



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 612**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/12** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07102437 .6**  
96 Fecha de presentación : **02.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1783230**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Homoserina - transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación.**

30 Prioridad: **11.10.2002 DE 102 47 437**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **Wacker Chemie AG.**  
**Hanns-Seidel-Platz 4**  
**81737 München, DE**

72 Inventor/es: **Leonhartsberger, Susanne;**  
**Pfeiffer-Schwiesow, Kerstin;**  
**Bauer, Brigitte y**  
**Winterhalter, Christoph**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 317 612 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).

# ES 2 317 612 T3

## DESCRIPCIÓN

Homoserina - transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación.

5 El presente invento se refiere a homoserina - transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación, a cepas de microorganismos que contienen estas enzimas, así como a su utilización para la preparación de L-metionina o S-adenosil-metionina.

10 La metionina es un aminoácido esencial para los seres humanos y para muchos animales. Ella se produce sobre todo para el mercado de los piensos y se añade en forma de racemato al pienso. La síntesis se efectúa por vía química a partir de acroleína y metanotiol pasando por 3-(metiltio)-propionaldehído, que se transforma con ácido cianhídrico, amoníaco y dióxido de carbono, pasando por una hidantoína, en D,L-metionina. Una separación del racemato se puede efectuar químicamente.

15 La S-adenosil-metionina (SAM) es el más importante donante de grupos metilo en el metabolismo y encuentra utilización en el sector farmacéutico en el caso del tratamiento de depresiones, enfermedades del hígado y artritis. Los procedimientos descritos para la utilización de la SAM comprenden sobre todo la cultivación de levaduras (véase la cita de Schlenk F. y DePalma R.E., J. Biol. Chem. 1.037-1.050 (1957), Shiozaki S. y colaboradores, Agric. Biol. Chem. 53, 3.269-3.274 (1989)) en presencia del compuesto precursor L-metionina y la purificación por cromatografía después de una autólisis.

20 La síntesis microbiana de metionina se investigó de una manera especialmente intensa en la bacteria *E. coli* (véase la cita de Greene, R.C., Biosynthesis of Methionine (Biosíntesis de metionina) en: Neidhart F.C., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and molecular biology (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, biología celular y molecular), segunda edición, ASM Press, Washington DC (1996), páginas 542-560 y las referencias contenidas en ésta). Ella se compone de una serie de reacciones catalizadas por enzimas y está regulada estrictamente. Las primeras etapas de la síntesis partiendo de aspartato hasta llegar a la homoserina se desarrollan paralelamente para la formación de los aminoácidos treonina, leucina, isoleucina y valina. La primera etapa, específica para la síntesis de metionina, es la formación de O-succinil-homoserina a partir de succinil-CoA y homoserina mediando disociación de la coenzima A. Esta reacción es catalizada por la enzima homoserina - succiniltransferasa (homoserina - O-transsuccinilasa, MetA, EC 2.3.1.46). La síntesis de SAM se efectúa en una etapa a partir de L-metionina y ATP.

35 La actividad de la homoserina - transsuccinilasa es inhibida en presencia de L-metionina y/o de SAM (véase la cita de Lee L.-W. y colaboradores, J. Biol. Chem. 241, 5.479-5.480 (1966)). Esta inhibición por el producto final impide, por una parte, en la bacteria una síntesis excesiva, que consume energía, de metionina y SAM, pero por otra parte se opone también a una producción microbiana de estas dos sustancias a una escala industrial. El gen que codifica la homoserina - transsuccinilasa se compone de 930 pares de bases (inclusive el codón de detención), y la proteína codificada por éste se compone de 309 aminoácidos. Hasta ahora no se ha esclarecido la estructura de la homoserina - transsuccinilasa y, por tanto, tampoco es posible una identificación de los aminoácidos que participan en una inhibición por el producto final.

40 Un método conocido para reforzar la síntesis de productos finales del metabolismo, consiste en la utilización de enzimas modificadas, cuya actividad ya no puede ser inhibida por el producto final de su vía metabólica (mutantes resistentes a la retroalimentación). Así, por ejemplo, se prepararon mutantes resistentes a la retroalimentación de la ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulónico - 7-fosfato sintasa para el aumento de la síntesis de L-triptófano y L-fenilalanina (véase el documento de solicitud de patente europea EP 07455671A2) y mutantes resistentes a la retroalimentación de la corismato mutasa/prefenato deshidratasa para el aumento de la producción de fenilalanina (véase el documento de patente de los EE.UU. US 5120837).

50 Hace poco tiempo se modificó la enzima homoserina - transsuccinilasa procedente de *E. coli* mediante mutación de la secuencia de ADN que la codifica, en el sentido de que las proteínas resultantes tienen una capacidad manifiestamente reducida de que su actividad sea inhibida en presencia de L-metionina 1 mM o de SAM 1 mM (véase el documento de solicitud de patente japonesa JP 2000139471A). En este caso se trata de los siguientes intercambios de aminoácidos: la arginina en la posición 27 se reemplazó por cisteína, la isoleucina en la posición 296 se reemplazó por serina y la prolina en la posición 298 se reemplazó por leucina. Las homoserina - transsuccinilasas modificadas mostraron en presencia de L-metionina 1 mM unas actividades restantes comprendidas entre 44 y 89%, y en presencia de SAM 1 mM unas actividades restantes comprendidas entre 10 y 73%. Las cepas de bacterias, que contienen estas proteínas modificadas, muestran una producción aumentada de L-metionina. Sin embargo, estas homoserina - transsuccinilasas modificadas tienen, en ausencia de L-metionina y de SAM, una actividad disminuida manifiestamente en comparación con las del tipo salvaje. A partir de la base de datos Database WPI Section Ch, Week 200103 Derwent Publications Ltd., Londres, Gran Bretaña; de la clase B05, AN 2001-018703 XP002273153, y del documento JP 2000 139471 A (de AJINOMOTO KK) del 23 de mayo del 2000 (2000-05-23) se conoce un ADN, que tiene las siguientes mutaciones en la secuencia que comprende 309 aminoácidos: Arg27 -> Cys; Ile296 -> Ser; Pro298 -> Leu; Arg27 -> Cys e Ile296 -> Ser; Ile296 -> Ser y Pro298 -> Leu; Pro298 -> Leu y Arg27 -> Cys; ó Arg27 -> Cys, Ile296 -> Ser y Pro298 -> Leu. Es deseable tener a disposición un número lo más alto que sea posible de variantes de la homoserina - transsuccinilasa, que se diferencien en el grado de su actividad y en el grado de su capacidad para ser inhibidas por L-metionina y/o SAM, puesto que la biosíntesis microbiana de L-metionina y SAM es sumamente compleja en lo que se refiere a su transcurso y su regulación y, además de esto, está interconectada de manera compleja con diversas vías

