctggcttctt	tatgcttaag	agggtgttagc	ataagtgaaa	tatgttccaa	6360
cgcgtggacg	tcttaattgg	gaggaagtct	gtcaccgact	ggaagacgaa	aagggtatcg	6420
atgaaaattt	tagttgttga	tgcagagcaa	gctgtacgtt	aatctatcgc	gccgtcagct	6480
cccgttccat	gccgggatcg	ggattaggtc	ttgccatcgt	gaatcaggtt	gtgaatccgc	6540
atgggtggcca	actcgttggt	ggtgaatcag	atgatggcgg	aacgagaatc	actattgatt	6600
tgccagggga	accatttcgc	agcgggttcg	aaaatgtcga	tgattaaggt	accaccacta	6660
aagagctcac	aggaagtgtt	cagactactt	agagtgcgc	cccagccaca	gggttcataa	6720
tcaaatcatg	acaaatcaat	tccccacaaa	caacggtgag	aaccgggacc	gtgcatcgga	6780
aactccatca	gaaaccaact	ccggtacctg	aactttaaga	aggagatata	atatgggtgag	6840
caagggcgag	gagctgttca	ccgggggtgg	gcccatcctg	gtcgagctgg	acggcgacgt	6900
aaacggccac	aagttcagcg	tgtccggcga	gggcgagggc	gatgccacct	acggcaagct	6960
gacctgaag	ttcatctgca	ccacggcga	gtgcccgtg	ccctggccca	ccctcgtgac	7020
caccttcggc	tacggcctgc	agtgtctcgc	ccgctacccc	gaccacatga	agcagcacga	7080
cttcttcaag	tccgccatgc	ccgaaggcta	cgtccaggag	cgcaccatct	tcttcaagga	7140
cgacggcaac	tacaagaccc	gcgcgaggt	gaagttcgag	ggcgacaccc	tggtgaaccg	7200

ES 2 758 096 T3

catcgagctg aagggcatca acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga	7260
gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa	7320
ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggggggcagc gtgcagctcg ccgaccacta	7380
ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag	7440
ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga	7500
gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aataaggatc	7560
c	7561

<210> 38
 <211> 7102
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de ADN de plásmido pSen0996_8c

<400> 38

ccctgcggcg tcgctgatcg ccctcgcgac gttgtgcggg tggcttgctc ctgagggcgc	60
tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgct gcgtcgattg	120
gaggcttccc ctttggttga cggcttcaa tcgctctacg gcgatcctga cgttttttg	180
ttgcgtaccg tcgatcgttt tatttctgtc gatccgaaa aagtttttgc cttttgtaaa	240
aaacttctcg gtcgccccgc aaattttcga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa	300
tacgacacac cgtttgcaga taatctgtct ttcggaaaaa tcaagtgcga taaaaattt	360
ttagcacccc tgagctgcgc aaagtccgc ttcgtgaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt	420
ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatgggtgtca tgaccttcac gacgaagtac	480
caaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtccgacgcg	540
ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggtttt tccgagctct cgatacgacg	600
gacgcgccag catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg	660
gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggcagc gccaggagga cgcacagtag	720
tggaggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgacccgc	780
gaggacggcg cgcaaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg	840
ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggttaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc	900
gtcccccgag cgaaattttg gccatggctg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta	960
tccgcgatcg tggcgcggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaatgcc gcgtttcgtg	1020
tggccgtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc	1080
gtcgcgcgctc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa	1140

