



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720967-3 A2



(22) Data de Depósito: 21/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/03/2014
(RPI 2253)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/09

(54) Título: METIONINA SINTASES COM INIBIÇÃO
REDUZIDA DE PRODUTO.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2006 EP 06 127363.7

(73) Titular(es): Evonik Degussa GmbH

(72) Inventor(es): Andrea Herold, Anja Knietsch, Corinna
Klopprogge, Hartwig Schroder, Oskar Zelder, Stefan Haefner,
Wolfgang Grabarse

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007064471 de
21/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/080900de
10/07/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"METIONINA
SINTASES COM INIBIÇÃO REDUZIDA DE PRODUTO"**.

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas codificando cobalamina-metionina sintase enzimaticamente ativa e fragmentos funcionais da mesma sendo modificada em comparação com a enzima de tipo selvagem respectiva de modo que referidas enzimas mostram uma inibição reduzida de produto por metionina. A presente invenção também refere-se a polipeptídeos sendo codificados por tais sequências nucleotídicas e células hospedeiras compreendendo estas sequências nucleotídicas. Além disso, a presente invenção refere-se a métodos para produzir metionina em organismos hospedeiros ao fazer uso de tais sequências nucleotídicas e de aminoácidos.

Antecedentes Tecnológicos

Atualmente, em todo o mundo, a produção anual de metionina é de cerca de 500.000 toneladas. Metionina é o primeiro aminoácido limitativo em animais de criação de ração de aves domésticas e, devido a este fato, principalmente aplicado como um suplemento alimentício. Em contraste com outros aminoácidos industriais, metionina é quase que exclusivamente aplicada como um racemato produzido por síntese química. Porque animais podem metabolizar ambos os estereoisômeros de metionina, a alimentação direta da mistura racêmica quimicamente produzida é possível (D'Mello e Lewis, Effect of Nutrition Deficiencies in Animals: Amino Acids, Rechgigl (Ed.), CRC Handbook Series in Nutrition and Food, 441-490, 1978).

No entanto, ainda existe um grande interesse na substituição da produção química existente por um processo biotecnológico. Isto é, devido ao fato de que menores níveis de L-metionina de suplementação é uma fonte melhor de aminoácidos de enxofre do que L-metionina (Katz et al., (1975) *Poult. Sci.*, 545: 1667-74). Além disso, o processo químico usa produtos químicos bastante perigosos e produz correntes substanciais de rejeitos. Todas estas desvantagens da produção química podem ser evitadas por um processo biotecnológico eficiente.

Para outros aminoácidos como glutamato, os métodos de produção com fermentação são conhecidos. Para estes fins, alguns micro-organismos como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) demonstraram ser particularmente apropriados. A produção de aminoácidos por fermentação também tem a vantagem particular de que apenas L-aminoácidos são produzidos. Além disso, produtos químicos ambientalmente problemáticos, como solventes, etc, que são usados na síntese química, são evitados. No entanto, a produção fermentativa de metionina por micro-organismos irá somente ser uma alternativa à síntese química se ela permitir a produção de metionina em uma escala comercial em um preço comparável ao da produção química.

Assim, a produção de L-metionina através de cultura em larga escala de bactérias desenvolvidas para produzir e secretar quantidades grandes desta molécula é um objetivo desejável. As melhoras no processo podem estar relacionadas com os parâmetros de fermentação, como agitação e suprimento de oxigênio, ou a composição dos meios nutrientes, como a concentração de açúcar durante a fermentação, ou o trabalho do produto por, por exemplo, cromatografia de troca iônica, ou as propriedades de produção intrínsecas do próprio micro-organismo.

Os métodos de mutagênese e seleção de mutantes são também usados para melhorar as propriedades de produção destes micro-organismos produzindo metionina. Cepas de elevada produção que são resistentes a antimetabólitos ou que são auxotróficas para metabólitos de importância regulatória são obtidas deste modo.

A tecnologia de DNA recombinante também tem sido empregada durante alguns anos para melhorar as cepas de micro-organismos que produzem L-aminoácidos por amplificação de genes de biossíntese de aminoácidos individuais e investigação do efeito sobre a produção de aminoácidos.

Ruckert et al. (*Journal of Biotechnology* (2003), 104: 213-228) fornecem uma análise da via biossintética de L-metionina em *Corynebacterium glutamicum*. As funções conhecidas de MetZ (também conhecido como MetY) e MetB poderiam ser confirmadas e MetC (também conhecido como

AecD) demonstrou ser uma cistationina- β -liase. Além disso, MetE e MethH, que catalisam a conversão de L-homocisteína em L-metionina, foram identificados neste estudo.

WO 02/097096 descreve sequências nucleotídicas a partir de bactérias corineformes que codificam para o gene repressor McbR (também conhecido como MetD) e processos para a preparação de aminoácidos usando bactérias em que este gene repressor McbR é atenuado. De acordo com WO 02/097096, a atenuação do McbR regulador transcricional melhora a produção de L-metionina em bactérias corineformes. É ainda também descrito em WO 02/097096 que, além da atenuação do gene repressor McbR, a melhora ou a superexpressão do gene MetB que codifica para cistationina- γ -sintase é preferida para a preparação de L-metionina.

A seleção de cepas melhoradas para a produção de uma molécula particular é um processo consumidor de tempo e difícil. Assim, ainda existe uma grande necessidade para micro-organismos que produzam, eficientemente, L-metionina e/ou tenham teores significativamente aumentados de L-metionina, que podem ser utilizados para obter metionina.

Sumário da invenção

É um objeto da presente invenção prover sequências nucleotídicas que codificam metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmentos funcionais das mesmas tendo a propriedade de inibição reduzida de produto por metionina. Estas sequências nucleotídicas codificam preferivelmente metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácido comparada com uma sequência de tipo selvagem respectiva de aminoácido de modo que estas enzimas mostram inibição reduzida de produto por metionina, isto é, a atividade enzimática é inibida por metionina em uma extensão menor do que para as enzimas e polipeptídeos de tipo selvagem. Estas sequências nucleotídicas podem ser, por exemplo, sequências de DNA e/ou RNA com as sequências de DNA sendo preferidas.

É além disso é um objeto da presente invenção prover polipeptí-

deos e preferivelmente proteínas que são codificados por tais sequências nucleotídicas.

Ainda outro objeto da presente invenção é prover vetores que compreendem estas sequências nucleotídicas e podem ser usados para expressão destas sequências nucleotídicas e polipeptídeos em células hospedeiras.

Outro objeto da presente invenção refere-se a células hospedeiras que expressam as sequências nucleotídicas e polipeptídicas acima mencionadas.

Ainda outro objeto da presente invenção refere-se ao uso de tais sequências nucleotídicas e polipeptídicas para produzir metionina e/ou aumentar a eficiência de produção de metionina em organismos hospedeiros.

A presente invenção também refere-se a métodos para produzir metionina por expressão de referidas sequências nucleotídicas e polipeptídicas em organismos hospedeiros.

De acordo com uma modalidade da invenção, sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA são providas que codificam uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmentos funcionais das mesmas tendo a propriedade de inibição reduzida de produto por metionina. Em uma modalidade estas sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA codificam metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácido comparada com uma respectiva sequência de aminoácidos de tipo selvagem, de modo que a atividade enzimática de referidas metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou de referidos fragmentos funcionais mostram uma inibição reduzida de produto como uma consequência de pelo menos uma mutação. Isto significa que a atividade enzimática das enzimas mudadas ou fragmentos funcionais das mesmas é inibida por metionina em uma menor extensão comparada com as sequências de tipo selvagem respectivas.

Estas sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA tam-

bém podem permitir a construção de organismos hospedeiros que produzem e secretam preferivelmente quantidades grandes da molécula desejada, isto é, L-metionina.

Em uma outra modalidade da presente invenção, estas sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA codificam metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em SEQ ID NO. 1 de modo que os polipeptídeos codificados mostram inibição reduzida de produto por metionina comparada com os polipeptídeos respectivos de tipo selvagem.

Ainda outra modalidade da presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que codificam metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em seu domínio de ligação de homocisteína de modo que estes polipeptídeos mostram inibição reduzida de produto por metionina. Um domínio de ligação típico de homocisteína é o de MetH de *C. glutamicum*. A sequência de DNA correspondente é SEQ ID No. 24 enquanto uma sequência de aminoácido é SEQ ID No. 2.

Em ainda outra modalidade da presente invenção, sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA codificam metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em SEQ ID Nos. 3 a 18 de modo que estes polipeptídeos mostram inibição reduzida de produto por metionina.

Uma modalidade da presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que codificam metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em uma posição correspondendo a M33, F86 ou S134 da metionina sintase dependente de cobalamina MetH de *C. glutamicum*. A sequência de DNA de MetH de *C. glutamicum* é a de SEQ ID No. 23. A sequência de aminoácido de MetH de

C. glutamicum é a de SEQ ID No. 1.

A presente invenção em uma modalidade também refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que codificam polipeptídeos que são pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticos aos polipeptídeos sendo codificados pelas sequências nucleotídicas acima mencionadas que carregam pelo menos uma mutação nestas sequências comparadas às sequências de tipo selvagem de modo que as metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas resultantes ou fragmentos funcionais das mesmas mostrem inibição reduzida de produto por metionina.

Assim, a presente invenção em uma modalidade refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que codificam polipeptídeos que são pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticos aos polipeptídeos sendo codificados por qualquer uma de SEQ ID Nos. 1 a 18 com a condição que estes polipeptídeos carregam pelo menos uma mutação nestas sequências de modo que as metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas resultantes ou fragmentos funcionais das mesmas mostrem inibição reduzida de produto por metionina.

Ainda outra modalidade da presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que são pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticas às sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA acima mencionadas.

Assim, em uma modalidade a presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que são pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo me-

nos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticas a, por exemplo, SEQ ID No. 23 ou SEQ ID No. 24 com a condição que as sequências nucleotídicas carregam adicionalmente pelo menos uma mutação de modo que as metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas resultantes ou fragmentos funcionais das mesmas mostram inibição reduzida de produto por metionina.

Em modalidades preferidas estas sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA são isoladas ou sequências nucleotídicas recombinantes e preferivelmente de DNA.

Outra modalidade da presente invenção refere-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA que hibridizam sob condições estritas para as sequências nucleotídicas acima mencionadas.

Outras modalidades da presente invenção referem-se a sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA codificando metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação com relação às sequências de tipo selvagem correspondentes, cuja atividade enzimática é de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e preferivelmente pelo menos um fator de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ou 1000 menos inibida na presença de 20 mM metionina comparado com a metionina sintases dependentes de cobalamina de tipo selvagem respectivas ou fragmentos funcionais das mesmas.

A presente invenção também refere-se a vetores que compreendem as sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA acima mencionadas em ligação operativa ao promotor e sequências de terminação de modo que estas sequências nucleotídicas possam ser expressadas em organismos hospedeiros.

Outras modalidades da presente invenção referem-se a polipeptídeos que são codificados por sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA acima mencionadas.

Ainda outra modalidade da presente invenção refere-se a células hospedeiras que compreendem as sequências nucleotídicas e preferivel-

mente de DNA acima mencionadas.

Em uma modalidade da presente invenção, estas células hospedeiras expressam sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA acima mencionadas, preferivelmente a partir de um dos vetores acima mencionados.

De acordo com uma outra modalidade da presente invenção, estas células hospedeiras são selecionadas dentre micro-organismos e leveduras. Em uma modalidade, o micro-organismo é selecionado dentre o grupo consistindo em por exemplo, bactérias corineformes, microbactérias, streptomycetaceae, salmonella, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *S. coel* ou *Thermotoga maritima*.

Apesar de qualquer célula hospedeira ou organismo hospedeiro de acordo com a presente invenção poder compreender as sequências nucleotídicas acima mencionadas e preferivelmente de DNA que codificam para metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas tendo inibição reduzida de produto por metionina, uma modalidade da presente invenção refere-se a células hospedeiras em que adicionalmente o(s) gene(s) endógeno(s) para metionina sintase dependente de cobalamina(s) é/são deletado (s) ou funcionalmente rompido(s).

Outras modalidades da invenção referem-se a células hospedeiras e organismos hospedeiros em que pelo menos uma das sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção é expressada em que a quantidade e/ou atividade de pelo menos um polipeptídeo sendo codificado pelas seguintes sequências nucleotídicas é aumentada em comparação com o organismo hospedeiro inicial correspondente:

- sequência nucleotídica codificando para aspartato quinase lysC,
- sequência nucleotídica codificando para glicerina aldeído-3-fosfato desidrogenase gap,
- sequência nucleotídica codificando para 3-fosfatoglicerato quinase pgk,
- sequência nucleotídica codificando para piruvatocarboxilase pyc,

- sequência nucleotídica codificando para triosefosfato isomerase tpi,
- sequência nucleotídica codificando para homosserina-O-acetiltransferase metA,
- 5 • sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-sintase metB,
- sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-liase metC,
- sequência nucleotídica codificando para serina-hidroximetil trans-ferase glyA,
- 10 • sequência nucleotídica codificando para O-acetil-homosserina-sulfidrilase metY,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatossarina amino-transferase serC,
- 15 • sequência nucleotídica codificando para fosfatossarina-fosfatase serB,
- sequência nucleotídica codificando para serina acetiltransferase cysE,
- sequência nucleotídica codificando para homosserina-desidrogenase hom,
- 20 • sequência nucleotídica codificando para metionina sintase metE,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatoadenosina-fosfatossulfato-redutase cysH,
- sequência nucleotídica codificando para sulfato adenilil transferase-subunidade 1,
- 25 • sequência nucleotídica codificando para CysN-sulfato adenilil transferase-subunidade 2,
- sequência nucleotídica codificando para ferredoxinae-NADP-redutase,
- 30 • sequência nucleotídica codificando para ferredoxinae,
- sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-desidrogenase, e/ou

- sequência nucleotídica codificando para frutose-1-6-bisfosfatase.