## ES 2 317 612 T3

adicionales del metabolismo en la célula. Por lo tanto, no se puede realizar de antemano ninguna predicción acerca de con qué variante se pueda alcanzar qué efecto sobre el crecimiento de una cepa de microorganismo, sobre el balance de sus transcurso metabólicos importantes para la vida y sobre la producción de L-metionina y SAM.

5 Una misión del presente invento consiste en poner a disposición un amplio espectro de nuevas variantes de la homoserina - transsuccinilasa (proteína MetA), que posean una resistencia a la retroalimentación aumentada en comparación con la enzima de tipo salvaje (WT, de Wild Type) en lo que respecta a L-metionina y SAM.

10 El problema planteado por esta misión se resuelve por medio de una homoserina - transsuccinilasa, que en comparación con una enzima homoserina - transsuccinilasa de tipo salvaje tiene una mutación y manifiesta una sensibilidad reducida en comparación con la enzima de tipo salvaje, frente a L-metionina o SAM, poseyendo la enzima de tipo salvaje una secuencia de aminoácidos, que comprende una secuencia parcial AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro situada entre las posiciones 90 y 115 y una secuencia parcial TyrGlnXaaThrPro situada entre las posiciones 285 y 310, siendo la metionina inicial la posición 1 de la secuencia de aminoácidos, caracterizada porque la mutación es un intercambio  
15 de aminoácido de la tirosina en la secuencia parcial TyrGlnXaaThrPro.

La Tyr en la secuencia parcial TyrGlnXaaThrPro está conservado al realizar una comparación entre homoserina - transsuccinilasas de diferentes microorganismos. La región de la secuencia TyrGlnXaaThrPro que contiene la tirosina conservada Tyr, se encuentra, en la proteína MetA procedente de *E. coli*, entre las posiciones 294 y 298 de la SEQ ID No. 2. Éste, en otras proteínas MetA, se encuentra en la región comprendida entre las posiciones 285 y 310. Xaa significa un aminoácido natural arbitrario.

Hasta ahora no se ha esclarecido la estructura espacial de la homoserina - transsuccinilasa. Por lo tanto, no se posibilita realizar la asignación a determinados aminoácidos de diferentes funciones tales como la actividad enzimática y la capacidad para inhibirla por L-metionina y/o SAM. Puesto que el plegamiento de proteínas es un proceso extremadamente complejo, a partir de la secuencia primaria de proteínas no se pueden sacar conclusiones acerca de su estructura espacial y no pocas veces sucede que unos aminoácidos, que están situados muy alejados en la secuencia primaria, en la proteína plegada están situados en una proximidad inmediata y viceversa. Sorprendentemente, se encontró que el intercambio de aminoácidos conforme al invento en la posición 294 de la proteína conduce a una disminución de la capacidad para inhibirse por retroalimentación tanto frente a L-metionina como también frente a SAM.

Una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento tiene, en comparación con la enzima de tipo salvaje, una resistencia mejorada (por lo tanto, una Ki aumentada) frente a los inhibidores SAM y/o L-metionina. De manera preferida, ella tiene, en comparación con la enzima de tipo salvaje, una resistencia aumentada por lo menos en 2 veces frente a metionina y/o SAM. De manera especialmente preferida, una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento tiene una resistencia aumentada en 10 veces, en comparación con la enzima de tipo salvaje, se prefiere en particular una resistencia aumentada en 50 veces frente a metionina y/o SAM, de manera muy especialmente preferida una resistencia aumentada en comparación con los mutantes de MetA mencionados en el documento JP2000139471A.

40 De manera especialmente preferida, la secuencia proteínica de una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento comprende una de las mutaciones enumeradas en la Tabla 1 o una combinación de las mutaciones expuestas.

Una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento es obtenible, por ejemplo, mediante expresión de una secuencia de ADN, que codifica una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento.

45 El presente invento se refiere, por consiguiente, también a una secuencia de ADN, que codifica una homoserina - transsuccinilasa conforme al invento.

Una secuencia de ADN de este tipo se puede obtener mediante una mutación de una base en uno o varios codones de un gen de metA, caracterizada porque en el codón para la tirosina conservada, que se encuentra en la posición 294 en la enzima de tipo salvaje de *E. coli*, está presente por lo menos una mutación, comenzando el codón 1 con la primera base de la secuencia SEQ ID No. 1.

55 Una secuencia de ADN conforme al invento es un gen de metA, en el que se ha modificado el codón para la tirosina conservada Tyr en la secuencia TyrGlnXaaThrPro, estando situada esta secuencia entre las posiciones 285 y 310.

En lo sucesivo, una secuencia de ADN conforme al invento se designa como un alelo de metA resistente a la retroalimentación.

60 Dentro del marco del presente invento, como alelos de metA se han de considerar también los genes que, al realizar un análisis con el algoritmo BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin), manifiestan una identidad entre secuencias mayor que un 50% con respecto al gen WT de metA procedente de *E. coli*. Asimismo, unas proteínas con una identidad entre secuencias mayor que un 50% con relación a la homoserina - transsuccinilasa de tipo salvaje de *E. coli* (algoritmo BESTFIT, GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG) Madison, Wisconsin), que poseen una actividad de homoserina - transsuccinilasa, se han de considerar como homoserina - transsuccinilasas.