ES 2 758 096 T3

aatgttgaac	gccccgtgag	cggttaactca	cagggcgctcg	gctaaccccc	agtccaaacc	1200
tgggagaaaag	cgctcaaaaa	tgactctagc	ggattcacga	gacattgaca	caccggcctg	1260
gaaattttcc	gctgatctgt	tcgacaccca	tcccagagctc	gcgctgcgat	cacgtggctg	1320
gacgagcgaa	gaccgcccgc	aattcctcgc	tcacctgggc	agagaaaatt	tccagggcag	1380
caagaccgcg	gacttcgcca	gcgcttggt	caaagaccgc	gacacgggag	aaacacagcc	1440
gaagttatac	cgagttgggt	caaaatcgct	tgcccgggtgc	cagtatgttg	ctctgacgca	1500
cgcgcagcac	gcagccgtgc	ttgtcctgga	cattgatgtg	cagagccacc	aggccggcgg	1560
gaaaatcgag	cacgtaaacc	cagaggtcta	cgcgattttg	gagcgctggg	cacgcctgga	1620
aaaagcgcca	gcttggtatcg	gcgtgaatcc	actgagcggg	aaatgccagc	tcctctggct	1680
cattgatccg	gtgtatgccg	cagcagccat	gagcagcccg	aatatgcgcc	tgctggctgc	1740
aacgaccgag	gaaatgaccc	gcgttttcgg	cgctgaccag	gctttttcac	ataggctgag	1800
ccggtggcca	ctgcacgtct	ccgacgatcc	caccgcgtac	cgctggcatg	cccagcacia	1860
tcgcgtggat	cgcctagctg	atcttatgga	ggttgctcgc	atgatctcag	gcacagaaaa	1920
acctaaaaaa	cgctatgagc	aggagttttc	tagcggacgg	gcacgtatcg	aagcggcaag	1980
aaaagccact	gcggaagcaa	aagcacttgc	cacgcttgaa	gcaagcctgc	cagcgcgcgc	2040
tgaagcgtct	ggagagctga	tcgacggcgt	ccgtgtcctc	tggactgctc	cagggcgctgc	2100
cgcctgtgat	gagacggctt	ttcgccacgc	tttgactgtg	ggataccagt	taaaagcggc	2160
tggtgagcgc	ctaaaagaca	ccaagatcat	cgacgcctac	gagcgtgcct	acacgcctgc	2220
tcagcgggtc	ggagcagacg	gcgctgagcc	tgatctgccg	ccgatgcgtg	accgccagac	2280
gatggcgcga	cgtgtgcgcg	gctacgtcgc	taaaggccag	ccagtcgtcc	ctgctcgtca	2340
gacagagacg	cagagcagcc	gagggcgaaa	agctctggcc	actatgggaa	gacgtggcgg	2400
taaaaaggcc	gcagaacgct	ggaaagaccc	aaacagttag	tacgcccag	cacagcgaga	2460
aaaactagct	aagtccagtc	aacgacaagc	taggaaagct	aaaggaaatc	gcttgaccat	2520
tgacggttgg	tttatgactg	ttgagggaga	gactggctcg	tggccgacaa	tcaatgaagc	2580
tatgtctgaa	tttagcgtgt	cacgtcagac	cgtgaataga	gcacttaagt	ctgcgggcat	2640
tgaacttcca	cgaggacgcc	gtaaagcttc	ccagtaaattg	tgccatctcg	taggcagaaa	2700
acggttcccc	ccgtaggggt	ctctctcttg	gcctcctttc	taggtcgggc	tgattgctct	2760
tgaagctctc	tagggggggt	cacaccatag	gcagataaac	gttccccacc	ggctcacctc	2820
gtaagcgcac	aaggactgct	cccaaagatc	ttcaaagcca	ctgccgcgac	tccgcttcgc	2880
gaagccttgc	cccgcggaaa	tttcctccac	cgagttcgtg	cacaccctta	tgccaagctt	2940
ctttcacccct	aaattcgaga	gattggattc	ttaccgtgga	aattcttcgc	aaaaatcgtc	3000
ccctgatcgc	ccttcgcagc	ttgctcgcgg	cgggtgccgt	ggttgcgctt	ggcttgaccg	3060

ES 2 758 096 T3

acttgatcct ccggcggttca gcctgtgcc aagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
ccatatcacc gtcggtactg atcccgctgt caataaaccg aaccgctaca ccctgagcat 3180
caaaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgggtgtcgcg gccaaagacgg tcgagcttct 3240
tcaccagaat gacatcacct tcctccacct tcatcctcag caaatccagc ccttcccgat 3300
ctggtgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcatctt 3360
tgagcgtga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420
cccatcatcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagcttgtg tgtaggtgga 3480
ccagttggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg 3540
cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt 3600
caagtcaagg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
tcacgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatattt 3720
tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca 3780
agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840
ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtga aaatcacat gagtgcgcac tgaatccggt 3900
gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc 3960
tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacaaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 4020
agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 4080
cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 4140
acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 4200
cggataaaat gcttgatggt cgggaagagg ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtgcacactg attgccgcac attatcgcga 4380
gccattttat acccatataa atcagcatcc atggttgaat ttaatgcgg cctcgagcaa 4440
gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
agttttattg ttcgatgatg tatattttta tcttggtgaa tgtaacatca gagattttga 4560
gacacaacgt ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg 4620
catcttcccg acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg 4680
tcacacctaca acaaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
gcgattcagg cctggtatga gtcagcaaca ccttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
cggagtgtat actggcttac tatgttgga ctgatgaggg tgtcagtgaa gtgcttcag 4860
tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920