Outra modalidade da presente invenção refere-se a células hospedeiras e organismos hospedeiros em que uma das sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção é expressa e em que adicionalmente a quantidade e/ou atividade de pelo menos um polipeptídeo sendo codificados pelas seguintes sequências nucleotídicas é diminuída com relação ao organismo inicial correspondente:

- sequência nucleotídica codificando para homoserina quinase thrB,
- 10 • sequência nucleotídica codificando para treonina desidratase ilvA,
- sequência nucleotídica codificando para treonina sintase thrC,
- sequência nucleotídica codificando para meso-diaminopimelato-D-desidrogenase ddh,
- 15 • sequência nucleotídica codificando para fosfoenolpiruvato carboxi quinase pck,
- sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-6-isomerase pgi,
- sequência nucleotídica codificando para piruvato-oxidase poxB,
- 20 • sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato sintase dapA,
- sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato reductase dapB,
- sequência nucleotídica codificando para diaminopicolinato-descarboxilase lysA,
- 25 • sequência nucleotídica codificando para glicosil transferase e/ou
- sequência nucleotídica codificando para lactato hidrogenase.

Outro aspecto da invenção refere-se a células hospedeiras e organismos em que a eficiência e/ou rendimento e/ou quantidade de produção de metionina é aumentada por pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 30 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e preferivelmente pelo menos por um fator de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 ou 1000 em comparação com a célula hospedeira

ou organismo hospedeiro em que a sequência nucleotídica de acordo com a invenção é expressada.

Outras modalidades da presente invenção referem-se a métodos para produzir metionina em uma célula hospedeira ou organismo em que
 5 uma sequência de nucleotídeo e preferivelmente de DNA ou polipeptídeo de acordo com a invenção é expressada na célula hospedeira. Outras modalidades da presente invenção referem-se a métodos para produzir metionina em que se usa uma das células hospedeiras acima mencionadas.

Um aspecto da presente invenção refere-se a um método para
 10 produzir metionina em que uma das células hospedeiras acima mencionadas é cultivada e metionina é subsequentemente isolada. A presente invenção também refere-se ao uso das células hospedeiras acima mencionadas para produzir metionina e ao uso de sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção para produzir metionina e célu-
 15 las hospedeiras que são utilizáveis na produção de metionina.

Descrição dos desenhos

Figura 1 é um modelo da via para biossíntese de L-metionina em micro-organismos como *C. glutamicum*. Enzimas envolvidas são MetA (homoserina transacetilase), MetB (cistationa-gama-sintase), MetZ (O-acetil-
 20 homoserina sulfidrolase), MetC (cistationa-beta-liase), metionina sintase dependente de cob(I)alamina I (MetH) e metionina sintase independente de cob(I)alamina- II (MetE).

Figura 2 mostra um alinhamento de sequência da metionina sintases dependentes de cob(I)alamina de *C. glutamicum*, *S. coel*, *E. coli* e
 25 *Thermotoga maritima*.

Figura 3 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 1, a)) e sequência de DNA (SEQ ID No. 23, b)) de metionina sintase dependente de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum*.

Figura 4 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 2, b)) e
 30 sequência de DNA (SEQ ID No. 24, b)) do domínio de ligação de homocisteína de metionina sintase dependente de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum* compreendendo aminoácidos 1 a 244.

Figura 5 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID Nos. 3 a 18) de regiões conservadas dentro do domínio de ligação de homocisteína de metionina sintases dependentes de cob(I)alamina de *C. glutamicum*, *S. coel*, *E. coli* e *Thermotoga maritima*.

5 Figura 6 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 19, a)) e sequência de DNA (SEQ ID No. 25, b)) da metionina sintase dependente de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum* carregando uma mutação M33A.

 Figura 7 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 20, a)) e sequência de DNA (SEQ ID No. 26, b)) da metionina sintase dependente
10 de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum* carregando uma mutação M33L.

 Figura 8 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 21, a)) e sequência de DNA (SEQ ID No. 27, b)) da metionina sintase dependente de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum* carregando uma mutação F86L.

 Figura 9 mostra a sequência de aminoácido (SEQ ID No. 22, a))
15 e sequência de DNA (SEQ ID No. 28, b)) da metionina sintase dependente de cob(I)alamina MetH de *C. glutamicum* carregando uma mutação S134N.

Descrição detalhada de modalidades exemplares

Antes de descrever em detalhes as modalidades exemplares da presente invenção, as seguintes definições são dadas.

20 Os termos "sequências nucleotídicas de acordo com a presente invenção" e "sequências de DNA de acordo com a presente invenção" referem-se às sequências correspondentes como acima mencionado que codificam polipeptídeos sendo metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que mostram
25 uma inibição reduzida de produto por metionina. O termo "inibição reduzida de produto por metionina" será também definido abaixo. O termo "polipeptídeo" significa englobar proteínas e tipicamente refere-se a polipeptídeos com mais do que 20 aminoácidos.

 O termo "eficiência de síntese de metionina" descreve o rendimento de carbono de metionina. Esta eficácia é calculada como a porcentagem da entrada de energia que entra no sistema na forma de um substrato de carbono. Em toda esta invenção, este valor é dado em valores percentu-

ais ((mols de metionina) (mols de substrato de carbono)⁻¹ · 100), salvo especificado em contrário. As fontes preferidas de carbono de acordo com a presente invenção são açúcares, como mono-, di-, ou polissacarídeos. Por exemplo, açúcares selecionados dentre o grupo consistindo em glicose, frutose, manose, galactose, libose, sorbose, lactose, maltose, sacarose, rafinose, amido ou celulose podem servir como fontes de carbono particularmente preferidas.

O termo "eficiência aumentada de síntese de metionina" refere-se a comparação entre um organismo sendo uma célula hospedeira que foi geneticamente modificada para expressar sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção e que tem uma maior eficiência de síntese de metionina comparada com um organismo inicial que não expressa as sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção.

O organismo inicial que não expressa sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção pode ser um organismo de tipo selvagem. Alternativamente, ele pode ser um organismo que já tinha sido otimizado para a produção de metionina e assim super-expressa alguns genes da síntese de via metionina. Alternativamente, um organismo inicial que já tinha sido otimizado para a produção de metionina pode mostrar uma expressão reduzida para algumas enzimas da via metionina.

Os termos "via metionina" e "via de biossíntese de metionina" são reconhecidos na técnica e descrevem uma série de reações que ocorrem em um organismo de tipo selvagem e levam à biossíntese de L-metionina. Estas vias podem variar de organismo a organismo. Os detalhes de uma via específica de organismo podem ser adquiridos de livros de texto e da literatura científica no website da internet <http://www.genome.jp/kegg/metabolism.html>. Em particular, uma via metionina dentro do significado da presente invenção é mostrada em figura 1.

O termo "rendimento de metionina" descreve o rendimento de metionina que é calculado como uma quantidade de metionina obtida por

peso de massa celular.

Os termos "organismo", "organismo hospedeiro", "célula hospedeira" ou "micro-organismo" para os fins da presente invenção referem-se a qualquer organismo que é comumente usado para a produção de aminoácidos como metionina. Em particular, estes termos referem-se a procariotes, eucariotes inferiores e fungos. Um grupo preferido dos organismos acima mencionados compreende actino bactérias, ciano bactérias, proteo bactérias, *Chloroflexus aurantiacus*, *Pirellula sp. 1*, halo bactérias e/ou metanococos, preferivelmente bactérias corineformes, mico bactérias, estreptomices, salmonella, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *S. coel* ou *Thermotoga maritima*.

Os micro-organismos particularmente preferidos são selecionados dentre *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, micro-organismos do gênero *Bacillus*, particularmente *Bacillus subtilis*, micro-organismos do gênero *Streptomyces*, ou do gênero *Thermotoga*, particularmente *Thermotoga maritima*.

Os organismos da presente invenção podem, no entanto, também compreender leveduras como *Schizosaccharomyces pombe* ou *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Os termos "organismo superproduzindo L-metionina", "organismo superproduzindo metionina" ou "organismo produzindo metionina" para os fins da presente invenção referem-se a qualquer "organismo", "organismo hospedeiro" ou "micro-organismo" em que, comparado com um organismo inicial que não expressa sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção, a eficiência e/ou rendimento e/ou quantidade de produção de metionina, é aumentado pelo menos por 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou pelo menos por um fator de 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 500 e 1000 ou mais.

O termo "metabólito" refere-se a compostos químicos que são usados nas vias metabólicas de organismos como precursores, intermediários e/ou produtos finais. Estes metabólitos podem não somente servir como unidades de construção química, mas também podem exercer uma atividade

regulatória sobre as enzimas e sua atividade catalítica. Sabe-se a partir da literatura que estes metabólitos podem inibir e estimular a atividade de enzimas (Stryer, Biochemistry, (1995) W.H. Freeman & Company, New York, New York).

5 Para os fins da presente invenção, o termo "metabólito externo" compreende substratos como glicose, sulfato, tiosulfato, sulfito, sulfeto, amônia, oxigênio etc.

Se, no contexto da presente invenção, referência é feita ao teor de uma sequência nucleotídica ou o teor de um polipeptídeo codificado por
10 uma sequência nucleotídica, esta refere-se à quantidade de ácido nucleico e polipeptídeo sendo codificados por tais sequências nucleicas como elas podem ser determinadas para o organismo hospedeiro respectivo compreendendo estas sequências nucleotídicas ou polipeptídeos.

Se referência é feita à atividade de uma sequência nucleotídica,
15 esta tipicamente, para os fins da presente invenção, significa englobar a atividade do polipeptídeo ou proteína que é codificado por tal sequência nucleotídica.

Se, no contexto da presente invenção, afirma-se que a quantidade de sequência nucleotídica é aumentada com relação a um tipo selvagem ou organismo inicial, isto significa que a quantidade desta sequência
20 nucleotídica e a quantidade de polipeptídeo que é codificado pelo ácido nucleico são aumentadas em comparação com um organismo que não é geneticamente manipulado com relação a esta sequência nucleotídica ou de polipeptídeo específica. Isto pode ser obtido por introdução de uma sequência
25 nucleotídica exógena correspondente em um organismo hospedeiro e comparação então se referindo ao organismo hospedeiro expressando a sequência nucleotídica e o organismo inicial em que a sequência nucleotídica não foi introduzida. Alternativamente, a quantidade de sequência nucleotídica pode ser aumentada por manipulação de outras sequências regulatórias
30 ou as sequências endógenas dentro de um organismo.

Assim, aumentando a quantidade de uma sequência nucleotídica pode ser obtido por introdução de sequências exógenas ou manipulação

de sequências endógenas que são responsáveis para o nível de expressão das respectivas sequências nucleotídicas.

Se, no contexto da presente invenção, afirmar-se que a atividade de uma sequência nucleotídica é aumentada com relação a um organismo inicial, faz-se referência a uma situação onde tipicamente a atividade do polipeptídeo que é codificado por esta sequência nucleotídica é aumentada em comparação com o organismo inicial. O aumento da atividade pode ser obtido por aumento de uma quantidade de uma sequência nucleotídica, e/ou por introdução de mutações em sequências nucleotídicas codificando polipeptídeos com aumentada atividade.

Assim, aumentar a atividade de uma sequência nucleotídica e de polipeptídeo sendo codificada assim pode ser obtido ou por introdução de sequências nucleotídicas exógenas e/ou introdução de mutações nas sequências regulatórias e de codificação de sequências endógenas, que são responsáveis pela expressão de uma sequência de interesse.

Se no contexto da presente invenção, afirma-se que o teor (quantidade) e/ou atividade de uma sequência nucleotídica, e consequentemente do polipeptídeo sendo codificada assim, é diminuído em comparação com um organismo inicial, as definições acima devem ser aplicadas *mutatis mutandis*.

Os termos “expressar” “expressando,” “expressado” e “expressão” referem-se à expressão de um produto de gene (por exemplo, enzima biossintética de um gene de uma via ou reação definida e descrita neste pedido) ou uma sequência nucleotídica. A expressão pode ser feita por alteração genética de por exemplo, micro-organismo que é usado como um organismo de partida inicial. Em algumas modalidades, um micro-organismo pode ser geneticamente alterado (por exemplo, geneticamente engenheirado) para expressar um produto de gene como um polipeptídeo em um nível aumentado com relação ao produzido pelo micro-organismo inicial ou em um micro-organismo comparável que não foi alterado. A alteração genética é, mas não é limitada, uma alteração ou modificação de sequências regulatórias ou sítios associados com a expressão de um gene particular (por exem-

plo, por adição de promotores fortes, promotores indutíveis ou promotores múltiplos ou por remoção de sequências regulatórias, de modo que expressão é constitutiva), modificando o local cromossômico de um gene particular, alterando as sequências de ácido nucleico adjacentes a um gene particular como um sítio de ligação de ribossomas ou terminador de transcrição, aumentando o número de cópias de um gene particular, modificando proteínas (por exemplo, proteínas regulatórias, supressores, melhoradores, ativadores transcricionais, e similares) envolvidos na transcrição de um gene particular e/ou tradução de um produto de gene particular, ou qualquer outro meio convencional de desregulação da expressão de um gene particular usando técnicas de rotina (incluindo, mas não limitadas ao uso de moléculas de ácido nucleico antissenso, por exemplo, para bloquear a expressão de proteínas repressoras).

Os termos "superexpressar", "superexpressando", "superexpressado" e "superexpressão" referem-se à expressão de um produto de gene (por exemplo, enzima biossintética de metionina ou um gene ou uma via ou reação definida e descrita neste pedido) ou uma sequência nucleotídica em um nível maior do que o presente antes de uma alteração genética do micro-organismo inicial. Em algumas modalidades, um micro-organismo pode ser geneticamente alterado (por exemplo, geneticamente engenheirado) para expressar um produto de gene ou sequência nucleotídicas em um nível aumentado com relação ao produzido pelo micro-organismo inicial. A alteração genética inclui, mas não é limitada, uma alteração ou modificação de sequências regulatórias ou sítios associados com a expressão de um gene particular (por exemplo, por adição de promotores fortes, promotores indutíveis ou promotores múltiplos ou por remoção de sequências regulatórias, de modo que a expressão é constitutiva), modificando o local cromossômico de um gene particular, alterando as sequências de ácido nucleico adjacentes a um gene particular como um sítio de ligação de ribossomas ou terminador de transcrição, aumentando o número de cópias de um gene particular, modificando proteínas (por exemplo, proteínas regulatórias, supressores, melhoradores, ativadores transcricionais, e similares) envolvidos na transcrição de

um gene particular e/ou tradução de um produto de gene particular, ou qualquer outro meio convencional de desregulação da expressão de um gene particular usando técnicas de rotina (incluindo, mas não limitadas ao uso de moléculas de ácido nucleico antissenso, por exemplo, para bloquear a expressão de proteínas repressoras). Exemplos para a superexpressão de genes em organismos como *C. glutamicum* podem ser encontrados em Eikmanns et al (*Gene*. (1991) 102, 93-8).