## ES 2 317 612 T3

De manera preferida, un alelo de metA conforme al invento comprende una mutación enumerada en la Tabla 1, columna 2 o respectivamente 4, o una combinación de las mutaciones expuestas.

Unos alelos de metA conformes al invento se pueden preparar, por ejemplo, mediante una mutagénesis inespecífica o mediante una mutagénesis deliberada a partir del material de partida descrito a continuación. Unas mutaciones inespecíficas situadas dentro de la citada región de ADN se pueden producir, por ejemplo, por medio de agentes químicos (p.ej. 1-metil-3-nitro-1-nitroso-guanidina, ácido etil-metano-sulfónico, entre otros) y/o por medio de métodos físicos y/o por medio de reacciones de PCR (reacciones en cadena de polimerasa) llevadas a cabo en determinadas condiciones y/o mediante amplificación del ADN en cepas mutadoras (p.ej. la XL1-Red). Se conocen ciertos métodos para la introducción de mutaciones en posiciones específicas dentro de un fragmento de ADN. Otra posibilidad para la producción de alelos de metA resistentes a la retroalimentación consiste en la combinación de diferentes mutaciones, que conducen a una resistencia a la retroalimentación, para dar múltiples mutantes con propiedades nuevas.

Como material de partida para la mutagénesis sirve de manera preferida el ADN de un gen de metA de tipo salvaje. El gen de metA que se ha de mutar puede ser codificado cromosómicamente o extracromosómicamente. Mediante aplicación de los métodos de mutagénesis antes mencionados, se modifican uno o varios nucleótidos de la secuencia de ADN, de tal manera que la proteína ahora codificada por el gen tiene una mutación de la tirosina conservada, que se encuentra en la posición 294 en la enzima de tipo salvaje de *E. coli*, siendo la metionina inicial la posición 1 de la SEQ ID NO. 2.

Con las técnicas descritas se pueden introducir en un gen arbitrario de metA una o varias mutaciones en la región mencionada del ADN. Estas mutaciones dan lugar a que la homoserina - transsuccinilasa codificada posea una secuencia de aminoácidos que conduzca a una resistencia a la retroalimentación frente a SAM y/o L-metionina.

A continuación de la mutagénesis, llevada a cabo por ejemplo tal como se ha descrito, se efectúa la selección de los mutantes con el fenotipo deseado, por ejemplo mediante determinación de la magnitud de la sensibilidad frente a L-metionina y/o SAM de las homoserina - transsuccinilasas mutadas.

Para la determinación de la sensibilidad frente a L-metionina y/o SAM de las homoserina - transsuccinilasas, se puede utilizar cualquier método que permita determinar la actividad de la enzima en presencia de L-metionina o SAM. Por ejemplo, la determinación de la actividad de las homoserina - transsuccinilasas se puede efectuar apoyándose en el método descrito por Kredich y Tomkins para la determinación de la actividad de serina-acetil transferasas (véase la cita de Kredich N.M. y Tomkins G.M., J. Biol. Chem. 241, 4.955-4.965 (1966)). La actividad enzimática se mide en una tanda, que contiene homoserina y succinil-CoA. La reacción se inicia mediante adición de la enzima y se vigila en un fotómetro espectral a través de la disminución de la extinción a 232 nm, que es provocada por disociación del enlace tioéster en la succinil-coenzima A. El ensayo descrito se adecua para la determinación de la sensibilidad frente a L-metionina de las homoserina - transsuccinilasas. La inhibición de la actividad de las homoserina - transsuccinilasas se ensaya en presencia de diferentes concentraciones de L-metionina en la tanda de reacción. La actividad catalítica de las diferentes homoserina - transsuccinilasas se determina en presencia y ausencia de L-metionina, y a partir de ella se determina la constante de inhibición  $K_i$ , que describe la concentración del inhibidor con la que la actividad es solamente de un 50% de la que se puede medir en ausencia del inhibidor.

Para la determinación de la sensibilidad frente a SAM de la actividad de las diferentes homoserina - transsuccinilasas se puede efectuar, por ejemplo, un ensayo de la actividad como el que se describe en la cita de Lee L.W. y colaboradores, Biol. Chem. 241, 5.479-5.480 (1966). En este caso, el extracto enzimático se incuba con homoserina y succinil-CoA. Después de diferentes momentos se interrumpe una parte de la tanda de ensayo mediante adición a una mezcla de etanol, agua y ácido 5,5'-ditiobis(2-nitro-benzoico). La absorción se determina fotométricamente a 412 nm. El ensayo descrito se adecua, por ejemplo, para la determinación de la sensibilidad frente a SAM de las homoserina - transsuccinilasas. La inhibición de la actividad de las homoserina - transsuccinilasas se ensaya en presencia de diferentes concentraciones de SAM en la tanda de reacción. La actividad catalítica de las diferentes homoserina - transsuccinilasas se determina en presencia y en ausencia de SAM, y a partir de esto se determina la constante de inhibición  $K_i$ .

Por regla general, se prefiere una homoserina - transsuccinilasa con una sensibilidad disminuida frente a L-metionina y/o SAM con una actividad catalítica simultáneamente inalterada. Para otros propósitos puede ser digno de pretenderse una reducción simultánea de la sensibilidad frente a L-metionina y/o SAM y de la actividad catalítica.

Un objeto adicional del invento son cepas de microorganismos, que contienen alelos de metA conformes al invento, que son resistentes a la retroalimentación. Tales cepas de microorganismos están caracterizadas porque poseen un metabolismo de L-metionina o respectivamente SAM, desregulado por lo menos por un alelo de metA, que es resistente a la retroalimentación. Puesto que en los casos de todos los microorganismos este metabolismo se desarrolla a través de la misma ruta que es en sí conocida, y las técnicas que se han de aplicar para la producción de las cepas conformes al invento, se conocen por regla general p.ej. a partir de libros de texto clásicos y se pueden aplicar a todos los microorganismos, se pueden producir cepas conformes al invento a partir de microorganismos arbitrarios. De manera preferida, para la producción de una cepa conforme al invento se adecuan bacterias. Se adecuan de manera especialmente preferida bacterias gram-negativas, en particular *E. coli*.