ES 2 758 096 T3

cgcttcctcg ctactgact cgctacgctc ggtcggttcga ctgcggcgag cggaatggc 4980
 ttacgaacgg ggccgagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagtga 5040
 agggccggcg caaagccgtt ttcccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
 tgacgctcaa atcagtggcg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5160
 cctggcggtc ccctcgcgcg ctctcctgtt cctgccttcc ggtttacggg tgtcattccg 5220
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtcc gaccgctgcg ccttatccgg 5340
 taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 5400
 tggtaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cggttaaggg taaactgaaa 5460
 ggacaagttt tggtagctgc gtcctcccaa gccagttacc tcggttcaaa gaggtagtag 5520
 ctgagagaac cttcgaaaaa ccgcccgtca aggcgggttt ttcgttttca gagcaagaga 5580
 ttacgcgcag accaaaaaga tctcaagaag atcatcttat taaggggtct gacgctcagt 5640
 ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gaggtaactt 5760
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctgagcgatc tgtctatttc 5820
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 5880
 catctggccc cagtgcctga atgataccgc gagaccacg ctacccggct ccagatttat 5940
 cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg agcgcaagag tggctctgca actttatccg 6000
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
 gtttgcgcaa cgttggtgac attgctgcag gtcgacaatt taacaagagc cagttatctt 6120
 ctcttaaaat gaggaggtaa ctggcttctt tatgcttaag aggtggttagc ataagtga 6180
 tatgttccaa cgcgtggacg tcttaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacgaa 6240
 aagggtatcg atgtgaaccc attcgacgcg ggttcgaaaa tgcgatgat taaggtaacca 6300
 ccactaaaga gctcacagga agtggttcaga ctacttagag tgacgcccc gccacagggt 6360
 tcataatcaa atcatggtga gcaaggcgga ggagctgttc accgggggtg tgcccatcct 6420
 ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg 6480
 cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gttcatctgc accaccggca agctgccgt 6540
 gccctggccc accctcgta ccaccttgg ctacggcctg cagtgtctcg cccgtaccc 6600
 cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga 6660
 gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgcccagg tgaagttcga 6720
 gggcgacacc ctggtgaacc gcacgagct gaagggcac aacttcaagg aggacggcaa 6780
 catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga 6840
 caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg agggcggcag 6900
 cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct 6960
 gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc aaagaccca acgagaagcg 7020
 cgatcacatg gtctgctgg agttcgtgac cgccgcccgg atcactctcg gcattggacga 7080
 gctgtacaag taataaggat cc 7102

<210> 39
 <211> 9463
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de ADN de plásmido pSen0996_8e
 <400> 39

```

ccctgcggcg tcgctgatcg ccctcgcgac gttgtgcggg tggcttgtcc ctgagggcgc      60
tgcgacagat agctaaaaat ctgcgtcagg atcgccgtag agcgcgcgctc gcgtcgattg      120
gaggcttccc ctttggttga cggctctcaa tcgctctacg gcgatcctga cgcttttttg      180
ttgcgtaccg tcgatcgttt tatttctgtc gatcccga aaagtttttg cttttgtaaa      240
aaacttctcg gtcgccccgc aaattttcga ttccagattt tttaaaaacc aagccagaaa      300
tacgacacac cgtttgacaga taatctgtct ttccgaaaaa tcaagtgcga taaaaattt      360
ttagcaccac tgagctgcgc aaagtcgcgc ttctgaaaaa ttttcgtgcc gcgtgatttt      420
ccgccaaaaa ctttaacgaa cgttcgttat aatggtgtca tgacctcac gacgaagtac      480
caaaattggc ccgaatcatc agctatggat ctctctgatg tcgcgctgga gtcgcgacgcg      540
ctcgatgctg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggtattt tccgagctct cgatacgcgc      600
gacgcgcacg catcacgaga ctgggccagt gccgcgagcg acctagaaac tctcgtggcg      660
gatcttgagg agctggctga cgagctgcgt gctcggcagc gccaggagga cgcacagtag      720
tgagggatcg aatcagttgc gcctactgcg gtggcctgat tcctccccgg cctgacccgc      780
gaggacggcg cgcaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc cgcgagcgcg      840
ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctaggtc gcaaatggcg ctggaagtgc      900
gtcccccgag cgaaattttg gccatggctg tcacagagct ggaagcggca gcgagaatta      960
tccgcgatcg tggcgcggtg cccgcaggca tgacaaacat cgtaaagcc gcgtttcgtg     1020
tgcccggtggc cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc     1080
gtcgcgcgctc gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa     1140
aatgttgaac gcccgtgag cggtaactca cagggcgtcg gctaaccacc agtccaaacc     1200
tgggagaaag cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg     1260
    
```