Em algumas modalidades, um micro-organismo pode ser física ou ambientalmente alterado para expressar um produto de gene ou sequência nucleotídica em um nível aumentado ou menor com relação ao nível de expressão do produto de gene ou sequência nucleotídica pelo micro-organismo inicial. Por exemplo, um micro-organismo pode ser tratado ou cultivado na presença de um agente conhecido ou que se suspeita aumente transcrição de uma sequência nucleotídica particular e/ou a tradução de uma sequência nucleotídica particular de modo que a transcrição e/ou tradução são melhoradas ou aumentadas. Alternativamente, um micro-organismo pode ser cultivado a uma temperatura selecionada para aumentar a transcrição de uma sequência nucleotídica particular ou gene e/ou tradução de uma sequência nucleotídica particular ou produto de gene de modo que a transcrição e/ou tradução são melhoradas ou aumentadas.

Os termos “romper”, “rompido”, “ruptura”, “desregular,” “desregulado” e “desregulação” referem-se à alteração ou modificação de pelo menos um gene ou sequência nucleotídica em por exemplo, um micro-organismo, em que a alteração ou modificação resulta em crescente eficiência ou rendimento de produção de metionina no micro-organismo relativo à produção de metionina na ausência da alteração ou modificação. Em algumas modalidades, um gene ou sequência nucleotídica que é alterado ou modificado codifica uma enzima em uma via biossintética, de modo que o nível ou a atividade da enzima biossintética no micro-organismo é alterado ou modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um gene que codifica uma enzima em uma via biossintética é alterado ou modificado de modo que o nível ou a atividade da enzima é melhorada ou aumentada relativa ao nível na presen-

ça do gene não-alterado ou de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a via biossintética é a via biossintética de metionina. A desregulação também inclui alterar a região de codificação de um ou mais genes para dar, por exemplo, uma enzima que é resistente à realimentação ou que tem uma atividade específica maior ou menor. Também, a desregulação ainda engloba a alteração genética de genes codificando fatores transcricionais (por exemplo, ativadores, repressores) que regulam a expressão de genes na via biossintética de metionina e/ou cisteína.

A frase "via desregulada ou reação" refere-se a uma via biossintética ou reação em que pelo menos um gene que codifica uma enzima em uma via biossintética ou reação é alterado ou modificado de modo que o nível ou atividade de pelo menos uma enzima biossintética é alterada ou modificada. A frase "via desregulada" inclui uma via biossintética em que mais do que um gene foi alterado ou modificado, assim alterando o nível e/ou atividade dos correspondentes produtos de gene/enzimas. Em alguns casos, a capacidade para "desregular" a via (por exemplo, para desregular simultaneamente mais do que um gene em uma dada via biossintética) em um micro-organismo surge do fenômeno particular de micro-organismos em que mais do que uma enzima (por exemplo, duas ou três enzimas biossintéticas) são codificadas por genes ocorrendo adjacentes um ao outro ou em um pedaço contínuo de material genético chamado um "operon." Em outros casos, a fim de desregular a via, um número de genes deve ser desregulado em uma série de etapas de engenharia sequenciais.

O termo "operon" refere-se a uma unidade coordenada de material genético que contém um promotor e possivelmente um elemento regulatório associado com um ou mais, preferivelmente pelo menos dois genes estruturais (por exemplo, genes codificando enzimas, por exemplo, enzimas biossintéticas). Expressão dos genes estruturas pode ser regulada de modo coordenado, por exemplo, por proteínas regulatórias como ligando para o elemento regulatório ou por antiterminação de transcrição. Os genes estruturais podem ser transcritos para dar um único mRNA que codifica todas dentro as proteínas estruturadas. Devido à regulação coordenada de genes in-

cluídos em um operon, alteração ou modificação do promotor único e/ou elemento regulatório pode resultar em uma alteração ou modificação de cada produto de gene codificado pelo operon. Alteração ou modificação de um elemento regulatório inclui, mas não é limitada à remoção de promotor endógeno e/ou elemento(s) regulatório(s), adicionando promotores fortes, promotores indutíveis ou promotores múltiplos ou removendo as sequências regulatórias de modo que a expressão de produtos de gene é modificada, modificando o local cromossômico do operon, alterando as sequências de ácido nucleico adjacentes ao operon ou dentro do operon como um sítio de ligação de ribossoma, uso de códon, aumentando o número de cópias do operon, modificando proteínas (por exemplo, proteínas regulatórias, supressores, melhoradores, ativadores transcricionais e outros) envolvidas na transcrição do operon e/ou tradução dos produtos de gene do operon, ou quaisquer outros meios convencionais de desregulação da expressão de genes de rotina da técnica (incluindo, mas não limitados ao uso de moléculas antissenso de ácido nucleico, por exemplo, para bloquear a expressão de proteínas repressoras).

Em algumas modalidades, micro-organismos recombinantes descritos aqui foram geneticamente engenheirados para superexpressar um gene derivado de bactérias ou produto de gene. Os termos "derivado de modo bacteriano" e "derivado de bactérias" referem-se a um gene que é naturalmente encontrado em bactérias ou um produto de gene que é codificado por um gene bacteriano.

Os aminoácidos compreendem as unidades estruturais básicas de todas as proteínas, e como tal são essenciais para o funcionamento celular normal em organismos. O termo "aminoácido" é bem conhecido na técnica. Os aminoácidos proteinogênicos, dos quais se tem 20 espécies, servem como unidades estruturais para as proteínas, em que eles são ligados por ligações de peptídeo, enquanto os aminoácidos não-proteinogênicos não são normalmente encontrados em proteínas (ver Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry, Vol. A2, pags 57-97, VCH, Weinheim (1985)). Aminoácidos podem estar na conformação óptica D- ou L, apesar dos L-

aminoácidos serem geralmente o único tipo encontrado em proteínas de ocorrência natural. As vias biossintéticas e degradativas de cada um dos 20 aminoácidos proteinogênicos foram bem caracterizadas tanto em células procarióticas como eucarióticas (ver, por exemplo, Stryer, L. Biochemistry, 3a. edição, págs. 578-590 (1988)).

Os aminoácidos essenciais, isto é, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, que são geralmente uma exigência nutricional devido à complexidade de sua biossíntese, são prontamente convertidos por simples vias biossintéticas nos restantes 11 aminoácidos não essenciais, isto é, alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, Glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina.

Os animais superiores retêm a capacidade de sintetizar alguns destes aminoácidos, mas os aminoácidos essenciais devem ser supridos da dieta a fim de que a síntese normal de proteínas ocorra. Além de sua função na biossíntese de proteínas, estes aminoácidos são produtos químicos interessantes sozinhos, e podem ser verificados como tendo várias aplicações nas indústrias de rações, alimentos, químicos, cosméticos, agrícola e farmacêutica.

Lisina é um aminoácido importante na nutrição não apenas de humanos mas também de animais monogástricos, como as aves de criação e suínos. Glutamato é o mais comumente usado como um aditivo aromatizante e é amplamente usado em toda a indústria de alimentos, como o são aspartato, fenilalanina, glicina e cisteína. Glicina, L-metionina e triptofano são todos usados na indústria farmacêutica. Glutamina, valina, leucina, isoleucina, histidina, arginina, prolina, serina e alanina são de uso tanto nas indústrias farmacêutica como de cosméticos. Treonina, triptofano e D/L-metionina são aditivos comuns para rações (Leuchtenberger, W. (1996), Amino acids – technical production and use, p.466-502 em Rehm et al. (editores) Biotechnology, Vol. 6, Cap. 14a, VCH: Weinheim). Adicionalmente, estes aminoácidos foram verificados como sendo utilizáveis como precursores para a síntese de aminoácidos e proteínas sintéticos como N-acetil cisteína, S-carboximetil-L-cisteína, (S)-5-hidroxitriptofano e outros descritos em Ull-

mann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry, Vol. A2, p.57-97, VCH: Weinheim, 1985.

A biossíntese destes aminoácidos naturais em organismos capazes de produzir os mesmos, como bactérias, foi caracterizada (para uma
5 revisão de biossíntese de aminoácido bacteriano e regulação para o mesmo (ver Umbarger H.E. (1978), *Ann. Rev. Biochem.* 47:533-606). Glutamato é sintetizado por aminação redutiva de α -cetoglutarato, um intermediário no ciclo de ácido cítrico. Glutamina, prolina e arginina são cada subsequente-
mente produzidas a partir de glutamato. A biossíntese de serina é um pro-
10 cesso em três etapas começando com 3-fosfatoglicerato (um intermediário em glicólise), e resultando neste aminoácido após as etapas de oxidação, transaminação, e hidrólise. Tanto a cisteína como a glicina são produzidas a partir de serina; a primeira pela condensação de homocisteína com serina, e a última por transferência do átomo de carbono β de cadeia lateral em tetra-
15 hidrofolato, em uma reação catalisada por serina transhidroximetilase. Fenilalanina e tirosina são sintetizadas a partir da via glicolítica e pentose fosfato via precursores eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato em uma via biossintética de nove etapas que diferem somente nas duas etapas finais após a síntese de prefenato. Triptofano é também produzido a partir destas duas molé-
20 culas iniciais, mas sua síntese é uma via de onze etapas. Tirosina também pode ser sintetizada a partir de fenilalanina em uma reação catalisada por fenilalanina hidroxilase. Alanina, valina e leucina são, todas, produtos biossintéticos de piruvato, o produto final de glicólise. Aspartato é formado a partir de oxaloacetato, um intermediário do ciclo de ácido cítrico. Asparagina,
25 metionina, treonina e lisina são cada produzidas pela conversão de aspartato. Isoleucina pode ser formada partir de treonina. Uma via de nove etapas complexa resulta na produção de histidina a partir de 5-fosfatoribosil-1-pirofosfato, um açúcar ativado.

Os aminoácidos em excesso das necessidades de síntese de
30 proteína da célula não podem ser armazenados e são ao contrário degradados para prover intermediários para as vias metabólicas principais da célula (para revisão, ver Stryer, L., *Biochemistry*, 3a. ed., capítulo 21 "Amino acid

degradation and the urea cycle", p. 495-516 (1988)). Apesar de a célula ser capaz de converter aminoácidos indesejado dentro de intermediários metabólicos úteis, a produção de aminoácidos é onerosa em termos de energia, moléculas precursoras e as enzimas necessárias para a síntese dos mesmos.

A biossíntese de aminoácidos por ser regulada por inibição de realimentação em que a presença de um aminoácido particular serve para retardar ou completamente parar sua própria produção (para uma revisão de mecanismos de realimentação em vias biossintéticas de aminoácidos, ver Stryer, L., Biochemistry, 3a. ed. Capítulo 24: "Biosynthesis of amino acids and heme", p.575-600 (1988)). Se esta inibição de realimentação for mediada por um aminoácido formando o produto da reação ou via regulada, fala-se tipicamente de "inibição de produto". Assim, a produção de qualquer aminoácido particular é limitada por uma quantidade deste aminoácido presente na célula.

A bactéria de solo Gram-positiva *Corynebacterium glutamicum* é amplamente usada para a produção industrial de diferentes aminoácidos. Apesar da biossíntese de lisina e glutamato, os produtos industriais principais, ter sido estudada por muitos anos, o conhecimento sobre a regulação da via biossintética de metionina é limitada.

No entanto, pelo menos as enzimas chaves da via são conhecidas (ver figura 1). *C. glutamicum* ativa homosserina por acetilação com homosserina-O-acetiltransferase (MetA) (EC 2.3.1.31). Sabe-se, além disso, que tanto a transsulfuração e sulfidrilção direta são usadas para produzir homocisteína (Hwang et al. (2002), *J. Bacteriol.*, 184: 1277-86). Transsulfuração é catalisada por cistationina- γ -sintase (MetB) (EC 2.5.1.48) (Hwang et al. (1999) *Mol Cells*, 93: 300-8). Nesta reação, cisteína e O-acetil-homosserina são combinadas em cistationina, que é hidrolisada por cistationina- β -liase (MetC que é também conhecida como AecD) (EC 4.4.1.8) (Kim et al. (2001), *Mol. Cell*, 112:220-5, Ruckert et al. (2003), *vide supra*) converte O-acetil-homosserina e sulfeto dentro homocisteína e acetato. Finalmente, *C. glutamicum* tem duas enzimas diferentes para a S-metilação de homocis-

teína dando metionina (Lee et al. (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 625-6, 459,67; Ruckert et al. (2003), *vide supra*), isto é, uma metionina sintase I dependente de cob(I)alamina (MetH) (EC 2.1.1.13) e a metionina sintase II independente de cob(I)alamina (MetE) (EC 2.1.1.14). A primeira utiliza 5-
 5 metiltetra-hidrofolato e a última 5-metiltetra-hidropteroiltri-L-glutamato como o doador de metila.

Recentemente, uma proteína reguladora transcricional putativa da família TetR foi encontrada (Rey et al. (2003), *Journal of Biotechnology*, 103: 51-65). Este regulador foi demonstrado para reprimir a transcrição de
 10 vários genes pertencendo ao metabolismo de metionina e enxofre. O nocaute do gene da proteína reguladora levou a uma expressão aumentada de hom codificando homoserina desidrogenase, metZ codificando O-acetil-homoserina sulfhidrolase, metK codificando S-adenosilmetionina (SAM) sintase (EC 2.5.1.6), cysK codificando cisteína sintase (EC 2.5.1.47), cysI
 15 codificando uma sulfito redutase dependente de NADPH putativa, e finalmente ssuD codificando uma alcanossulfonato monooxigenase putativa. Rey et al. (*Molecular Microbiology* 2005, 56, 871-887) também verificou que o gene metB é significativamente induzido em uma cepa menos mcbR.