## ES 2 317 612 T3

Un objeto adicional del invento es la preparación de L-metionina o SAM mediante cultivación de microorganismos conformes al invento, además la utilización de microorganismos conformes al invento para la preparación de productos que contienen metionina (tales como, por ejemplo, péptidos que contienen metionina) o que en el metabolismo de los microorganismos se derivan de L-metionina o SAM (tales como, por ejemplo, poliaminas, ácido lipónico, biotina y quinonas). Por lo demás, los microorganismos conformes al invento, que producen SAM en una medida reforzada en comparación con el tipo salvaje, se pueden utilizar para preparar unos productos que resultan mediante transferencia del grupo metilo de SAM.

Los alelos de *metA* resistentes a la retroalimentación, son transformados para la expresión de la enzima homoserina - transsuccinilasa modificada mediante procedimientos usuales en el seno de una cepa anfitriona.

La expresión de un alelo de *metA* resistente a la retroalimentación se puede efectuar bajo el control del promotor propio, localizado delante del gen de *metA*, o mediante utilización de otros sistemas de promotores apropiados, que son conocidos para un experto en la especialidad. En este caso, el gen correspondiente se puede encontrar, bajo el control de un promotor de este tipo, o bien en una o varias copias en el cromosoma del organismo anfitrión o en un vector, de manera preferida en un plásmido. El invento se refiere, por lo tanto, también a un plásmido, que está caracterizado porque contiene un alelo de *metA* conforme al invento, que es resistente a la retroalimentación, con un promotor.

Para la clonación se pueden utilizar vectores, que ya contienen elementos genéticos (p.ej. promotores constitutivos o regulables, terminadores), que o bien hacen posible una expresión duradera o inducible controlada, del gen que codifica una homoserina - transsuccinilasa. Además, en un vector de expresión se encuentran de manera preferida otros elementos reguladores tales como sitios de fijación ribosómicos y secuencias de terminación, así como unas secuencias, que codifican marcadores selectivos y/o genes reporteros. La expresión de tales marcadores de selección facilita la identificación de transformantes. Como marcadores de selección se adecuan unos genes, que codifican una resistencia frente a p.ej. ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, kanamicina u otros antibióticos. Cuando el alelo de *metA* conforme al invento se debe de replicar extracromosómicamente, el vector plasmídico debería contener preferiblemente un sitio de origen de la replicación. Se prefieren especialmente unos vectores plasmídicos tales como, por ejemplo, los vectores de *E. coli* pACYC184, pUC18, pBR322, pSC101 y sus derivados. Como promotores inducibles se adecuan, por ejemplo, el promotor *lac*, *tac*, *trc*, *lambda PL*, *ara* o *tet*, o secuencias derivadas de ellos. Se prefiere la expresión constitutiva realizada por un promotor de la GAPDH. En una forma de realización especialmente preferida del presente invento, los genes que codifican la homoserina - transsuccinilasa se encuentran bajo el control del promotor de la GAPDH en un plásmido derivado de pACYC184. Las estrategias para la integración de genes en el cromosoma constituyen un estado de la técnica.

Una cepa anfitriona apropiada se transforma con un vector de expresión, que contiene la unidad de transcripción que codifica una homoserina - transsuccinilasa insensible frente a L-metionina y/o SAM. Como cepas anfitrionas se utilizan unas cepas que contienen proteínas sensibles frente a L-metionina y/o SAM, tales como, por ejemplo, bacterias.

Como cepa anfitriona se utiliza, de manera preferida, una cepa de *E. coli* de tipo salvaje, o una cepa, en la que está desactivado el gen endógeno de *metA*, tal como p.ej. la cepa DL41 de *E. coli*, colección de cepas de CGSC nº 7.177. Tales cepas son complementadas por un gen de *metA* conforme al invento. La capacidad de una cepa conforme al invento para la producción microbiana de L-metionina o SAM se puede reforzar por medio de ciertas medidas adicionales. Por ejemplo, para esta finalidad se pueden utilizar unas cepas, en las que ya no es expresado el gen de *metJ*, que codifica un represor de los genes del metabolismo de la metionina (véase el documento JP2000139471A).

La producción de L-metionina o SAM se efectúa de manera preferida mediante cultivación de una cepa de microorganismo conforme al invento. Para esto, la cepa de microorganismo se cultiva, por ejemplo, dentro de un fermentador en un medio nutritivo, que contiene una fuente adecuada de carbono, y una fuente de energía adecuada, así como otras sustancias adicionales.

Las sustancias que se han formado durante la fermentación, tales como, por ejemplo, L-metionina o SAM, se pueden purificar a continuación.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente el invento. Todos los procedimientos empleados de biología molecular, tales como una reacción en cadena de la polimerasa, un aislamiento y una purificación de un ADN, una modificación de un ADN por medio de enzimas de restricción, del fragmento de Klenow y de una ligasa, la transformación, etc., se llevaron a cabo de la manera conocida para un experto en la especialidad, descrita en la bibliografía o recomendada por el respectivo fabricante.

### Ejemplo 1

#### *Producción de homoserina - transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación mediante una mutagénesis no dirigida del gen estructural de metA*

El gen de *metA* procedente de *E. coli* se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa mediante utilización de los oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' *metA*<sub>fw</sub>, que tiene la secuencia

## ES 2 317 612 T3

5'-GATCCCATGGCTCCTTTTAGTCATTCTTAT-3', (SEQ ID No. 3), y metArev, que tiene la secuencia 5'-GATC GAGCTCAGTACTATTAATCCAGCGTTGGATTTC-3', (SEQ ID No. 4), como cebadores y de un ADN cromosómico procedente de la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27325) como sustrato. El producto con una longitud de 1,1 kb se aisló por electroforesis y se purificó mediante un estuche QIAquick Gel Extraction Kit (de Qiagen). Después de esto, éste se introdujo en el plásmido pBr322 (de MBI Fermentas), que se había tratado con la enzima de restricción EcoRI y con el fragmento de Klenow (de Roche), por medio de una ligasa de ADN de T4. El resultante plásmido pKP438 se empleó para la mutagénesis.