ES 2 758 096 T3

gaaatthttcc gctgatctgt tcgacaccca tcccagagctc gcgctgcat cacgtggctg 1320
 gacgagcgaa gaccgcccgc aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag 1380
 caagacccgc gacttcgcca gcgcttgat caaagacccg gacacgggag aaacacagcc 1440
 gaagttatac cgagttggtt caaaatcgct tgcccgggtc cagtattgtt ctctgacgca 1500
 cgcgcagcac gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggcggcgcg 1560
 gaaaatcgag cacgtaaacc ccgaggctca cgcgattttg gagcgctggg caccgctgga 1620
 aaaagcgcca gcttgatcgc gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcactctggc 1680
 cattgatccg gtgtatgccg cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc 1740
 aacgaccgag gaaatgaccc gcgttttcgg cgtgaccag gctttttcac ataggctgag 1800
 ccggtggcca ctgcacgtct ccgacgatcc caccgcgtac cgtggcatg cccagcacia 1860
 tcgctgggat cgcctagctg atcttatgga ggttgctcgc atgatctcag gcacagaaaa 1920
 acctaaaaaa cgctatgagc aggagtthtc tagcggacgg gcacgtatcg aagcggcaag 1980
 aaaagccact gcggaagcaa aagcacttgc cagccttga gcaagcctgc cgagcgccgc 2040
 tgaagcgtct ggagagctga tcgacggcgt ccgtgtctc tggaactgctc cagggcgtgc 2100
 cgcctgtgat gagacggctt ttgcgcacgc ttgactgtg ggataccagt taaaagcggc 2160
 tggtagcgcc ctaaaagaca ccaagatcat cgcgcctac gagcgtgcct acacgctgc 2220
 tcagcggtgc ggagcagacg gccgtgagcc tgatctgccg ccgatgcgtg accgccagac 2280
 gatggcgcca cgtgtgcgcg gctacgtcgc taaaggccag ccagtcgtcc ctgctcgtca 2340
 gacagagacg cagagcagcc gagggcgaaa agctctggcc actatgggaa gacgtggcgg 2400
 taaaaaggcc gcagaacgct ggaaagaccc aaacagtgag tacgcccag cagacgaga 2460
 aaaactagct aagtcacgtc aacgacaagc taggaaagct aaaggaaatc gcttgaccat 2520
 tgcaggttg tttatgactg ttgagggaga gactggctcg tggccgaaa tcaatgaagc 2580
 tatgtctgaa tttagcgtgt cagctcagac cgtgaataga gcacttaagt ctgcgggcat 2640
 tgaacttcca cgaggacgcc gtaaagcttc ccagtaaag tgccatctcg taggcagaaa 2700
 acggttcccc ccgtaggggt ctctctcttg gcctccttc taggtcgggc tgattgctct 2760
 tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg gttccccacc ggctcacctc 2820
 gtaagcgcac aaggactgct cccaaagatc ttcaaagcca ctgccgcgac tccgcttcgc 2880
 gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacaccccta tgccaagctt 2940
 ctttcaccct aaattcgaga gattgattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgct 3000
 ccctgatcgc ccttgcgacg ttgctcgcgg cgggtgccgt ggttgcgctt ggcttgaccg 3060
 acttgatcct ccggcgttca gcctgtgcca cagccgacag gatggtgacc accatttgcc 3120
 ccatatcacc gtcggtactg atcccgtcgt caataaaccc aacgcgtaca ccctgagcat 3180

ES 2 758 096 T3

caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cgggtgtcgg gccaaagacgg tcgagcttct 3240
 tcaccagaat gacatcacct tcctccacct tcatcctcag caaatccagc ccttcccgat 3300
 ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc cctgcacctt 3360
 tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg cctgaatcgc 3420
 cccatcatcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt tgtaggtgga 3480
 ccagttggtg attttgaact ttgtctttgc cacggaacgg tctgcgttgt cgggaagatg 3540
 cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc gcogtccogt 3600
 caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac 3660
 tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatattt 3720
 tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca 3780
 agatcctggt atcggctctg gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc 3840
 ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgaogac tgaatccggt 3900
 gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc 3960
 tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg 4020
 agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg 4080
 cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata 4140
 acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta 4200
 cggataaaat gcttgatggt cgggaagagg ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc 4260
 atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc 4320
 gcatcgggct tcccatataa tcgatagatt gtgcacctg attgcccgac attatcgga 4380
 gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctcgagcaa 4440
 gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac 4500
 agttttattg ttcgatgatg tatattttta tcttggtcaa tgtaacatca gagattttga 4560
 gacacaacgt ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg 4620
 catcttccc acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaat caccaactgg 4680
 tccacctaca acaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg 4740
 gcgattcagg cctgggtatg gtcagcaaca ccttcttcac gaggcagacc tcagcgctag 4800
 cggagtgtat actggcttac tatgttgga ctgatgaggg tgtcagtga gtgcttcag 4860
 tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgataca ggatatattc 4920
 cgcttcctcg ctcaactgact cgctacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 4980
 ttacgaacgg gccggagatt tcctggaaga tgccaggaag atacttaaca gggaagttag 5040

ES 2 758 096 T3

agggccgcgg caaagccgtt ttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 5100
 tgacgctcaa atcagtgggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 5160
 cctggcgggt cctcgtgcg ctctcctgtt cctgccttcc ggtttaccgg tgtcattccg 5220
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 5280
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtcc gaccgctgcg ccttatccgg 5340
 taactatcgt cttgagtcca acccggaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 5400
 tggtaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgcgc cgtttaaggc taaactgaaa 5460
 ggacaagttt tggtgactgc gctcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gagttaggtag 5520
 ctcagagAAC cttcgaaaaa ccgcccgtca aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga 5580
 ttacgcgcag accaaaaaga tctcaagaag atcatcttat taagggtct gacgctcagt 5640
 ggaacgaaaa ctacggttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
 agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gaggtaaactt 5760
 ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagt aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc 5820
 gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataaac tacgatacgg gagggccttac 5880
 catctggccc cagtgtctga atgataccgc gagacccacg ctacccggct ccagatttat 5940
 cagcaataaa ccagccagcc ggaaggcccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg 6000
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
 gtttgccgaa cgttggtgcc attgctgcag gtgcaccatg cgcggttccc agtgggaaggc 6120
 cgacaatgtc gcccttcagg aggtcaagat cgacgggtcag accgttcgca tcccacgccg 6180
 tctggttaag gcagcacagc tcgggtctcgt ggacgtagag cagttctaaa ccttaaattc 6240
 atcgccctaca accttttgta ggtaagaatt taacaagagc cagttatctt ctcttaaaat 6300
 gaggaggtaa ctggcttctt tatgcttaag aggtgttagc ataagtgaa tatgttccaa 6360
 cgcgtggacg tottaattgg gaggaagtct gtcacggact ggaagacgaa aagggtatcg 6420
 atgaaaattt tagttgttga tgacgagcaa gctgtacgtg actccttgcg acgttccctt 6480
 tcgttcaacg gatacaacgt tgttctcgca gaagacggca tccaagcact agagatgatt 6540
 gacaaggaac agcctgcttt ggtgatcctc gatgtcatga tgcctggat ggacggactt 6600
 gaggtctgtc gccaccttcg cagcgaaggc gatgatcggc caattcttat tcttactgcc 6660
 cgcgataatg tttctgatcg tgttggtggc ctgatgcag gcgcagatga ctatttggtc 6720
 aaaccatttg ctcttgaaga gctgttggtc cgcgtccgtt cactgggtgcg tcgctctgca 6780
 gtggaatcaa atcagagttc cagcattgaa caggctctat tatcttgtgg cgatttgacg 6840
 cttgaccacg aaagtcgaga tgtctaccgc aacggacgcg ccacagcct tactcgaaca 6900
 gagttcgcgc tectgcaatt gctcctcaaa aaccaaagga aagtgtcac tcgcgccacg 6960