Com relação a metionina sintases dependentes de cob(I)alamina
 20 que, para os fins da presente invenção, são também designadas como metionina sintases dependentes de cobalamina ou MetH, foi demonstrado que a atividade desta enzima é inibida por seu produto, isto é, metionina (Banerjee et al. (1990), *Biochemistry*, 29:11101-11109).

Esta assim chamada "inibição de produto" de metionina prova-
 25 velmente completa a elevada necessidade de produção de metionina que foi calculada como requerendo uma entrada de energia de 7 mols de ATP e 8 mols de NADPH por molécula de metionina (Neidhardt et al. (1990) *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*, Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc.). assim, metionina é o único aminoácido
 30 com relação ao qual uma célula forneceu mais energia.

Como uma consequência deste fato, os organismos produzindo metionina têm evoluído vias metabólicas que estão sob o controle estrito

com relação à taxa e quantidade de síntese de metionina (Neidhardt (1996) *E. coli* e *S. typhimurium*, ASM Press Washington). Estes mecanismos de regulação incluem, por exemplo, mecanismos de controle de realimentação como a inibição de produto acima mencionada da atividade da metionina sintase dependente de cobalamina.

A inibição de produto da metionina sintase dependente de cobalamina cria um gargalo particular quando produzindo metionina superproduzindo micro-organismos, como esta enzima catalisa a última etapa na via de biossíntese de metionina. Assim, micro-organismos que foram otimizados com relação à expressão de outras enzimas envolvidas na via de biossíntese de metionina podem, por fim, demonstrar não serem utilizáveis para a produção eficiente de metionina, porque, mesmo que, por exemplo, quantidades elevadas de homocisteína terem se acumulado nestes micro-organismos, homocisteína não pode ser eficientemente metilada em metionina, como as células irão parar esta etapa enzimática uma vez que suficiente metionina foi produzida.

Como pode ser visto da figura 1, a metilação de homocisteína para metionina é catalisada por dois tipos de enzimas. A metionina sintase independente de cobalamina, que é também designada como MetE tendo em vista seus números de *turnover* tem uma capacidade catalítica bastante limitada (Gonzales et al. (1992) *Journal of Biology* 31:6045-6056). A sintase dependente de cobalamina, no entanto, parece ser um candidato muito bom para esta abordagem dado o seu número de *turnover* de cerca de 1500 min^{-1} (Gonzales et al. (1992) *vide supra*).

Um dos objetivos da presente invenção é resolver as limitações para a produção não-química de metionina em organismos. Estes e outros objetivos que se tornarão evidentes da descrição seguinte são resolvidos pelas reivindicações independentes. As modalidades preferidas são descritas nas reivindicações dependentes.

O núcleo da presente invenção repousa na descoberta surpreendente de que é possível produzir mutantes de metionina sintases dependentes de cobalamina em que a inibição da atividade enzimática pelo produ-

to metionina é significativamente reduzida.

Estes mutantes, que mostram inibição reduzida de produto, assim continuam a catalisar eficientemente a metilação de homocisteína em metionina em um modo dependente de cobalamina, mesmo quando os níveis de metionina são alcançados para que um micro-organismo passe geralmente a regular de modo negativo a atividade enzimática desta última etapa. Como estes mutantes desacoplam a atividade enzimática de metionina sintase dependente de cobalamina a partir do mecanismo de controle de realimentação de inibição de produto, eles permitem a construção de organismos hospedeiros que produzem metionina de modo contínuo e eficiente.

Apesar destes mutantes de metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa terem sido especificamente isolados para a enzima MetH de *C. glutamicum*, justifica-se considerar que mutantes correspondentes existam para as metionina sintases dependentes de cobalamina em outros organismos como *E.coli*, *S. coel* e *T. maritima*. isto é, apoiado pelo fato de que as metionina sintases dependentes de cobalamina de *E.coli*, *S. coel*, *C. glutamicum*, *Thermotoga maritima* mostrem um grau elevado de similaridade de sequência particularmente no domínio de ligação de homocisteína que é a região que foi identificada pela presente invenção como sendo a mais apropriada para a introdução de mutações que reduzem a inibição de produto de metionina sintases dependentes de cobalamina em *C. glutamicum*.

Antes dos mutantes de metionina sintase dependente de cobalamina específicos e preferidos serem descritos em maiores detalhes, uma visão é dada para as propriedades das metionina sintases dependentes de cobalamina em geral.

Metionina sintase dependente de cobalamina catalisa a transferência de um grupo metila a partir de metiltetra-hidrofolato em homocisteína gerando tetra-hidrofolato e metionina (Banerjee (1990) *vide supra*). O gene MetH de *E.coli* assim como de outros organismos incluindo *T. maritima*, *S. coel* e *C. glutamicum* foram clonados e, em alguns casos, caracterizados (Banerjee (1990) *vide supra*; Ludwig et al. (1997) *Annu. Rev. Biochem.*,

66:269-313; Yamada et al. (1999) *Journal of Biological Chemistry*, 274:33571-33576; Evans et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:3729-3736).

5 A enzima contém um grupo protético de cobalamina não covalentemente ligado que funciona como um intermediário na reação de metiltransferase. Durante a catálise os *shuttles* de enzima, entre os estados de E-metil cobalamina e E-cob(I)alamina, são alternadamente desmetilados por homocisteína e remetilados por metiltetra-hidrofolato.

10 Um teste para medir a atividade de metionina sintase é descrito na literatura (Drummond et al. (1995) *Analytical Biochemistry*, 228:323-329). Esta última referência é especificamente incorporada por referência, na medida em que descreve testes para a caracterização de metionina sintases dependentes de cobalamina. Assim as passagens começando na página 324, coluna à direita ("*Materials and Methods*") até a página 326, coluna à

15 esquerda ("*Results*") a referência de Drummond et al. formam parte da descrição deste pedido na medida em que estão relacionados aos testes não-radioativos para a caracterização de metionina sintases dependentes de cobalamina. O teste descrito por Drummond et al. pode ser usado para a determinação da influência do produto metionina sobre a atividade enzimática

20 de metionina sintases dependentes de cobalamina junto com as mesmas linhas como descrito pela referência acima mencionada de Banerjee et al. (1990) *vide supra* para testes radioativos em pág. 11102, coluna à esquerda ("*Experimental procedures*") até a página 11103, coluna à esquerda ("*Results*") e página 11103, coluna à direita ("*Inhibition of product data*") até a

25 página 11104, coluna à esquerda ("*Pre-steady-state kinetic analysis of catalysis*") e Tabela II da referência de Banerjee et al.. Como pode ser retirado da última referência metionina sintases dependentes de cobalamina são inibidas por metionina em um modo não competitivo.

30 A metionina sintase dependente de cobalamina de *E.coli* que é representativa para outras metionina sintases dependentes de cobalamina a partir de organismos como *C. glutamicum*, etc. é uma proteína modular consistindo em vários domínios.

Os primeiros 352 resíduos da enzima de *E. coli* compreendem uma região de ligação de homocisteína. Os resíduos 353 a 649 estão envolvidos na ligação de metiltetra-hidrofolato, enquanto os resíduos 650 a 896 ligam o cofator de cobalamina. Os resíduos de carboxi terminal 897 a 1227
5 são requeridos para ativação de cob(II)alamina oxidada e ligam adenosilmetila. Um fragmento de 71 kDa, que compreende resíduos 2 a 649, contém os domínios de ligação de homocisteína e metiltetra-hidrofolato e catalisa a transferência de metila para e proveniente da cobalamina exógena. O fragmento de 98 kDa compreende tanto as regiões de ligação de substrato acima mencionadas como o domínio de ligação de cobalamina e é capaz de
10 um *turnover* enzimático usando cofator de cobalamina endógena.

A presente invenção em seu núcleo refere-se a metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmentos funcionais da mesma com inibição reduzida de produto por metionina.

15 Como especificado acima, a presente invenção em uma modalidade refere-se a metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas que carregam pelo menos uma mutação em comparação com a respectiva sequência de tipo selvagem com a mutação tendo a consequência de que as metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas mudadas ou
20 fragmentos da mesma mostram inibição reduzida de produto por metionina.

O termo "fragmento funcional" refere-se a fragmentos de versões de comprimento completo de tipo selvagem de metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas que são capazes de catalisar a metilação de homocisteína em metionina em um modo dependente de
25 cobalamina e que adicionalmente carregam pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácido que efetua a inibição reduzida de produto por metionina.

Metionina sintases dependentes de cobalamina ou fragmentos
30 funcionais das mesmas de acordo com a invenção são assim preferivelmente consideradas para mostrar inibição reduzida afetada de produto se a inibição não competitiva da metilação de homocisteína com metiltetra-hidrofolato

pela enzima for influenciada em uma menor extensão por metionina do que para as metionina sintases dependentes de cobalamina de tipo selvagem respectivas ou fragmentos funcionais das mesmas.

De acordo com a presente invenção, metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas são particularmente considerados para mostrar inibição reduzida de produto por metionina se, como uma consequência da mutação em uma sequência de aminoácido, a inibição da atividade por metionina, e preferivelmente por aproximadamente 20 mM metionina for reduzida por pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e preferivelmente por pelo menos um fator de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais comparada com a atividade enzimática da enzima respectiva de tipo selvagem ou fragmento funcional da mesma.

Se a atividade enzimática de uma metionina sintase dependente de cobalamina de tipo selvagem ou um fragmento funcional da mesma for definida como 100%, metionina sintases dependentes de cobalamina ou fragmentos funcionais das mesmas com inibição reduzida de produto por metionina de acordo com a invenção mostram uma atividade aumentada na presença de metionina, e preferivelmente de aproximadamente 20 mM metionina de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e preferivelmente por pelo menos um fator de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais comparada com a atividade enzimática da enzima respectiva de tipo selvagem ou fragmento funcional da mesma.

A influência de metionina, e preferivelmente de aproximadamente 20 mM metionina sobre a atividade de ou metionina sintases dependentes de cobalamina de tipo selvagem enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas e metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas de acordo com a presente invenção que têm inibição reduzida de produto, pode ser determinada pelo teste como descrito por Drummond et al. (*vide supra*).

A título de exemplo, a metionina sintase dependente de cobalamina pode ser MetH de *C. glutamicum* e ter uma sequência de aminoácido

de SEQ ID NO. 1. Se uma versão de MetH de SEQ ID NO. 1 que adicionalmente carrega pelo menos uma mutação mostrar uma influência reduzida de metionina, e preferivelmente de aproximadamente 20 mM metionina sobre a atividade desta enzima sob as condições de teste acima, será considerada
5 como uma metionina sintase dependente de cobalamina com inibição reduzida de produto de acordo com a presente invenção. O mesmo deve se aplicar para um fragmento funcional de MetH.

Assim, metionina sintases dependentes de cobalamina de outros organismos como *E.coli*, *T. maritima*, *B. subtilis*, *S. coel* que mostram uma
10 homologia significativa para a enzima MetH de tipo selvagem de *C. glutamicum* e que adicionalmente carregam mutações que reduzem a inibição de produto destas enzimas em comparação com suas enzimas respectivas de tipo selvagem sob as condições de teste acima, serão também consideradas como metionina sintases dependentes de cobalamina com a
15 inibição reduzida de produto de acordo com a presente invenção.

De acordo com a presente invenção, uma homologia de sequência significativa entre duas moléculas de ácido nucleico ou dois polipeptídeos é geralmente entendida como indicando que as sequências nucleotídicas ou a sequência de aminoácidos, respectivamente, de, por exemplo, moléculas
20 de DNA ou proteínas são pelo menos 30%, pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, também preferivelmente pelo menos 80%, particularmente preferivelmente pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% e, o mais preferivelmente, pelo menos 99% idênticas. Adicionalmente, o termo
25 "homologia de sequência significativa" pode requerer que, por exemplo, 90% das sequências nucleotídicas idênticas codifiquem polipeptídeos com a mesma função, por exemplo, a metionina sintase dependente de cobalamina ou fragmento funcional da mesma.

A identidade de duas sequências nucleotídicas ou polipeptídeos
30 é entendida como sendo a identidade dos nucleotídeos ou aminoácidos sobre o comprimento completo respectivo das sequências nucleotídicas ou de polipeptídeos respectivamente. Identidade e Homologia podem ser calcula-

das usando o software laser gene de DNA Star, Inc., Madison, Wisconsin (USA) aplicando o método CLUSTAL (Higgins et al. (1989), *Comput. Appl. Bioch.*, 5(2):151). Homologias e identidades para as sequências de aminoácido e de ácido nucleico também podem ser calculadas usando algoritmos que são baseados em algoritmos por Niedelmann e Wunsch ou Smith e Waterman. Software que pode ser usado para estes fins são os programas Pil Aupa (J. Mol. Evolution (1987), 25, 351-360; Higgins et al. (1989) *Cabgos*, 5:151) ou os programas Gap e Bestfit (Niedelmann e Wunsch (1970), J. Mol. Biol., 48, 443-453 e Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.*, 2, 482-489). Para os fins de determinação da identidade das duas sequências, os parâmetros de default dos programas de software acima são usados.

Um exemplo de determinação de uma homologia de sequência significativa entre metionina sintases dependentes de cobalamina de diferentes organismos é provido por um alinhamento de sequência de figura 2.

Em uma modalidade da presente invenção, as mutações que levam à inibição reduzida de produto das metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas estão localizadas na região de ligação de homocisteína das proteínas. Para a metionina sintase dependente de cobalamina de *E.coli*, esta região foi mapeada em aminoácidos 1 a 251.

Está bem de acordo com o conhecimento geral do versado na técnica identificar domínios correspondentes em proteína que são relacionadas com a enzima de *E.coli*. Na figura 2, um alinhamento de sequência é mostrado para as metionina sintases dependentes de cobalamina com sequências de tipo selvagem para *C. glutamicum*, *E.coli*, *S. coel* e *T. maritima*. A partir de uma comparação, pode-se notar que os aminoácidos 1 a 251 da enzima de *E.coli* correspondem a aminoácidos 1 a 244 da enzima de *C. glutamicum*, aminoácidos 1 a 212 da enzima de *T. maritima* e aminoácidos 1 a 243 da enzima de *S. coel*.