El plásmido pKP438 se introdujo mediante transformación en la cepa XL1-Red de *E. coli* (de Stratagene), y mediante cultivación según las instrucciones del fabricante se introdujeron mutaciones en el plásmido pKP438. La mutagénesis se efectuó en presencia de concentraciones críticas de compuestos análogos a metionina tal como se describe en la cita de Lawrence D.A. y Smith D.A., *Genetics* 58: 473-492 (1968). Mediante este procedimiento se seleccionan unos mutantes, que manifiestan una sobreproducción de metionina. La mayoría de estos mutantes se han de atribuir a homoserina - transsuccinilasas modificadas, codificadas en el plásmido pKP438.

El plásmido procedente de un mutante se aisló y se determinó la secuencia de ADN del gen de metA. Se mostró que el gen tiene, en comparación con el del tipo salvaje, un intercambio de bases, que conduce a un aminoácido modificado en la homoserina - transsuccinilasa codificada. pBR3 contiene como base 881 una G en lugar de la A que se presenta en el gen de tipo salvaje, con lo cual en la proteína codificada se introduce en la posición 294 cisteína en lugar de tirosina.

### Ejemplo 2

*Producción de homoserina - transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación mediante intercambios de bases deliberados en el gen estructural de metA*

En el Ejemplo 1 se produjeron alelos de metA que, debido al intercambio de bases y a una modificación de aminoácido en la posición 294, que lo acompaña, codifican homoserina - transsuccinilasas que son resistentes a la retroalimentación frente a L-metionina y/o SAM (véanse los Ejemplos 3 y 4). Por medio de una mutagénesis específica para un sitio se construyeron, por consiguiente, unos genes, que codifican unas homoserina - transsuccinilasas, en las que el aminoácido tirosina en la posición 294 está reemplazado por otros aminoácidos diferentes, y que tienen unas propiedades modificadas de este modo en lo que se refiere a la inhibición de su actividad por L-metionina y SAM.

Como plásmido de base para la construcción de los plásmidos conformes al invento, se utilizó el plásmido pACYC184-LH derivado de pACYC184, que está depositado bajo el número DSM 10172 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) en Braunschweig. En este plásmido se introdujo la secuencia del promotor de la GAPDH y adicionalmente, delante de ésta, un sitio de corte con NdeI mediante el siguiente modo de proceder: El promotor de la GAPDH se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa según las reglas conocidas para un experto en la especialidad, sirviendo los oligonucleótidos GAPDHfw, que tiene la secuencia 5'-GTTCGACGCGTGAGGCGAGTCAGTCGCGTAATGC-3' (SEQ ID No. 5), y GAPDHrevII, que tiene la secuencia 5'-GACCTTAATTAAGATCTCATATGTTCCACCAGCTATTTGTTA-3' (SEQ ID No. 6) como cebadores y un ADN cromosómico procedente de la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27325) como sustrato. El producto se aisló por electroforesis, se purificó con ayuda de un estuche QIAquick Extraction Kit (de Qiagen) y se trató con las enzimas de restricción MluI y PacI según las instrucciones del fabricante. A continuación de esto, éste se introdujo en el vector pACYC184-LH tratado con las mismas enzimas, con ayuda de la ligasa de ADN de T4, con lo que resultó el plásmido pKP290.

El gen de metA procedente de *E. coli* se amplificó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa mediante utilización de los oligonucleótidos metAfw2, que tiene la secuencia 5'-CATGGCTCCTTTTAGTCATTCTTATATTC TAACGTAG-3' (SEQ ID No. 7), y metArev2, que tiene la secuencia 5'-ACGCGTATGCATCCAGAGCTCAGTAC TATTAATCCAGCGTTGGATTTC-3' (SEQ ID No. 8) como cebadores y un ADN cromosómico de la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27325) como sustrato. El producto con una longitud de 1,1 kb se separó por electroforesis y se purificó con ayuda de un estuche QIAquick Gel Extraction Kit (de Qiagen). Después de esto, el producto se ligó en el vector pKP290 que se había preparado previamente de la siguiente manera: Tratamiento con la enzima de restricción NdeI, con la enzima de Klenow, con la enzima de restricción BglII y con la nucleasa de haba de mung (de Roche). El resultante plásmido pKP413GAP se representa en la Fig. 1 y se ha depositado bajo el número DSM 15221 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares en Braunschweig. Éste contiene el gen de metA procedente de *E. coli* bajo el control del promotor de la GAPDH y sirve como plásmido de partida para la preparación de los alelos de metA resistentes a la retroalimentación.

El plásmido pKP413GAP se sometió a una mutagénesis dirigida específica para un sitio, concerniente al codón 294 del gen estructural de metA. A este fin, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa inversa con una polimerasa de Pfu (de Promega) de acuerdo con las reglas conocidas para un experto en la especialidad. Como cebadores sirvieron los oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' metAmutfw1 que tiene la secuencia 5'-NNN CAGATCACGCCATACGATCTAC-3' (SEQ ID No. 9), habiéndose empleado en la síntesis para N una mezcla 1:1:1:1 de A, T, C y G, y metAmutrev1 que tiene la secuencia 5'-GACGTAATAGTTGAGCCAGTTGG-3' (SEQ ID No. 10).