ES 2 758 096 T3

attttggaag aggtatgggg ctgctgatttc cccacttcag gcaatgccct cgaggtctac 7020
 attggatacc ttcgacgcaa gactgaattg gaaggagaag accgcctgat ccatacagta 7080
 cgaggagtcg gatacgtcct gcgagagacc gctccgtgac attaaggcga atcggcgag 7140
 gggaaaatgg gcctgcccct accgaaagtg atgactccga cgggtcaatg tcgttgcggtt 7200
 ggcgcttggc tttgctgagc gccactttgg tagctttcgc cgttggtggtt attactgttg 7260
 ctgcatattg gtctgtctcc agctatgtca ccaactcaat cgatcgtgat ctggaaaaac 7320
 aagcggatgc aatgcttgga cgagccagtg aagcgggatt ctatgcaacc gcagaaaccg 7380
 aaattgctct gttaggtgaa tatgccagtg aactcgaat cgccttaatc ccacctgggt 7440
 gggaatacgt catcgggtgaa tccatatcac tgccatgattc agatttcctt aagagtaaag 7500
 aagcggggaa acagatcctc gtaacaagtg ctgagcgcac tctcatgaaa cgagatagct 7560
 cgggcacagt ggtggttttt gctaaagata tgggtggatac cgatcggcag ctcacggtgc 7620
 ttggcgtcat tctcttgatc attggcggca gtggtgtttt ggcgtcgatt ctgcttggtt 7680
 tcatcattgc gaaggagggg ctgaaaccac tgtcaaagct gcagcgtgcc gtogaagaga 7740
 tcgaacgaac tgatgagctt cgtgcgattc ccgtggtggg aaatgatgag ttcgctaagt 7800
 tgactcgtag tttcaatgac atgctcaagg cactgcggga gtctcgtacc cggcaatctc 7860
 agttggtggc agatgcagga cagcagctga aaactccact gacctcaatg cggacaaaata 7920
 ttgaattgct gttgatggca accaacagtg gaggatcggg aatccccaag gaagaattgg 7980
 atggccttca gcgtgatgta ttggcgcaga tgaccgaaat gtctgatttg attggtgatc 8040
 ttgttgatct tgcgcgtgaa gaaaccgcg aaacgtcaag cattgtagat ctcaaccaag 8100
 tgtttgaaat tgcgcttgac cgaatggaaa gccgtcgcac gacggtgcgg atagatgttt 8160
 ccgagactgt ggattggaaa ctgctgggag atgatttttc cttaaccagg gcattagtaa 8220
 atgttttga taatgccatt aaatggtcgc ctgagaatgg cattgttcga gtgtcgatgt 8280
 cacagatoga caaagcaacg gtccgcattg ttattgatga ttcagggcct ggaattgctg 8340
 aaaaagaacg aggattagtt ttggaacggt tctatcgcgc cgtcagctcc cgttccatgc 8400
 cgggatcggg attaggtctt gccatcgtga atcaggttgt gaatcggcat ggtggccaac 8460
 tcgttggtgg tgaatcagat gatggcggaa cgagaatcac tattgatttg ccaggggaac 8520
 ccattcgcag cgggttcgaa aatgtcgatg attaaaccac taaagagctc acaggaagtg 8580
 ttcagactac ttagagtac gccccagcca cagggttcat aatcaaatca tgacaaatca 8640
 attccccaca aacaacggtg agaaccggga ccgtgcacgc gaaactccat cagaaaccaa 8700
 ctccggtacc tgaactttaa gaaggagata tcatatggtg agcaagggcg aggagctgtt 8760
 caccggggtg gtgcccaccc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag 8820

ES 2 758 096 T3

cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg	8880
caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccttcg gctacggcct	8940
gcagtgcctc gcccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat	9000
gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac	9060
ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcctcgagc tgaagggcat	9120
caacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca	9180
caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg	9240
ccacaacatc gagggcgga gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat	9300
cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agctaccagt ccgccctgag	9360
caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcgcggg	9420
gatcactctc ggcattggacg agctgtacaa gtaataagga tcc	9463