Assim, uma modalidade da presente invenção refere-se a metionina sintases dependentes de cobalamina que carregam mutações em uma sequência que é significativamente homóloga a SEQ ID NO. 1 e que propor-

ciona uma inibição reduzida de produto. Em outras modalidades da presente invenção, as metionina sintases dependentes de cobalamina com inibição reduzida de produto de acordo com a presente invenção tem pelo menos uma mutação em pelo menos uma das seguintes sequências:

5 SEQ ID No 3:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}$

em que

$X_1 = S, V, R$; $X_2 = S, E, R$; $X_3 = E, A, Q$; $X_4 = F, L, V$; $X_5 = L, R, S$; $X_6 = D, E, A, K$; $X_7 = A, Q, L$; $X_8 = A, N, S$; $X_9 = N, T, E$; $X_{10} = H, R$

10 SEQ ID No 4:

$X_1X_2X_3X_4DGX_5X_6GTX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$

em que

$X_1 = V, I$; $X_2 = V, L$; $X_3 = I, V, L$; $X_4 = g, A, L$; $X_5 = A, G$; $X_6 = M, Y$; $X_7 = Q, M, E$; $X_8 = L, I, F$; $X_9 = Q, M$; $X_{10} = G, A, S, K$; $X_{11} = F, Q, Y$

15 SEQ ID No 5:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$

em que

$X_1 = L, P, Y$; $X_2 = D, T, N$; $X_3 = V, L, D, E$; $X_4 = E, D, A, L$; $X_5 = K, D, P$; $X_6 = F$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_7 = R$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_8 = G$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_9 = E$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_{10} = R$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_{11} = F$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_{12} = A$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_{13} = D$ exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; $X_{14} = D, W$ exceto em *T. marina*; $X_{15} = F, P$ exceto em *T. marina*

25 F, P exceto em *T. marina*

SEQ ID No 6:

$LX_1X_2X_3X_4PX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}HX_{11}X_{12}YX_{13}$

em que

$X_1 = N, V$; $X_2 = D, L, I$; $X_3 = T, S, K$; $X_4 = R, K, A$; $X_5 = D, E$; $X_6 = V, I$; $X_7 = L, V, I$; $X_8 = R, A, L$; $X_9 = Q, S, A, K$; $X_{10} = I, V$; $X_{11} = R, E, N$; $X_{12} = A, E, S$; $X_{13} = F, I$;

30

SEQ ID No 7:

$X_1X_2GX_3DX_4X_5X_6TNTFX_7X_8X_9$

em que

$X_1 = E, A; X_2 = A, S; X_3 = A, V, S; X_4 = L, C, I, V; X_5 = V, I; X_6 = E, L; X_7 = G, N; X_8 = C, A, S; X_9 = N, T;$

5 SEQ ID No 8:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_5X_6X_7X_8X_9$

em que

$X_1 = L, H, T, R; X_2 = P, S, I, M; X_3 = N, A, K; X_4 = L, M; X_5 = A, G, R; X_6 = D, E, K; X_7 = Y, H; X_8 = D, Q, G; X_9 = I, M, L;$

10 SEQ ID No 9:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}ARX_{15}X_{16}AX_{17}EX_{18}$

em que

$X_1 = A, P, E; X_2 = D, E, S; X_3 = R, L, K; X_4 = C, V, S, L; X_5 = R, H, A, D; X_6 = E, P; X_7 = L, I; X_8 = A, S, N, V; X_9 = Y, E, f, R; X_{10} = K, A, N; X_{11} = G, A; X_{12} = T, A, V; X_{13} = A, R, K; X_{14} = V, L, I; X_{15} = E, A, R; X_{16} = V, C, A; X_{17} = D, E; X_{18} = F, M, W, K$

SEQ ID No 10:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6RX_7$

em que

20 $X_1 = G$ exceto em *T. marina*, A, R exceto em *T. marina*; $X_2 = R, T$ exceto em *T. marina*; $X_3 = N, D, P$ exceto em *T. marina*; $X_4 = G, G, E$ exceto em *T. marina*; $X_5 = M, R, K$ exceto em *T. marina*; $X_6 = R, Q, P$ exceto em *T. marina*; $X_7 = F, W, Y$ exceto em *T. marina*;

SEQ ID No 11:

25 $VX_1GX_2X_3GPX_4X_5X_6X_7X_8X_9$

em que

$X_1 = V, L, A, F; X_2 = S, V, D; X_3 = L, M, I; X_4 = G, T; X_5 = T, N, G; X_6 = K, R, E; X_7 = L, T; X_8 = P, A; X_9 = S, T, Y;$

SEQ ID NO 12:

30 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}GX_{19}$

em que

$X_1 = F, Y; X_2 = >, T, D, E; X_3 = D, V, G, E; X_4 = L, F; X_5 = R, V, Y; X_6 = G, D,$

A, E; X₇ = H, A, N; X₈ = Y, E; X₉ = K, Q, R; X₁₀ = E, R; X₁₁ = A, N, S, T; X₁₂ = A, T, V; X₁₃ = L, E, K; X₁₄ = G, A, I; X₁₅ = I, L, M; X₁₆ = I, V; X₁₇ = E, A, E; X₁₈ = G, E; X₁₉ = G, A, V

SEQ ID No 13:

5 DX₁X₂X₃X₄ET

em que

X₁ = A, L, G; X₂ = F, L, I; X₃ = L, I; X₄ = I, V, F

SEQ ID NO 14:

X₁DX₂LX₃X₄KAX₅VX₆X₇X₈X₉

10 em que

X₁ = Q, F, S; X₂ = L, T, I; X₃ = Q, N, E; X₄ = V, T, A, L; X₅ = A, S; X₆ = H, L, F; X₇ = G, A; X₈ = V, A; X₉ = Q, R, K

SEQ ID No 15:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁T

15 em que

X₁ = L, V; X₂ = D, G, S; X₃ = T, L, V, R; X₄ = F, D, E; X₅ = L, V; X₆ = P, F; X₇ = I, L; X₈ = I, M; X₉ = C, V, I, A; X₁₀ = H, S; X₁₁ = V, G, M

SEQ ID No 16:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈LX₉GX₁₀X₁₁

20 em que

X₁ = V, I, F; X₂ = E, T, D; X₃ = T, D, E; X₄ = T, A, K; X₅ = G, S; X₆ = G exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₇ = T, R; X₈ = M, T, S; X₉ = M, L, S, T; X₁₀ = S, Q, T; X₁₁ = E, T, D

SEQ ID No 17:

25 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇

em que

X₁ = G, E, A; X₂ = A, N; X₃ = A, F; X₄ = L, Y, A; X₅ = T, N, I; X₆ = A, S, T; X₇ = L, F

SEQ ID No 18:

30 X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇GX₈NCX₉X₁₀GPX₁₁E

em que

X₁ = P, H, E; X₂ = L, A; X₃ = G, E, D; X₄ = I, A; X₅ = D, L; X₆ = M, T, A; X₇ = I,

F, L; $X_8 = L, I$; $X_9 = A, S$; $X_{10} = T, L$; $X_{11} = D, A, E$

No contexto da presente invenção o termo "mutação" com relação a uma sequência de aminoácido refere-se a uma substituição, inserção ou deleção de aminoácido na sequência de tipo selvagem de metionina sintases dependentes de cobalamina ou fragmentos funcionais das mesmas com a exigência de que a mutação mude uma atividade enzimática de modo que o polipeptídeo resultante ainda é capaz de catalisar a transferência de um grupo metila a partir de metiltetra-hidrofolato para homocisteína em um modo dependente de cobalamina, com a enzima mudada ou fragmento funcional da mesma tendo inibição reduzida de produto por metionina como definido acima.

O versado na técnica será capaz de introduzir mutações por exemplo, na sequência de aminoácidos SEQ ID Nos. 1 a 18 acima mencionado e, por exemplo, se basear no este descrito acima, será capaz de determinar se os polipeptídeos resultantes são enzimaticamente ativos e mostram inibição reduzida de produto na presença por metionina.

Para tais mutações, o versado na técnica irá considerar em particular substituições de aminoácido não-conservativas, significando que o aminoácido de tipo selvagem aminoácido é substituído com um aminoácido de propriedades físico-químicas diferentes. Por exemplo, se a sequência de tipo selvagem compreende um aminoácido carregado como aspartato, uma substituição não conservativa irá incluir a substituição do aspartato para um aminoácido positivamente carregado como lisina. Alternativamente, um aminoácido negativamente carregado como ácido aspártico ou ácido glutâmico pode ser substituído por um aminoácido neutro como Glutamina, arginina ou metionina. O versado na técnica irá, como evidente, também considerar substituições conservativas de aminoácido, isto é, substituição por aminoácidos com propriedades físico-químicas comparáveis. Um exemplo é a substituição de Valina por Leucina.

Uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma que carrega a mutação em comparação com as sequências de tipo selvagem respectivas não é consi-

derada como sendo um polipeptídeo de acordo com a invenção porque ele não demonstra uma inibição reduzida de produto por metionina como pode ser determinado pelo teste acima mencionado. Os polipeptídeos mudados também não são considerados como formando parte da invenção se eles
5 não forem enzimaticamente ativos. Isto também se aplica para uma sequência nucleotídica codificando estes polipeptídeos.

A nomenclatura usada em todo este relatório para os aminoácidos é o código de uma letra comum.

Com relação à SEQ ID NOS. 3 a 18, "mutação" no caso de
10 substituição de aminoácido significa que o aminoácido de uma posição especificada pode ser substituído com qualquer aminoácido que não é especificado para esta posição particular. Por exemplo, para SEQ ID NO. 3, X₁ é especificado como sendo S, V ou R. Uma mutação pode assim compreender qualquer substituição de aminoácido que não é S, V, R. Similarmente, resí-
15 duo X₄ de SEQ ID NO. 4, que é G, A, L, pode ser substituído por qualquer aminoácido que não é G, A, L.

O versado na técnica sabe bem que para qualquer tipo de substituição, deleção ou inserção de aminoácido, será necessário determinar se o polipeptídeo resultante é (i) enzimaticamente ativo e (ii) mostra a inibição
20 reduzida de produto da atividade enzimática na presença de metionina.

As explicações acima do termo "mutação" como dadas para a sequência de aminoácidos correspondentemente se aplicam para as sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA codificando estes polipeptídeos.

25 As formas específicas de realização da presente invenção no caso da metionina sintase dependente de cobalamina MetH de *C. glutamicum* incluem mutações em posições 33, 86 e 134, em que a sequência de resíduos de tipo selvagem são metionina, fenilalanina e serina, respectivamente.

30 No caso de posição 33, a metionina podem ser mudada para glicina ou alanina. No caso da fenilalanina de posição 86, fenilalanina podem ser mudada em leucina. No caso de resíduo serina em posição 134, o resí-

duo pode ser mudado em asparagina. As sequências de aminoácidos correspondentes são mostradas em SEQ ID Nos. 19 a 22 respectivamente, enquanto as sequências de DNA correspondentes são mostradas em SEQ ID Nos. 25 a 28.

5 O versado na técnica irá realizar que as mutações correspondentes podem ser introduzidas em por exemplo, o resíduo 34 de metionina da enzima de *S. coel*, o resíduo 22 de metionina da enzima de *E.coli* e o resíduo de tirosina em posição 22 da enzima de *Thermotoga*. Com relação a posição 86 de fenilalanina da enzima de *C. glutamicum*, mutações correspondentes no sistema de *E.coli* podem estar localizadas no resíduo 91 de fenilalanina, na enzima de *S. coel* no resíduo 86 de fenilalanina e a enzima de *Thermotoga maritimum* no resíduo 76 de fenilalanina.

Com relação a serina 134 resíduo na enzima de *C. glutamicum*, mutações correspondentes na enzima de *S. coel* devem estar localizadas em serina 134, na enzima de *E.coli* no resíduo 131 de valina e na enzima de *Thermotoga* no resíduo 124 de aspartato.

Nestes casos, os resíduos correspondentes podem ser mudados dentro glicina e alanina para os resíduos de metionina/tirosina, em leucina para o resíduo de fenilalanina e em asparagina para o resíduo de serina, valina ou aspartato.

Correspondentemente, em vez de substituição de aminoácido, metionina sintases dependentes de cobalamina com inibição reduzida de produto de acordo com a presente invenção podem ter deleções nas posições acima mencionadas, ou inserções adicionais.

25 Outras modalidades da presente invenção são sequências nucleotídicas e particularmente sequências de DNA que codificam os polipeptídeos e proteínas acima mencionados. Algumas modalidades da presente invenção referem-se a tais sequências de DNA em uma forma isolada.

30 Outras modalidades da presente invenção referem-se a vetores que compreendem em direção 5'-3':

a) uma sequência de promotor sendo funcional para expressão de sequências nucleotídicas em uma célula hospedeira

b) operativamente ligada aos mesmos uma sequência de nucleotídeo e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção, e

c) operativamente ligada aos mesmos uma sequência de terminação.

5 De acordo com a presente invenção, ligação operativa de um promotor, uma sequência nucleotídica de acordo com a presente invenção e uma sequência de terminação significam que as sequências nucleotídicas de acordo com a presente invenção podem ser expressadas em uma célula hospedeira de modo que a célula hospedeira expressa um metionina sintase
10 dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou um fragmento funcional da mesma que mostra a inibição reduzida de produto por metionina como definido acima.

Em uma modalidade preferida, estes vetores compreendem alguns promotores e opcionalmente elementos melhoradores para permitir a
15 superexpressão de, por exemplo, sequências de DNA codificando os polipeptídeos e proteínas acima mencionados. As modalidades específicas para expressão e superexpressão de sequências de DNA são explicadas abaixo.

Assim, outra modalidade da presente invenção refere-se a células hospedeiras que compreendem sequências nucleotídicas e preferivel-
20 mente de DNA ou vetores, como foi descrito acima.

Por geneticamente emendando organismos de acordo com a presente invenção, a eficiência e/ou rendimento e/ou quantidade de síntese de metionina podem ser aumentada de modo que estes organismos super-
25 produzindo metionina são caracterizados em que metionina é produzida com uma eficiência aumentada e/ou rendimento aumentado e/ou quantidade aumentada de preferivelmente pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100% comparado com um organismo inicial que não expre-
30 sa as sequências nucleotídicas de acordo com a presente invenção.