## ES 2 317 612 T3

El producto con un tamaño de aproximadamente 4,3 kb se aisló por electroforesis y se purificó con ayuda de un estuche QIAquick Gel Extraction Kit (de Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de esto, se efectuó una ligación intramolecular con una ligasa de ADN de T4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transformación de células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  se efectuó según el método con CaCl<sub>2</sub> de un modo conocido para un experto en la especialidad. La tanda de transformación se esparció sobre placas de agar LB con tetraciclina (10 g/l de triptona, 5 g/l de un extracto de levadura, 10 g/l de NaCl, 15 g/l de un agar, 15 mg/l de tetraciclina) y se incubó durante una noche a 37°C. Los transformantes deseados se identificaron, después de un aislamiento de los plásmidos con ayuda de un estuche QIAprep Spin Miniprep Kit (de Qiagen) mediante un análisis por restricción. La región situada entre los sitios de corte con Esp3I y ScaI, que contiene el codón 294 del gen estructural de metA, se secuenció, se aisló y se introdujo en un plásmido pKP413GAP tratado con las mismas enzimas, mediante métodos conocidos para un experto en la especialidad.

Los plásmidos construidos de esta manera contienen el gen de metA completo, en cada caso con una secuencia modificada en el codón 294 en comparación con la secuencia del tipo salvaje, con lo que ellos se pueden emplear para la producción de diferentes variantes de homoserina - transsuccinilasas (véase la Tabla 1).

TABLA 1

*Plásmido de partida, así como plásmidos que contienen variantes de metA con el codón 294 modificado*

Plásmido	Codón 101	Aminoácido 101	Codón 294	Aminoácido 294
pKP413GAP	GAC	Asp	TAC	Tyr
pKP446	GAC	Asp	TGC	Cys
pSLmetA*L	GAC	Asp	CTC	Leu
pSLmetA*A	GAC	Asp	GCC	Ala
pSLmetA*P	GAC	Asp	CCT	Pro
pSLmetA*Q	GAC	Asp	CAG	Gln
pSLmetA*K	GAC	Asp	AAG	Lys
pSLmetA*0	GAC	Asp	---*)	---**)

\*) : Codón 294 no está en la secuencias met-A.

\*\*): el aminoácido 294 la sido suprimido.

### Ejemplo 3

*Actividad de los mutantes de homoserina - transsuccinilasas y resistencia a la retroalimentación frente a L-metionina*

La actividad y la influencia de L-metionina sobre la actividad de las diferentes homoserina - transsuccinilasas se determinó mediante un ensayo enzimático con extractos de células, en los que se habían producido las respectivas proteínas. Para esto, se introdujeron los correspondientes plásmidos, que codifican homoserina - transsuccinilasas modificadas, mediante una transformación según métodos conocidos para un experto en la especialidad, en la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27325). La tanda de transformación se esparció sobre placas de agar LB con tetraciclina (10 g/l de triptona, 5 g/l de un extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de un agar, 15 mg/l de tetraciclina) y se incubó durante una noche a 37°C. Los transformantes obtenidos se cultivaron en un medio SM1 (para 1 l de medio: CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,0147 g, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,3 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,15 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,5 mg, CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 0,7 mg, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 0,25 mg, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 1,6 mg, ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,3 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,0 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, NaCl 0,6 g, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,002 g, Na<sub>3</sub>-citrato x 2 H<sub>2</sub>O 1 g, glucosa 5 g, triptona 1 g, extracto de levadura 0,5 g), se separaron por centrifugación con una absorción de aproximadamente 0,8 a 600 nm, se lavaron en Tris 50 mM de pH 7,5 y se separaron por centrifugación de nuevo. Las células se resuspendieron en Tris/Cl 50 mM de pH 7,5, ditiotreitol 2 mM, fluoruro de ácido fenil-metil-sulfónico 0,5 mM, y se rompieron en una prensa de French. El material sobrenadante

## ES 2 317 612 T3

de otra centrifugación se empleó como extracto enzimático en el ensayo. La actividad enzimática se determinó en una tanda con Tris/Cl 50 mM de pH 7,6, homoserina 1 mM y succinil-CoA 0,1 mM, siendo cuantificada fotométricamente la coenzima A resultante en la reacción a través de la disminución de la extinción a 232 nm, apoyándose en el método descrito por Kredich y Tomkins para la determinación de la actividad de serina - acetiltransferasas (véase la cita de Kredich N.M. y Tomkins G.M., J. Biol. Chem. 241, 4.955-4.965 (1966). Se determinó la repercusión de la L-metionina añadida sobre la actividad y se cuantificó como  $K_i$  la capacidad de inhibirla. Como  $K_i$  se determina la concentración de L-metionina, con la que la actividad de la homoserina - transsuccinilasa es solamente de un 50% de la actividad en ausencia de L-metionina.

10 Todos los mutantes de las homoserina - transsuccinilasas muestran una resistencia a la retroalimentación, aumentada en comparación con el tipo salvaje, en lo concerniente a L-metionina. La Tabla 2 muestra una recopilación de los resultados.

TABLA 2

*Actividad de la enzima WT, así como de los mutantes de las homoserina - transsuccinilasas y resistencia a la retroalimentación frente a L-metionina*

Plásmido	Actividad (U/mg)	Actividad (%)* en presencia de L-metionina 1 mM	$K_i$ de L-metionina (mM)
pKP413GAP	0,155	2	0,05
pKP446	0,133	96	11
pSLmetA*L	0,070	89	6,5
pSLmetA*A	0,063	94	7,5
pSLmetA*P	0,020	91	6
pSLmetA*Q	0,065	95	11
pSLmetA*K	0,048	92	12,5
pSLmetA*0	0,085	98	14,5

\* La actividad en ausencia de L-metionina corresponde a un 100%.