REIVINDICACIONES

1. Una célula microbiana que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre y que comprende una secuencia génica que codifica una proteína fluorescente, en la que la expresión de la proteína fluorescente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, en la que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de al menos un promotor heterólogo que, en la célula fuente, controla la expresión de un gen del cual la expresión en la célula fuente depende de la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.
2. La célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula es una célula del género *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Bacillus* o *Mycobacterium*.
3. La célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el promotor se selecciona entre el grupo que consiste en el promotor *cg0706* que tiene SEQ ID NO 01 o un promotor derivado del mismo, el promotor *cg0996* que tiene SEQ ID NO 02 o un promotor derivado del mismo, el promotor *cg0998* que tiene SEQ ID NO 03 o un promotor derivado del mismo, el promotor *cg1325* que tiene SEQ ID NO 04 o un promotor derivado del mismo, el promotor *htrA* que tiene SEQ ID NO 07 o un promotor derivado del mismo, el promotor *liaI* que tiene SEQ ID NO 09 o un promotor derivado del mismo y el promotor *mprA* que tiene SEQ ID NO 13 o un promotor derivado del mismo, en la que la expresión "promotor derivado del mismo" como se ha utilizado anteriormente comprende todos los ácidos nucleicos que son al menos un 70 % idénticos a la secuencias génicas mencionadas anteriormente, siendo la identidad, la identidad sobre la longitud total del ácido nucleico correspondiente.
4. La célula microbiana de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la secuencia génica que codifica la proteína fluorescente está bajo el control de una combinación del promotor *cg0996* que tiene SEQ ID NO 02 o un promotor derivado del mismo y el promotor *cg0998* que tiene SEQ ID NO 03 o un promotor derivado del mismo, en la que el promotor *cg0996* o el promotor derivado del mismo está situado cadena arriba del promotor *cg0998* o el promotor derivado del mismo.
5. Un método para la identificación de una célula microbiana que se **caracteriza por** una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular, comprendiendo el método las etapas:
 - α1) provisión de una suspensión celular que comprende células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;
 - α2) modificación genética de las células para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;
 - α3) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además la etapa del método: α4) separación de las células identificadas desde la suspensión celular.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la separación se realiza por medio de citometría de flujo.
8. Un método para la identificación de una célula microbiana que se **caracteriza por** una alta secreción de una proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico en una suspensión celular o para la identificación de una suspensión celular que comprende células que se **caracterizan por** una alta secreción de una proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:
 - β1) provisión de
 - i) una suspensión celular que comprende una pluralidad de células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las células en la suspensión celular difieren entre sí con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico,
 - o
 - ii) una pluralidad de suspensiones celulares, comprendiendo cada suspensión celular, células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;
 - β2) cultivo de diferentes células en la suspensión celular o de las diferentes suspensiones celulares de modo que las células produzcan la proteína deseada;
 - β3) identificación de células individuales en la suspensión celular que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico o identificación de suspensiones celulares individuales que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.
9. Un método para la identificación de una composición de medio de cultivo que está optimizada para la producción recombinante de una proteína deseada, comprendiendo el método las etapas:
 - γ1) provisión de una pluralidad de medios de cultivo que se diferencian entre sí con respecto a la composición del

medio del cultivo;

γ2) cultivo de células microbianas de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en los diferentes medios de cultivo de modo que las células produzcan la proteína deseada, obteniendo de este modo una pluralidad de suspensiones celulares en las que las células de las suspensiones celulares, debido a la diferencia en la composición de los medios de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de secreción de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

γ3) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

10. Un método para la identificación de condiciones de cultivo que están optimizadas para la producción recombinante de una proteína deseada, comprendiendo el método las etapas:

δ1) provisión de una pluralidad de suspensiones celulares que comprenden células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;

δ2) cultivo de las células microbianas en estas suspensiones celulares en condiciones de cultivo diferentes de modo que las células produzcan la proteína deseada de modo que las células en las diferentes suspensiones celulares, debido a la diferencia en las condiciones de cultivo, difieren entre sí con respecto a la cantidad de la proteína deseada que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

δ3) identificación de aquellas suspensiones celulares que comprenden células que tienen una alta secreción de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico.

11. Un método para la identificación de un compuesto que se **caracteriza por** una actividad antibiótica debida de su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana, comprendiendo el método las etapas:

ε1) provisión de una suspensión celular que comprende las células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;

ε2) cultivo de las células en la suspensión en presencia del compuesto;

ε3) determinación de la actividad antibiótica y actividad antibiótica dependiente de la concentración del compuesto mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular.

12. Un método para analizar el efecto de un compuesto que se **caracteriza por** una actividad antibiótica debida de su propiedad de dañar la membrana de una célula bacteriana sobre una población de células bacterianas genéticamente diferentes o células genéticamente idénticas en estados fisiológicos diferentes o fases de crecimiento diferentes, comprendiendo el método las etapas:

ε1) provisión de una suspensión celular que comprende las células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;

ε2) cultivo de las células en la suspensión en presencia del compuesto;

ε3) determinación de la actividad antibiótica y actividad antibiótica dependiente de la concentración del compuesto mediante detección de la actividad de fluorescencia intracelular.