Comparado com este organismo hospedeiro inicial, a eficiência e/ou o rendimento e/ou a quantidade de produção de metionina no organis-

mo hospedeiro produzindo metionina de acordo com a presente invenção pode aumentar preferivelmente pelo menos por um fator de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30, 50, 70, 100, 200, 500 ou pelo menos por um fator de 1000.

O organismo hospedeiro de acordo com a presente invenção
5 pode ser selecionado dentre o grupo consistindo em bactérias corineformes, micobactérias, streptomycetes, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *S. coel* ou *T. maritima*.

Os organismos da presente invenção podem preferivelmente compreender um micro-organismo do gênero *Corynebacterium*, particularmente *Corynebacterium acetoacidophilum*, *C. acetoglutamicum*, *C. acetophilum*, *C. ammoniumgenes*, *C. glutamicum*, *C. lilium*, *C. nitrilophilus* ou *C. spec*.
10

Os organismos de acordo com a presente invenção também compreendem membros do gênero *Brevibacterium*, como *Brevibacterium harmoniagenes*, *Brevibacterium botanicum*, *B. divaraticum*, *B. flavum*, *B. helveticum*, *B. ketoglutamicum*, *B. ketosoreductum*, *B. lactofermentum*, *B. linens*, *B. paraphinolyticum* e *B. spec*.
15

Os organismos de acordo com a presente invenção também compreendem *S. coel*.

Os organismos de acordo com a presente invenção também compreendem membros do gênero *Thermotoga*, como *T. maritima*.
20

Em particular, micro-organismos *Corynebacterium* podem ser selecionados dentre o grupo consistindo em *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium acetoglutamicum* (ATCC 15806), *Corynebacterium acetoacidophilum* (ATCC 13870), *Corynebacterium thermoammonigenes* (FERM BP-1539), *Corynebacterium melassecola* (ATCC 17965), *Corynebacterium glutamicum* (KFCC10065), *Corynebacterium glutamicum* (DSM 17322), *Corynebacterium efficiens* (YS-314) e *Corynebacterium glutamicum* (ATCC21608).
25

Particularmente preferida é a cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 e todos os seus derivados. As cepas ATCC 13286, ATCC 13287, ATCC 21086, ATCC 21127, ATCC 21128, ATCC 21129, ATCC 21253, ATCC 21299, ATCC 21300, ATCC 21474, ATCC 21475, ATCC
30

21488, ATCC 21492, ATCC 21513, ATCC 21514, ATCC 21515, ATCC 21516, ATCC 21517, ATCC 21518, ATCC 21528, ATCC 21543, ATCC 21544, ATCC 21649, ATCC 21650, ATCC 21792, ATCC 21793, ATCC 21798, ATCC 21799, ATCC 21800, ATCC 21801, ATCC 700239, ATCC 5 21529, ATCC 21527, ATCC 31269 e ATCC 21526 que são conhecidas como produzindo lisina também podem ser preferivelmente usadas. As outras cepas acima mencionadas também podem ser usadas.

A abreviatura KFCC significa Korean Federation of Culture Collection, enquanto a abreviatura ATCC significa American Type Strain Culture 10 Collection. A abreviatura DSM significa German Resource Centre for Biological Material.

Micro-organismos do gênero *Escherichia* podem ser selecionados dentre o grupo compreendendo *Escherichia coli*. Micro-organismos do gênero *Salmonella* podem ser selecionados dentre o grupo compreendendo 15 *Salmonella typhimurium*.

Estes organismos hospedeiros podem ser engenheirados por introdução de sequências nucleotídicas exógenas de acordo com a presente invenção, por exemplo, na forma de vetores.

Além disso, ou alternativamente, mutações como as descritas 20 acima que efetuam uma inibição reduzida de produto podem ser introduzidas nas sequências de codificação endógenas para metionina sintases dependentes de cobalamina.

Além disso, a modalidade da presente invenção refere-se a células hospedeiras em que sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA 25 de acordo com a presente invenção que codificam para metionina sintases dependentes de cobalamina enzimaticamente ativas ou fragmentos funcionais das mesmas tendo uma inibição reduzida de produto na presença de metionina são expressadas e em que adicionalmente o(s) gene(s) endógeno(s) para metionina sintase(s) dependente(s) de cobalamina é/são deletado 30 (s) ou funcionalmente rompido(s).

O termo "deletado" ou "ruptura funcional" é, para os fins da presente invenção, equivalente à descrição de que o teor e/ou a atividade das

metionina sintases dependentes de cobalamina como elas são codificadas pelos genes endógenos do organismo hospedeiro são reduzidos.

Como uma redução do teor e/ou da atividade e correspondentemente a deleção e/ou a ruptura funcional destes genes endógenos para metionina sintases dependentes de cobalamina pode ser obtida é descrita abaixo.

Outras modalidades da presente invenção referem-se a células hospedeiras em que sequências de DNA de acordo com a presente invenção, isto é, codificando metionina sintases dependentes de cobalamina ou fragmentos das mesmas com uma inibição reduzida de produto na presença de metionina são expressadas e em que o teor e/ou a atividade de pelo menos uma das seguintes sequências nucleotídicas do grupo I é aumentada em comparação com o organismo inicial respectivo:

- sequência nucleotídica codificando para aspartato quinase lysC (EP 1 108 790 A2;
- DNA (SEQ ID No. 281),
- sequência nucleotídica codificando para aspartato semialdeído desidrogenase asd (EP 1 108 790 A2; DNA SEQ ID No. 282),
- sequência nucleotídica codificando para glicerina aldeído-3-fosfato desidrogenase gap (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology*, 174: 6076-6086),
- sequência nucleotídica codificando para 3-fosfatoglicerato quinase pgk (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology*, 174: 6076-6086),
- sequência nucleotídica codificando para piruvato carboxilase pyc (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology*, 174: 6076-6086),
- sequência nucleotídica codificando para triosefosfato isomerase tpi (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology*, 174: 6076-6086),
- sequência nucleotídica codificando para homosserina-O-acetil transferase metA (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 725),
- sequência nucleotídica codificando para cistahionina gama sintase metB (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3491),
- sequência nucleotídica codificando para cistahionina gama liase metC

(EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3061),

- sequência nucleotídica codificando para serina hidroximetil transferase glyA (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 1110),
- sequência nucleotídica codificando para O-acetil-homosserina sulfidri-
5 lase metY (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 726),
- sequência nucleotídica codificando para metilenotetra-hidrofolato re-
dutase metF (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 2379),
- sequência nucleotídica codificando para fosfatossarina amino transfe-
rase serC (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 928),
- 10 • sequência nucleotídica codificando para fosfatossarina fosfatase serB
(EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 334, DNA SEQ ID No. 467, DNA SEQ ID
No. 2767),
- sequência nucleotídica codificando para serina acetil transferase cysE
(EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 2818),
- 15 • sequência nucleotídica codificando para homosserina desidrogenase
hom (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 1306),
- sequência nucleotídica codificando para metionina sintase metE (nú-
mero de acesso do banco de genes NCgl1094),
- sequência nucleotídica codificando para cisteína sintase (número de
20 acesso do banco de genes NP_601760, NP_601337, NCgl2473, NCgl2055),
- sequência nucleotídica codificando para sulfito redutase (número de
acesso do banco de genes NP_602008, NCgl2718)
- sequência nucleotídica codificando para fosfato adenosina fosfatos-
sulfato redutase (número de acesso do banco de genes NP_602007, NC-
25 gl2717),
- sequência nucleotídica codificando para sulfato adenilil transferase
subunidade 1 (número de acesso do banco de genes NP_602005, NC-
gl2715),
- sequência nucleotídica codificando para CysN-sulfato adenilil transfe-
rase subunidade 2 (número de acesso do banco de genes NP_602006, NC-
30 gl2716),
- sequência nucleotídica codificando para ferredoxina NADP redutase

(número de acesso do banco de genes NP_602009, NCgl2719),

- sequência nucleotídica codificando para ferredoxina (número de acesso do banco de genes NP_602010, NCgl2720),
- sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato desidrogenase (número de acesso do banco de genes NP_600790, NCgl1514), e/ou
- sequência nucleotídica codificando para frutose-1-6-bisfosfatase (número de acesso do banco de genes NP_601294, NCgl2014).

Como evidente, estes organismos hospedeiros podem mostrar um teor e/ou atividade aumentados de sequências nucleotídicas que mostram uma homologia significativa como definido acima para qualquer uma das sequências nucleotídicas acima mencionadas. Novamente, o termo “homologia de sequência significativa” requer que estas sequências nucleotídicas codifiquem polipeptídeos que têm a atividade enzimática respectiva.

Em outras modalidades da presente invenção, o organismo hospedeiro pode compreender sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a invenção que codificam metionina sintases dependentes de cobalamina ou ativas ou fragmentos das mesmas com inibição reduzida de produto na presença de metionina e adicionalmente proveem um teor e/ou uma atividade reduzida de pelo menos uma das seguintes sequências nucleotídicas de grupo II:

- sequência nucleotídica codificando para homosserina quinase thrB (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3453),
- sequência nucleotídica codificando para treonina desidratase ilvA (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 2328),
- sequência nucleotídica codificando para treonina sintase thrC (EP 108 790; DNA SEQ ID No. 3486),
- sequência nucleotídica codificando para meso diaminopimelat-D-desidrogenase ddh (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3494),
- sequência nucleotídica codificando para fosfoenol piruvato carboxiquinase pck (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3157),
- sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-6-isomerase pgi (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 950),

- sequência nucleotídica codificando para piruvato oxidase poxB (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 2873),
- sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato sintase dapA (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3476),
- 5 • sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato redutase dapB (EP 1 108 790; DNA SEQ ID No. 3477),
- sequência nucleotídica codificando para diaminopicolinato-descarboxilase lysA (EP 1 108 790 A2; DNA SEQ ID No. 3451),
- sequência nucleotídica codificando para glicosil transferase (número
- 10 de acesso do banco de genes NP_600345 e NCgl1072) e/ou
- sequência nucleotídica codificando para lactato desidrogenase (número de acesso do banco de genes NP_602107, NCgl2817).

O aumento e/ou a diminuição no teor e/ou na atividade das sequências nucleotídicas acima mencionadas de grupos I e II em comparação com o organismo de tipo selvagem ou inicial respectivo pode chegar a pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100%. Comparado com estes organismos hospedeiros iniciais, o aumento e/ou a diminuição no

20 teor e/ou na atividade das sequências nucleotídicas de grupos I e II acima mencionadas de acordo com a presente invenção podem chegar também preferivelmente a pelo menos um fator de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30, 50, 70, 100, 200, 500 ou pelo menos um fator de 1000.

Assim, todas as células hospedeiras e organismos de acordo com a presente invenção são caracterizados em que eles compreendem e preferivelmente superexpressam pelo menos uma sequência nucleotídica e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção que codifica uma proteína ou polipeptídeo que é uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma mostrando uma inibição reduzida de produto na presença de metionina como

30 definido acima. Estes polipeptídeos ou proteínas irão geralmente carregar pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácido em comparação

com a sequência de aminoácido de tipo selvagem respectiva que é responsável pela inibição reduzida de produto por metionina. Além disso, estas células hospedeiras podem mostrar um aumento e/ou uma diminuição no teor e/ou na atividade de qualquer uma das sequências nucleotídicas como especificado acima para grupo I e grupo II.

Alternativamente, ou além disso, estas células hospedeiras podem mostrar uma deleção ou ruptura funcional dos genes endógenos codificando para metionina sintases dependentes de cobalamina de tipo selvagem. Estas células hospedeiras podem ser selecionadas dentre os organismos especificados acima e produzidos de acordo com os métodos descritos abaixo.

Outras modalidades da presente invenção referem-se a métodos para produzir metionina em uma célula hospedeira, em que pelo menos uma sequência nucleotídica e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção, isto é, a sequência que codifica um polipeptídeo ou proteína que é uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma com inibição reduzida de produto na presença de metionina como uma consequência de uma mutação em uma sequência de aminoácido, é expressada em um organismo hospedeiro. Estas células hospedeiras podem ser cultivadas sob condições apropriadas e a metionina produzida ser recuperada. Estes métodos também proveem uma eficiência e/ou um rendimento aumentados de metionina em comparação com o organismo de partida respectivo.

Outras modalidades da presente invenção referem-se ao uso de sequências nucleotídicas e preferivelmente de DNA de acordo com a presente invenção e células hospedeiras de acordo com a presente invenção para produzir metionina e/ou aumentar a eficiência e/ou o rendimento de produção de metionina.

Com relação ao aumento ou à diminuição da quantidade e/ou atividade de sequências nucleotídicas e de polipeptídeos sendo codificados assim, todos os métodos que são conhecidos na técnica para aumentar ou diminuir a quantidade e/ou a atividade de sequência nucleotídica e/ou um

polipeptídeo em um hospedeiro como os organismos acima mencionados podem ser usados. Estes métodos são descritos também em detalhes abaixo. Estes métodos também podem ser usados para expressar a sequência de DNA de acordo com a presente invenção, isto é, a sequência de DNA codificando a metionina sintase dependente de cobalamina com inibição re-

5 reduzida de produto na presença de metionina como uma consequência da mutação em uma sequência de aminoácido.

Aumentando ou introduzindo uma quantidade e/ou atividade de sequências nucleotídicas e/ou polipeptídeos de acordo com a invenção e do

10 *grupo I*

Com relação ao aumento da quantidade, dois cenários básicos podem ser diferenciados. No primeiro cenário, a quantidade do polipeptídeo é aumentada por expressão de uma versão exógena da sequência nucleotídica respectiva. No outro cenário, a expressão do polipeptídeo endógeno é

15 aumentada por influência da atividade de elementos promotores e/ou melhoradores e/ou outras atividades regulatórias como fosforilação, sumoilação, ubiquitilação, etc. que regulam as atividades dos polipeptídeos respectivos ou em um nível transcricional, translacional ou pós-translacional.