### 50 Ejemplo 4

#### *Resistencia a la retroalimentación de las homoserina - transsuccinilasas frente a SAM*

55 La influencia de SAM sobre la actividad de las diferentes homoserina - transsuccinilasas se determinó mediante cuantificación de la actividad en presencia de diferentes concentraciones de SAM (sal de Cl, de Sigma). La cultivación y la preparación de los extractos celulares se efectuaron como se ha descrito en el Ejemplo 3. El ensayo de la actividad se efectuó como se ha descrito en la cita de Lee L.W. y colaboradores, J. Biol. Chem. 241, 5.479-5.480 (1966), siendo incubado el extracto enzimático con un tampón de fosfato de potasio 50 mM, de pH 7,5, homoserina 3 mM y succinil-CoA 0,3 mM. En diferentes momentos se interrumpieron 100  $\mu$ l de la tanda de ensayo mediante adición a una mezcla de 400  $\mu$ l de etanol, 400  $\mu$ l de agua y 100  $\mu$ l de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitro-benzoico) 10 mM. Después de que se 60 hubo incubado la tanda durante 5 minutos a la temperatura ambiente, se determinó por fotometría la absorción a 412 nm. Después de haberse determinado la concentración proteínica, se calculó la actividad enzimática mediante utilización de los coeficientes de extinción. Como medida para la capacidad de inhibir la actividad por medio de SAM se determinó la  $K_i$ .

## ES 2 317 612 T3

TABLA 3

*Actividad de los mutantes de las homoserina - transsuccinilasas y resistencia a la retroalimentación frente a SAM*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Plásmido	Actividad (U/mg)	Actividad (%) * en presencia de SAM 1 mM	Ki de SAM (mM)
pKP413GAP	0,62	0,5	0,2
pKP446	0,49	92	10
pSLmetA*L	0,29	80	7
pSLmetA*A	0,26	95	10
pSLmetA*P	0,15	98	18
pSLmetA*Q	0,21	87	6
pSLmetA*K	0,14	90	5
pSLmetA*0	0,33	96	10

\* La actividad en ausencia de SAM corresponde a un 100%.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Homoserina - transsuccinilasa, que en comparación con una enzima homoserina - transsuccinilasa de tipo salvaje  
tiene una mutación y manifiesta una sensibilidad reducida en comparación con la enzima de tipo salvaje, frente a L-  
metionina o SAM, poseyendo la enzima de tipo salvaje una secuencia de aminoácidos, que comprende una secuencia  
parcial AspGlyXaaXaaXaaThrGlyAlaPro situada entre las posiciones 90 y 115 y una secuencia parcial TyrGlnXaaThr-  
Pro situada entre las posiciones 285 y 310, siendo la metionina inicial la posición 1 de la secuencia de aminoácidos,  
10 **caracterizada** porque la mutación es un intercambio de aminoácido de la tirosina en la secuencia parcial TyrGln-  
XaaThrPro.

2. Homoserina - transsuccinilasa de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene una resistencia  
aumentada por lo menos en 2 veces (Ki aumentado) en comparación con el tipo salvaje, frente a SAM o L-metionina.

15 3. Homoserina - transsuccinilasa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque contiene una de las  
mutaciones enumeradas en la Tabla 1.

4. Alelo de metA que codifica una homoserina - transsuccinilasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3.

20 5. Plásmido, **caracterizado** porque contiene un alelo de metA de acuerdo con la reivindicación 4 con un promotor.

6. Cepa de microorganismo, **caracterizada** porque contiene un alelo de metA resistente a la retroalimentación de  
acuerdo con la reivindicación 4.

25 7. Cepa de microorganismo, de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada** porque se trata de una cepa de  
bacteria gram-negativa, de manera preferida de *E. coli*.

8. Procedimiento para la preparación de L-metionina o SAM mediante cultivación de una cepa de microorganismo  
de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7.