13. Un método para la producción de una célula microbiana que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, comprendiendo el método las etapas:

I) provisión de una suspensión celular que comprende células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4;

II) modificación genética de las células de modo que las células produzcan la proteína deseada para obtener una suspensión celular en la que las células difieren con respecto a la cantidad de proteína que se secreta a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

III) identificación de células individuales en la suspensión celular que tengan una secreción aumentada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

IV) separación de las células identificadas desde la suspensión;

V) identificación de aquellos genes modificados genéticamente G1 a Gn o aquellas mutaciones M1 a Mm en las células identificadas y separadas que son responsables de la secreción aumentada de proteína a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico;

VI) producción de una célula que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico, de la cual el genoma comprende al menos uno de los genes G1 a Gn y/o al menos una de las mutaciones M1 a Mm.

14. Una célula microbiana obtenida por un método de acuerdo con la reivindicación 13.

15. Un método para la producción de una proteína deseada, comprendiendo el método las etapas:

(a) producción de una célula microbiana que está modificada genéticamente con respecto a su tipo silvestre con una secreción optimizada de la proteína deseada a través de la membrana citoplásmica al espacio extracitosólico por el método de acuerdo con la reivindicación 13;

(b) cultivo de la célula microbiana en un medio de cultivo que comprende nutrientes en condiciones en las que la célula produce proteína a partir de los nutrientes.