Além de simplesmente aumentar a quantidade de, por exemplo, sequências nucleotídicas acima mencionadas, a atividade dos polipeptídeos de, por exemplo, grupo I pode ser aumentada usando enzimas carregando mutações específicas que permitem uma atividade aumentada da enzima. Estas mutações podem, por exemplo, inativar as regiões de uma enzima que são responsáveis para a inibição de realimentação. Ao mudar estas por, por

20 exemplo, introdução de mutações não-conservativas, a enzima não poderia prover uma regulação de realimentação mais e, assim, a atividade da enzima não poderia ser regulada de modo negativo se mais produto fosse produzido. Estas mutações podem ser ou introduzidas dentro da cópia endógena da enzima, ou podem ser providas por superexpressão de uma forma de

25 mutante correspondente da enzima exógena. Estas mutações podem compreender mutações por pontos, deleções ou inserções. As mutações por pontos podem ser conservativas ou não-conservativas. Além disso, deleções

30

podem compreender somente dois ou três aminoácidos até os domínios completos da proteína respectiva. Como evidente, polipeptídeos de acordo com a invenção, isto é, metionina sintases dependentes de cobalamina ou fragmentos funcionais das mesmas com inibição reduzida de produto, podem ser expressados por expressão de sequências nucleotídicas exógenas correspondentes ou por introdução da(s) mutação(s) que leva à inibição reduzida de produto nos genes endógenos.

Assim, o aumento da atividade e da quantidade de um polipeptídeo pode ser obtido por vias diferentes, por exemplo, por desligamento dos mecanismos regulatórios inibitórios no nível de transcrição, translação de proteínas ou por aumento de expressão de gene de um ácido nucleico codificando para estas proteínas em comparação com o organismo de partida, por exemplo, por manipulação do gene endógeno ou por introdução dos ácidos nucleicos codificando para o polipeptídeo.

Em uma modalidade, o aumento da atividade e da quantidade de um polipeptídeo, respectivamente, em comparação com o organismo inicial é alcançado por um aumento na expressão de um ácido nucleico codificando estes polipeptídeos. Sequências podem ser obtidas a partir da base de dados respectiva, por exemplo, em NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL (<http://www.embl.org/>), ou Expasy (<http://www.expasy.org/>).

Em ainda outra modalidade, o aumento de uma quantidade e/ou de uma atividade dos polipeptídeos acima mencionados é obtido por introdução dos ácidos nucleicos correspondentes dentro do organismo, preferivelmente *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* ou *T. maritima*.

Em princípio, cada proteína de organismos diferentes com uma atividade enzimática dos polipeptídeos acima mencionados pode ser usada. Com sequências genômicas de ácido nucleico destas enzimas a partir de fontes eucarióticas contendo íntrons, as sequências de ácido nucleico já processadas, do tipo dos cDNAs correspondentes, devem ser usadas no caso em que o organismo hospedeiro não é capaz ou não pode ser tornado capaz de emendar os mRNAs correspondentes. Todos os ácidos nucleicos mencionados na descrição podem ser, por exemplo, uma sequência de RNA,

DNA ou cDNA.

Em um método de acordo com a presente invenção para produzir metionina, a sequência de ácido nucleico codificando para uma das metionina sintases dependentes de cobalamina acima mencionadas ou fragmentos funcionais das mesmas com inibição reduzida de produto por metionina é transferida para um micro-organismo como *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* ou *T. maritima*, respectivamente. Esta transferência leva a um aumento na expressão da enzima mudada, e correspondentemente a síntese de metionina aumentada.

De acordo com a presente invenção, o aumento e/ou a introdução de uma quantidade e/ou a atividade do polipeptídeo tipicamente compreende as seguintes etapas:

a) produção de um vetor compreendendo as seguintes sequências de ácido nucleico, preferivelmente sequências de DNA, em orientação 5' -3':

- uma sequência de promotor funcional nos organismos da invenção
- uma sequência de DNA operativamente ligada ao mesmo de acordo com a invenção
- uma sequência de terminação funcional nos organismos da invenção

b) transferência do vetor da etapa a) para os organismos da invenção como *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* ou *T. maritima* e, opcionalmente, integração dentro dos genomas respectivos.

O uso destes vetores compreendendo sequências regulatórias, como são as sequências de promotor e de terminação, é conhecido do versado. Além disso, o versado na técnica sabe como o vetor da etapa a) pode ser transferido para organismos como *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* ou *T. maritima* e quais propriedades um vetor deve ter para ser capaz de ser integrado dentro de seus genomas.

Se o teor de enzima em um organismo como *C. glutamicum* for aumentado por transferência de um ácido nucleico codificando para um polipeptídeo de outro organismo, como por exemplo, *E. coli*, é aconselhável

transferir uma sequência de aminoácido codificado pela sequência de ácido nucleico por exemplo, de *E. coli* por retrotradução da sequência de polipeptídeo de acordo com o código genético dentro da sequência de ácido nucleico compreendendo principalmente estes códons, que são usados com maior frequência devido ao uso de códons específico do organismo. O uso de códons pode ser determinado por meio de avaliações computadorizadas de outros genes conhecidos dos organismos relevantes.

De acordo com a presente invenção, um aumento da expressão do gene e da atividade, respectivamente, de uma sequência nucleotídica de acordo com a presente invenção é também entendido como sendo a manipulação da expressão das enzimas endógenas respectivas de um organismo, em particular de *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* ou *T. maritima*. Isto pode ser obtido, por exemplo, por alteração da sequência promotora de DNA para genes codificando, por exemplo, metionina sintases dependentes de cobalamina com inibição reduzida de produto. Esta alteração, que causa uma taxa de expressão alterada, preferivelmente aumentada, destas enzimas mudadas pode ser obtida por deleção ou inserção de sequências de DNA. Como evidente, isto requer que as mutações que são responsáveis pela inibição reduzida de produto tenham sido introduzidas dentro dos genes endógenos.

Uma alteração da sequência de promotor de tais genes endógenos mudados geralmente causa uma alteração da quantidade expressada do gene e assim também uma alteração da atividade detectável na célula ou no organismo.

Além disso, uma expressão alterada e aumentada, respectivamente, de um gene endógeno pode ser obtida por uma proteína regulatória, que não ocorre no organismo transformado, e que interage com o promotor destes genes. Este regulador pode ser uma proteína quimérica consistindo em um domínio de ligação de DNA e um domínio de ativador de transcrição, como por exemplo, descrito em WO 96/06166.

Uma outra possibilidade para aumentar a atividade e o teor de genes endógenos é regular de modo positivo os fatores de transcrição en-

volvidos na transcrição dos genes endógenos, por exemplo, por meio de superexpressão. As medidas para a superexpressão de fatores de transcrição são conhecidas do versado.

Além disso, uma alteração da atividade de genes endógenos
5 pode ser obtida por mutagênese marcada das cópias do gene endógeno.

Uma alteração de genes endógenos codificando para as enzimas de, por exemplo, grupo I também pode ser obtida por influência das modificações pós-translacionais das enzimas. Isto pode acontecer, por exemplo, por regulação da atividade de enzimas de tipo quinases ou fosfatases envolvidas na modificação pós-translacional de enzimas por meio de
10 medidas correspondentes como a superexpressão ou silenciamento dos genes.

Em outra modalidade, polipeptídeos de, por exemplo, grupo I podem ser melhorados em sua eficiência, ou sua região de controle alo-
15 estereoquímica destruída de modo que a inibição de realimentação de produção do composto seja evitada. Similarmente, uma enzima degradativa pode ser deletada ou modificada por substituição, deleção, ou adição de modo que sua atividade degradativa seja diminuída para os polipeptídeos desejados ou os polipeptídeos sendo codificados por sequências nucleotídicas da presente invenção sem afetar a viabilidade da célula. Em cada caso,
20 o rendimento global ou a taxa de produção de metionina pode ser aumentada.

Também é possível que tais alterações nos polipeptídeos e moléculas de nucleotídeos possam melhorar a produção dos produtos químicos
25 finos, como outros compostos contendo enxofre, do tipo cisteína ou glutationa, outros aminoácidos, vitaminas, cofatores, nutracêuticos, nucleotídeos, nucleosídeos, e trehalose. Metabolismo de qualquer composto pode ser entrelaçado com outras vias biossintéticas e degradativas dentro da célula, e os cofatores necessários, intermediários, ou substratos em uma via são
30 provavelmente supridos ou limitados por outra de tal via. Assim, por modulação da atividade de polipeptídeos da presente invenção e/ou os de, por exemplo, grupo I, a produção e/ou eficiência de outra via biossintética ou de-

gradativa para produto químico fino além das levando à metionina podem ser impactadas.

A expressão e a função de enzima também podem ser reguladas com base nos níveis celulares de um composto a partir de um processo metabólico diferente, e os níveis celulares de moléculas necessários para o crescimento básico, como aminoácidos e nucleotídeos, podem afetar criticamente a viabilidade do micro-organismo em uma cultura em larga escala. Assim, modulação de uma enzima de biossíntese de aminoácido de, por exemplo, as vias biossintéticas de lisina de modo que elas não sejam mais respondentes à inibição de realimentação ou de modo que elas sejam melhoradas em eficiência ou *turnover*, pode resultar em uma melhor produção de metionina. As estratégias acima mencionadas para aumentar ou introduzir uma quantidade e/ou atividade da polipeptídeo e sequências nucleotídicas não significam ser limitativas; variações nestas estratégias serão prontamente evidentes para um versado na técnica.

Reduzindo a quantidade e/ou atividade de sequências nucleotídicas e/ou polipeptídeos codificando metionina sintases dependentes de cobalamina endógenas e de grupo II

Para reduzir a quantidade e/ou atividade de sequência nucleotídica e polipeptídeos sendo assim codificados, várias estratégias também se encontram disponíveis.

A expressão das enzimas endógenas de, por exemplo, grupo II pode, por exemplo, ser regulada via a expressão de aptâmeros especificamente ligando para as sequências de promotor dos genes. Dependendo dos aptâmeros ligando para estimular ou reprimir as regiões de promotor, a quantidade e assim, neste caso, a atividade de tais enzimas, é aumentada ou reduzida.

Aptâmeros também podem ser projetados em um modo como para especificamente ligar-se às próprias enzimas e para reduzir a atividade das enzimas por, por exemplo, ligando para o centro catalítico das respectivas enzimas. A expressão de aptâmeros é geralmente obtida por superexpressão com base em vetor (ver acima) e é, também como o projeto e a

seleção de aptâmeros, bem conhecidos do versado (Famulok et al., (1999) *Curr Top Microbiol Immunol.*, 243,123-36).

Além disso, a diminuição da quantidade e da atividade de, por exemplo, os genes endógenos de MetH ou de enzimas endógenas de grupo II pode ser obtida por meio de várias medidas experimentais, que são bem conhecidas do versado. Estas medidas são geralmente resumidas sob o termo "silenciamento de genes". Por exemplo, a expressão de um gene endógeno pode ser silenciada por transferência de um vetor acima mencionado, que tem uma sequência de DNA codificando para a enzima ou partes da mesma em ordem antissenso, para os organismos como *C. glutamicum* e *E. coli*. isto é, baseado no fato de que a transcrição de tal vetor na célula leva a um RNA, que pode hibridizar com o mRNA transcrito pelo gene endógeno e assim evita sua tradução.

As sequências regulatórias operativamente ligadas a um ácido nucleico clonado na orientação antissenso podem ser selecionadas que dirigem a expressão contínua da molécula de RNA antissenso RNA em uma variedade de tipos de células, por exemplo, promotores virais e/ou melhoradores, ou sequências regulatórias podem ser selecionadas que dirigem a expressão constitutiva direta, específica de tecido ou específica de tipo celular de RNA antissenso. O vetor de expressão antissenso pode estar na forma de um plasmídeo recombinante, fagemídeo ou vírus atenuado em que os ácidos nucleicos antissenso são produzidos sob o controle de uma região regulatória de elevada eficiência, cuja atividade pode ser determinada pelo tipo de célula dentro da qual o vetor é introduzido. Para uma discussão da regulação de expressão de gene usando genes antissenso, ver Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Trends in Genetics*, Vol.1 (1) 1986.

Em princípio, a estratégia antissenso pode ser copulada a um método de ribozima. As ribozimas são sequências de RNA cataliticamente ativas, que, se copuladas nas sequências antissenso, clivam as sequências-alvo cataliticamente (Tanner et al., (1999) *FEMS Microbiol Rev.* 23 (3), 257-75). Isto pode melhorar a eficiência de uma estratégia antissenso.

Além destes métodos, existe a introdução de mutações antis-senso dentro do gene endógeno por meio de introdução de oligonucleotídeos RNA/DNA dentro do organismo (Zhu et al., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18 (5), 555-558) ou gerando mutantes de nocaute com a ajuda de recombinação homóloga (Hohn et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 8321-8323.).

Para criar um micro-organismo recombinante homólogo, um vetor é preparado o qual contém pelo menos uma porção de gene codificando para, por exemplo, uma enzima de grupo II ou o gene MetH endógeno dentro do qual a deleção, adição ou substituição foi introduzida para, assim, alterar, por exemplo, romper funcionalmente, o gene endógeno.

Preferivelmente, este gene endógeno é um gene de *C. glutamicum* ou *E. coli*, mas ele pode ser um homólogo de uma bactéria relacionada ou mesmo de uma fonte de planta ou levedura. Em uma modalidade, o vetor é projetado de modo que, quando da recombinação homóloga, o gene endógeno é funcionalmente rompido (isto é, não codifica mais uma proteína funcional; também referido como um vetor de "nocaute"). Alternativamente, o vetor pode ser projetado de modo que, quando da recombinação homóloga, o gene endógeno é mudado ou de outra forma alterado mas ainda codifica proteína funcional (por exemplo, a regulação regulatória a montante pode ser alterada para assim alterar a expressão da enzima endógena de, por exemplo, grupo 2). No vetor de recombinação homóloga, a porção alterada do gene endógeno é flanqueada em suas extremidades 5' e 3' por ácido nucleico adicional do gene endógeno para permitir a recombinação homóloga ocorrer entre o gene exógeno carregado pelo vetor e um gene endógeno no (micro)organismo. O ácido nucleico endógeno de flanco adicional é de comprimento suficiente para uma recombinação homóloga de sucesso com o gene endógeno. Tipicamente, vários kilobases de DNA de flanco (ambos nas extremidades 5' e 3') são incluídos no vetor (ver por exemplo, Thomas, K. R., e Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51: 503 para uma descrição de vetores de recombinação homóloga).

O vetor é introduzido dentro de um micro-organismo (por exem-

plo, por eletroporação) e células em que o gene introduzido endógeno foi recombinado de modo homólogo com as enzimas endógenas são selecionadas, usando técnicas conhecidas.