30

35

40

45

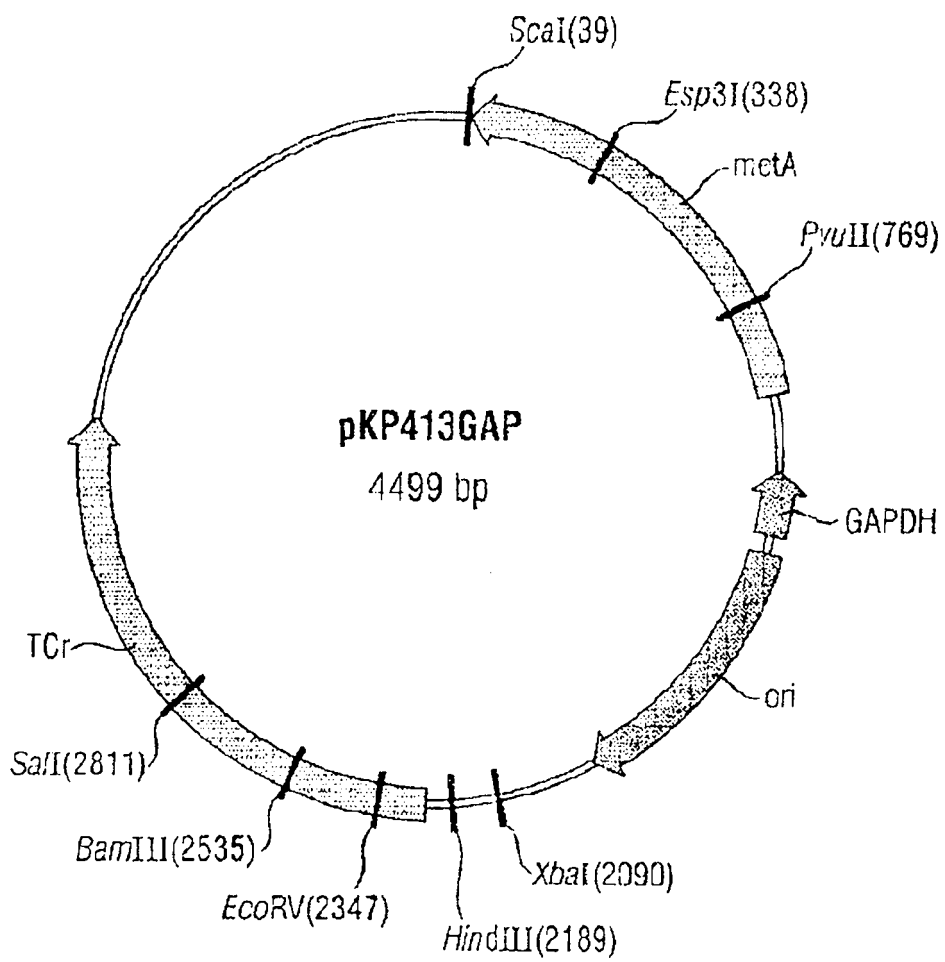
50

55

60

65

**Fig. 1: pKP413GAP**



# ES 2 317 612 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH
- 5 <120> Homoserina transsuccinilasas resistentes a la retroalimentación
- <130> CO10217
- 10 <140>
- <141>
- <160> 24
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- 20 <211> 930
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- 25 <220>
- <221> CDS
- <222> (1) .. (930)
- 30 <300>
- <301> Blattner, F. R.
- <302> La secuencia genómica completa de *Escherichia coli* K-12.
- 35 <303> Science
- <304> 277
- <305> 5331
- <306> 1.453-1.474
- 40 <307> 1997
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 317 612 T3

<400> 1

atg ccg att cgt gtg ccg gac gag cta ccc gcc gtc aat ttc ttg cgt 48  
 Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 1 5 10 15  
 gaa gaa aac gtc ttt gtg atg aca act tct cgt gcg tct ggt cag gaa 96  
 Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 20 25 30  
 att cgt cca ctt aag gtt ctg atc ctt aac ctg atg ccg aag aag att 144  
 Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 35 40 45  
 gaa act gaa aat cag ttt ctg cgc ctg ctt tca aac tca cct ttg cag 192  
 Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 50 55 60  
 gtc gat att cag ctg ttg cgc atc gat tcc cgt gaa tcg cgc aac acg 240  
 Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 ccc gca gag cat ctg aac aac ttc tac tgt aac ttt gaa gat att cag 288  
 Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 85 90 95  
 gat cag aac ttt gac ggt ttg att gta act ggt gcg ccg ctg ggc ctg 336  
 Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

55

60

65

# ES 2 317 612 T3

	100	105	110	
5	gtg gag ttt aat gat gtc gct tac tgg ccg cag atc aaa cag gtg ctg			384
	Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu			
10	115	120	125	
15	gag tgg tgg aaa gat cac gtc acc tgg acg ctg ttt gtc tgc tgg gcg			432
	Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala			
20	130	135	140	
25	gta cag gcc gcg ctc aat atc ctc tac gcc att cct aag caa act cgc			480
	Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg			
	145	150	155	160
30	acc gaa aaa ctc tct gcc gtt tac gag cat cat att ctc cat cct cat			528
	Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His			
35	165	170	175	
40	gcg ctt ctg acg cgt gcc ttt gat gat tca ttc ctg gca ccg cat tgg			576
	Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser			
45	180	185	190	
50	cgc tat gct gac ttt ccg gca gcg ttg att cgt gat tac acc gat ctg			624
	Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu			
	195	200	205	
55	gaa att ctg gca gag acg gaa gaa ggg gat gca tat ctg ttt gcc agt			672
	Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser			
60	210	215	220	
65				

## ES 2 317 612 T3

```

aaa gat aag cgc att gcc ttt gtg acg ggc cat ccc gaa tat gat gcg      720
Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
5      225              230              235              240

caa acg ctg gcg cag gaa ttt ttc cgc gat gtg gaa gcc gga cta gac      768
Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
10              245              250              255

ccg gat gta ccg tat aac tat ttc ccg cac aat gat ccg caa aat aca      816
Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
15              260              265              270

ccg cga gcg agc tgg cgt agt cac ggt aat tta ctg ttt acc aac tgg      864
Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
20              275              280              285

ctc aac tat tac gtc tac cag atc acg cca tac gat cta cgg cac atg      912
Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
25              290              295              300

aat cca acg ctg gat taa                                          930
Asn Pro Thr Leu Asp
30              305              310

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
55 <213> Escherichia coli
60
65

```

ES 2 317 612 T3

<400> 2

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg  
 5           1                   5                   10                   15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu  
 10                   20                   25                   30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile  
 15                   35                   40                   45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln  
 20                   50                   55                   60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr  
 25                   65                   70                   75                   80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln  
 30                   85                   90                   95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu  
 35                   100                   105                   110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu  
 40                   115                   120                   125

Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala  
 45                   130                   135                   140

Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg  
 50                   145                   150                   155                   160

ES 2 317 612 T3

Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His  
 5                                   165                                   170                                   175

Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser  
 10                                   180                                   185                                   190

Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu  
 15                                   195                                   200                                   205

Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser  
 20                                   210                                   215                                   220

Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala  
 25                                   225                                   230                                   235                                   240

Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp  
 30                                   245                                   250                                   255

Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr  
 35                                   260                                   265                                   270

Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp  
 40                                   275                                   280                                   285

Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met  
 45                                   290                                   295                                   300

Asn Pro Thr Leu Asp  
 50                                   305

## ES 2 317 612 T3

	<210> 3	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metAfw	
10	<400> 3	
	gatcccatgg ctccttttag tcattcttat	30
15	<210> 4	
	<211> 36	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metArev	
25	<400> 4	
	gatcgagctc agtactatta atccagcgtt ggattc	36
30	<210> 5	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido GAPDHfw	
40	<400> 5	
	gtcgacgcgt gagcgagtc agtcgcgtaa tgc	33
45	<210> 6	
	<211> 42	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido GAPDHrevII	
55	<400> 6	
	gaccttaatt aagatctcat atgtccacc agctattgt ta	42
60	<210> 7	
	<211> 37	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 317 612 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metAfw2	
5	<400> 7	
	catggetcct ttagtcatt cttatattct aacgtag	37
10	<210> 8	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metArev2	
20	<400> 8	
	acggtatgc atccagagct cagtactatt aatccagcgt tggattc	47
25	<210> 9	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metAmutfw1	
35	<400> 9	
	nncagatca cgccatacga tctac	25
40	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido metAmutrev1	
50	<400> 10	
	gacgtaatag ttgagccagt tgg	23
55		
60		
65		