Fig. 1

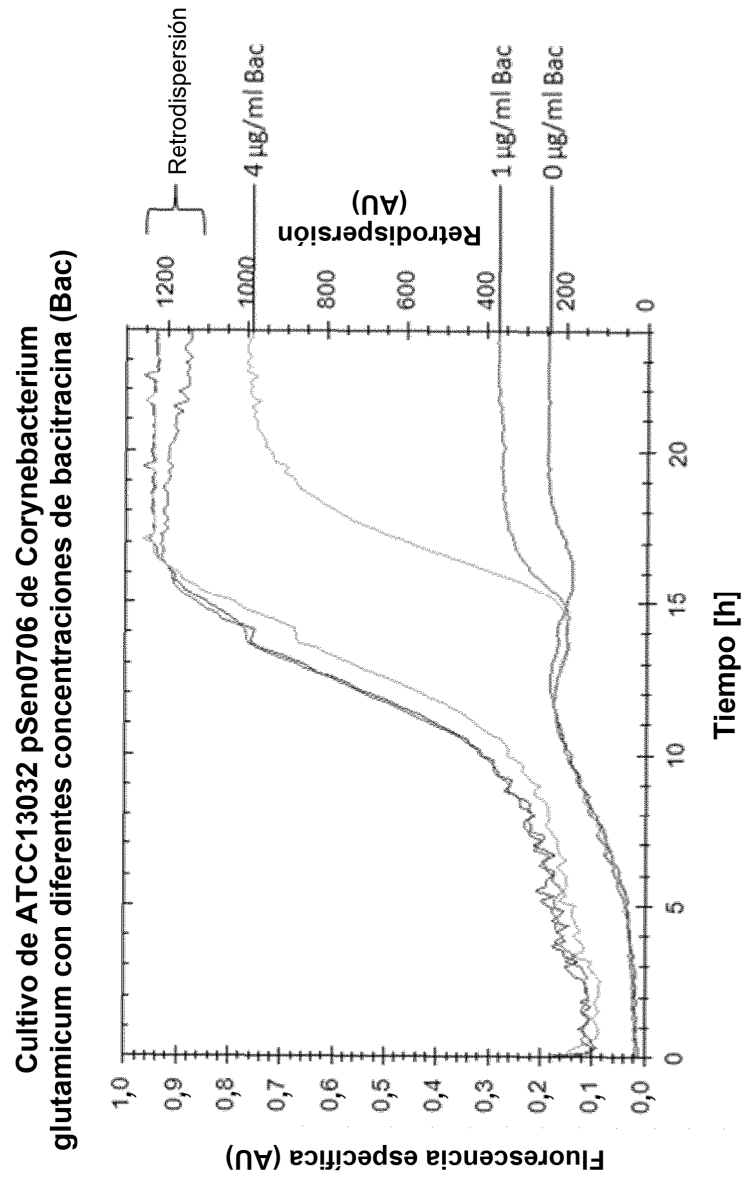


Fig. 2

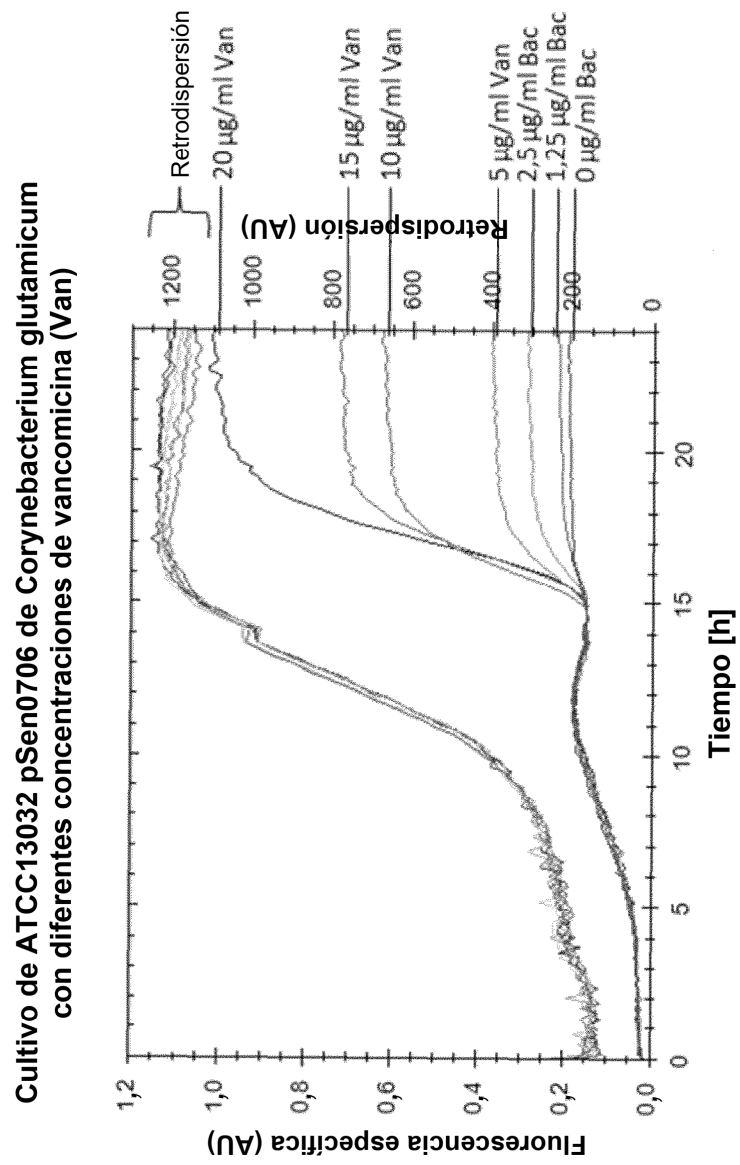


Fig. 3

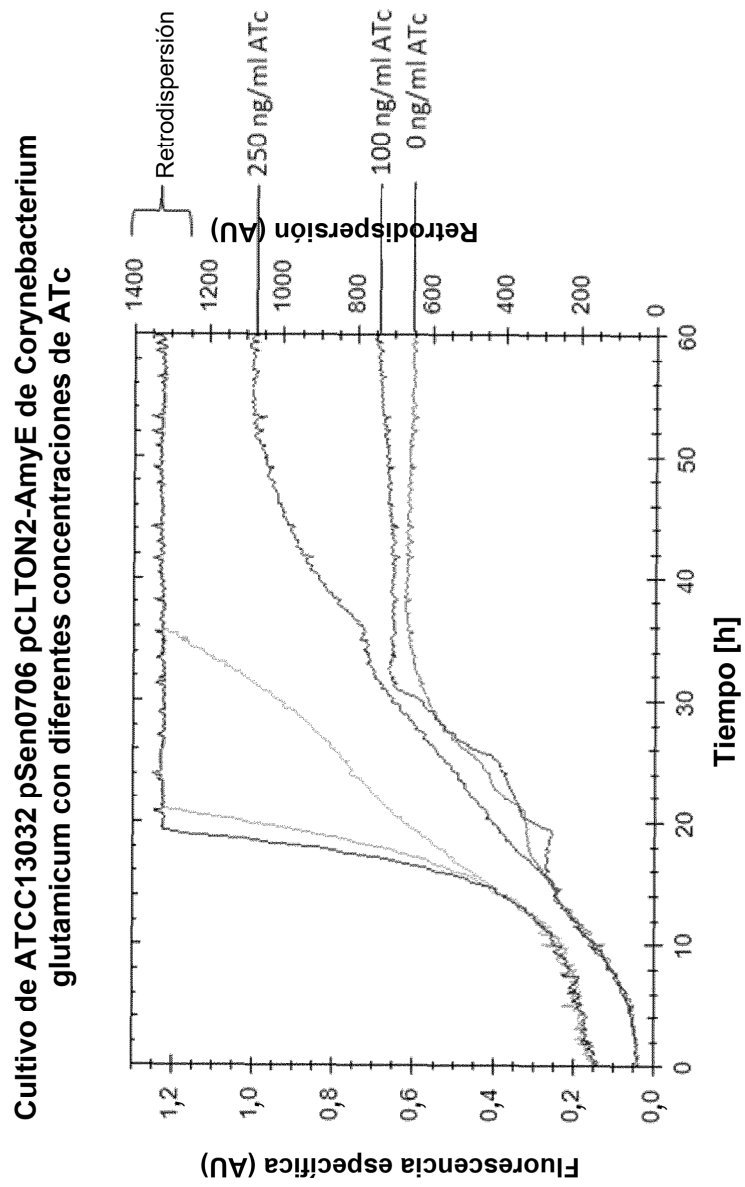


Fig. 4