Em outra modalidade, um gene endógeno em uma célula hospedeira é rompido (por exemplo, por recombinação homóloga ou outros meios genéticos bem conhecidos) de modo que expressão de seu produto de proteína não ocorra. Em outra modalidade, um gene endógeno ou introduzido em uma célula hospedeira foi alterado por uma ou mais mutações de pontos, deleções, ou inversões, mas ainda codifica uma enzima funcional.

Em ainda outra modalidade, uma ou mais das sequências regulatórias (por exemplo, um promotor, repressor, ou indutor) de um gene endógeno em um (micro)organismo foi alterado (por exemplo, por deleção, truncagem, inversão ou mutação de pontos), de modo que a expressão do gene endógeno seja modulada. Um versado na técnica irá apreciar que as células hospedeiras contendo mais do que um dos genes codificando, por exemplo, para as enzimas de grupo II e modificações de proteína podem ser prontamente produzidas usando os métodos da invenção, e são destinadas a estarem incluídas na presente invenção.

Além disso, uma repressão de genes (mas também superexpressão de genes) é também possível por meio de fatores de ligação de DNA específicos, por exemplo, fatores do tipo de fator de transcrição de dedo de zinco. Além disso, fatores inibindo a própria proteína-alvo podem ser introduzidos dentro de uma célula. Os fatores de ligação de proteína podem ser, por exemplo, aptâmeros acima mencionados. Famulok et al., (1999) *Curr Top Microbiol Immunol.* 243, 123-36).

Como outros fatores de ligação de proteína, cuja expressão em organismos causa uma redução da quantidade e/ou da atividade das enzimas de, por exemplo, grupo II, os anticorpos específicos de enzima podem ser considerados. A produção de anticorpos específicos de enzima monoclonais, policlonais, ou recombinantes segue protocolos-padrão (Guide to Protein Purification, Meth. Enzymol. 182, pp. 663-679 (1990), M. P. Deutscher, ed.). A expressão de anticorpos é também conhecida da literatura (Fi-

edler et al., (1997) *Immunotechnology* 3, 205-216; Maynard e Georgiou (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 339-76).

As técnicas mencionadas são bem conhecidas do versado. Assim, o técnico também sabe que tamanhos as construções de ácido nucleico usadas para, por exemplo, métodos antissenso, devem ter e qual complementaridade, homologia ou identidade, as sequências respectivas de ácido nucleico devem ter. Os termos complementaridade, homologia, e identidade são conhecidos do versado.

O termo complementaridade descreve a capacidade de uma molécula de ácido nucleico de hibridizar com outra molécula de ácido nucleico devido às ligações hidrogênio entre duas bases complementares. O versado na técnica sabe que duas moléculas de ácido nucleico não precisam ter uma complementaridade de 100% a fim de serem capazes de hibridizar entre si. A sequência de ácido nucleico, que deve hibridizar com outra sequência de ácido nucleico, sendo preferida pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, preferivelmente pelo menos 70%, particularmente preferida pelo menos 80%, também particularmente preferida pelo menos 90%, em particular preferida pelo menos 95% e o mais preferivelmente pelo menos 98 ou 100%, respectivamente, complementar com a referida outra sequência de ácido nucleico.

Moléculas de ácido nucleico são idênticas, se elas tiverem nucleotídeos idênticos em ordem 5'-3' idêntica.

A hibridização de uma sequência antissenso com uma sequência de mRNA endógena tipicamente ocorre *in vivo* sob condições celulares ou *in vitro*. De acordo com a presente invenção, a hibridização é realizada *in vivo* ou *in vitro* sob condições que são estridentes o suficiente para assegurar uma hibridização específica.

As condições estridentes de hibridização *in vitro* são conhecidas do versado e podem ser obtidas da literatura (ver por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press). O termo "hibridização específica" refere-se ao caso em que a molécula preferivelmente se liga a uma certa sequência de ácido nucleico sob condições estridentes, se esta se-

quência de ácido nucleico fizer parte de uma mistura complexa de, por exemplo, moléculas de DNA ou RNA.

O termo “condições estringentes” assim refere-se a condições, sob as quais a sequência de ácido nucleico preferivelmente liga-se a uma
5 sequência-alvo, mas não, ou pelo menos em uma extensão significantemente reduzida, a outras sequências.

Condições estringentes são dependentes das circunstâncias. As sequências mais longas especificamente hibridizam em maiores temperaturas. Em geral, as condições estringentes são selecionadas em tal modo que
10 a temperatura de hibridização está na faixa de cerca de 5°C abaixo do ponto de fusão (T_m) da sequência específica com uma força iônica definida e um valor de pH definido. T_m é a temperatura (com um valor de pH definido, uma força iônica definida e uma concentração de ácido nucleico definida), em que 50% das moléculas, que são complementares a uma sequência-alvo, hibridi-
15 zam com a referida sequência-alvo. Tipicamente, as condições estringentes compreendem concentrações de sal entre 0,01 e 1,0 M de íons sódio (ou íons de outro sal) e um valor de pH entre 7,0 e 8,3. A temperatura é pelo menos 30°C para as moléculas curtas (por exemplo, para tais moléculas compreendendo entre 10 e 50 nucleotídeos). Além disso, condições estrin-
20 gentes podem compreender a adição de agentes desestabilizantes como, por exemplo, formam amida. Os tampões de lavagem e de hibridização típicos são da seguinte composição.

Solução de pré-hibridização:

0,5 % de SDS
25 5x SSC
50 mM de NaPO_4 , pH 6,8
0,1% pirofosfato de Na
5x reagente de Denhardt
100 µg/esperma de salmão

30 *Solução de hibridização*

Solução de pré-hibridização
1x10⁶ cpm/ml sonda (5-10 min 95°C)

20x SSC: NaCl a 3 M
 citrato de sódio a 0,3 M
 ad pH 7 com HCl

50x reagente de Denhardt: 5 g a Ficoll

- 5 5 g de polivinilpirrolidona
 5 g de Albumina de soro bovino
 ad 500 ml A. dest.

Um procedimento típico para a hibridização é como a seguir:

Opcional: lavar Blot 30 min em 1x SSC/0,1% SDS a 65°C

- 10 *Pré-hibridização:* pelo menos 2 h a 50-55°C

Hibridização: durante a noite a 55-60°C

Lavagem: 05 min 2x SSC/0,1% SDS

Temperatura de hibridização

30 min 2x SSC/0,1% SDS

- 15 Temperatura de hibridização

30 min 1x SSC/0,1% SDS

Temperatura de hibridização

45 min 0,2x SSC/0,1% SDS 65°C

5 min 0,1x SSC temperatura ambiente

- 20 Estas condições estridentes também se aplicam quando as reivindicações referem-se a sequências de DNA que hibridizam sob condições estridentes.

- 25 Os termos "senso" e "antissenso" assim como "orientação antissenso" são conhecidos do versado. Além disso, o versado na técnica conhece, qual o comprimento que as moléculas de ácido nucleico, que devem ser usadas para os métodos antissenso, deve ter e que homologia ou complementaridade elas devem ter com relação às suas sequências-alvos.

- 30 Assim, o versado na técnica também sabe qual o comprimento que as moléculas de ácido nucleico, que são usadas para os métodos de silenciamento de gene, devem ter. Para fins de complementaridade antissenso, comprimentos de sequência de 100 nucleotídeos, 80 nucleotídeos, 60 nucleotídeos, 40 nucleotídeos e 20 nucleotídeos devem ser suficientes.

Os comprimentos de nucleotídeos maiores com certeza também serão suficientes. Uma aplicação combinada dos métodos acima mencionados também é concebível.

Se, de acordo com a presente invenção, sequências de DNA
5 são usadas, que são operativamente ligadas em orientação 5'-3' a um promotor ativo no organismo, vetores podem, geralmente, ser construídos, os quais, após transferência para as células do organismo, permitem a superexpressão da sequência de codificação ou causam a supressão ou competição e bloqueio de sequências endógenas de ácido nucleico e as proteínas
10 expressadas a partir das mesmas, respectivamente.

A atividade de uma enzima particular também pode ser reduzida por superexpressão de um mutante não-funcional da mesma no organismo. Assim, um mutante não-funcional não é capaz de catalisar a reação em questão, mas é capaz de ligar-se, por exemplo, o substrato ou cofator, pode,
15 por meio da superexpressão competir com a enzima endógena e assim inibir a reação. Além disso, os métodos destinados a reduzir a quantidade e/ou a atividade de uma enzima em uma célula hospedeira são bem conhecidos do versado.

Vetores e Células hospedeiras

20 Outro aspecto da invenção pertence a vetores, preferivelmente vetores de expressão, contendo uma sequência nucleotídica de acordo com a invenção (ou porções da mesma) ou combinações da mesma. Como usado, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual ele foi ligado.

25 Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que refere-se a um laço de DNA de fita dupla circular dentro dos quais os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados dentro do genoma viral.

30 Alguns vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira dentro da qual eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores de mamíferos episomais). Outros vetores são integrados dentro do genoma de uma

célula hospedeira quando da introdução dentro da célula hospedeira, e assim são replicados ao longo do genoma hospedeiro. Além disso, alguns vetores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais eles são operativamente ligados.

5 Estes vetores são referidos aqui como "vetores de expressão".

Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinantes estão com frequência na forma de plasmídeos. No presente relatório, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de modo interpermutável como o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor.

10 Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem compreender um ácido nucleico de acordo com a presente invenção e/ou codificando para as enzimas de grupo I em uma forma apropriada para expressão do ácido nucleico respectivo em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais se-

15 quências regulatórias, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para expressão, que são operativamente ligadas à sequência de ácido nucleico a ser expressada.

Dentro de um vetor de expressão recombinante, "ligado operativamente" se destina a significar que a sequência nucleotídica de interesse é

20 ligada à(s) sequência(s) regulatória(s) em um modo que permite a expressão de uma sequência nucleotídica (por exemplo, em um sistema de transcrição/tradução *in vivo*, ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido dentro da célula hospedeira). O termo "sequência regulatória" se destina a incluir promotores, sítios de ligação de repressor, sítios de ligação de

25 ativador, melhoradores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, terminadores, sinais de poliadenilação ou outros elementos da estrutura secundária de mRNA). Estas sequências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). As sequências regula-

30 tórias incluem as que dirigem a expressão constitutiva de uma sequência nucleotídica em muitos tipos de célula hospedeira e as que dirigem a expressão de uma sequência nucleotídica somente em algumas células hos-

pedeiras. As sequências regulatórias preferidas são, por exemplo, promotores como cos-, tac-, trp-, tet-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lpp lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, arny,SP02, e-Pp- ore PL, que são usados preferivelmente em bactérias. As sequências regulatórias adicionais são, por exemplo, 5 promotores de leveduras e fungos, como ADC1,MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH, promotores de plantas como CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos ou promotores de ubiquitina ou faseolina. Também é possível usar promotores artificiais. Será notado por um versado na técnica que o projeto do vetor de expressão pode depender de fatores 10 com a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos dentro de células hospedeiras para assim produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados por ácidos nucleicos de acordo com a invenção.

15 Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem ser projetados para expressão dos polipeptídeos de acordo com a invenção em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, os genes para as enzimas de grupo I podem ser expressados em células bacterianas como *C. glutamicum* e *E. coli*, células de insetos (usando vetores de expressão de baculovírus), células de leveduras e outros fungos (ver Romanos, M. A. et al. 20 (1992), *Yeast* 8: 423-488; van den Hondel, C. A. M.J. J. et al.(1991) em: *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W.Bennet & L. L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego; e van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J.(1991) em: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J. F. et al., eds., 25 p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), células de plantas multicelulares e algas (ver Schmidt, R. e Willmitzer, L. (1988) *Plant Cell Rep.*: 583-586). As células hospedeiras apropriadas são discutidas também em Goeddel, *Gene Expression Technology : Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, o vetor de expressão 30 recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo, usando sequências regulatórias de promotor T7 e polimerase T7.

Expressão de proteínas em procariotas é com maior frequência

realizada com vetores contendo promotores constitutivos ou indutíveis dirigindo a expressão de proteínas de fusão ou não de fusão.

Os vetores de fusão adicionam vários aminoácidos a uma proteína codificada nos mesmos, geralmente no término amino da proteína recombinante mas também para o término C ou fundidos dentro das regiões apropriadas nas proteínas. Estes vetores de fusão tipicamente servem a três fins:: 1) aumentar a expressão de proteína recombinante; 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante; e 3) auxiliar na purificação da proteína recombinante atuando como um ligante em purificação por afinidade. Com frequência, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introduzido na junção da porção de fusão e da proteína recombinante para permitir a separação da proteína recombinante a partir da porção de fusão subsequente à purificação da proteína de fusão. Estas enzimas, e suas sequências de reconhecimento cognatas, incluem Fator Xa, trombina e enteroquinase.

Os vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. e Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fundem glutathione S-transferase (GST), proteína E de ligação de maltose, ou proteína A, respectivamente.

Exemplos de vetores de expressão de *E. coli* não-fusão indutíveis apropriados incluem pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69: 301-315), pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHSL, pH22, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-BI, egtII, pBdCI, e pET lld (Studier et al., *Gene Expression Technology : Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; e Pouwels et al., eds. (1985) *Cloning Vetores*. Elsevier: New York ISBN 0 444 904018). A expressão de gene-alvo do vetor thepTrc se baseia em transcrição de RNA polimerase hospedeiro de um promotor de fusão trp-lac híbrido. A expressão de gene-alvo a partir do vetor pET lld se baseia na transcrição de um promotor de fusão T7 gnlO-lac mediada por uma RNA polimerase viral coexpressada (T7gnl). Esta polimerase viral é fornecida por cepas hospedeiras BL21 (DE3)

ou HMS174 (DE3) a partir de um profago X residente abrigando um gene T7gnt sob o controle transcripcional do promotor lacUV 5. Para transformação de outras variedades de bactérias, vetores apropriados podem ser selecionados. Por exemplo, os plasmídeos pIJ101, pIJ364, pIJ702 e pIJ361 são conhecidos como sendo utilizáveis na transformação de *Streptomyces*, enquanto os plasmídeos pUB110, pC194, ou pBD214 são apropriados para a transformação de espécies de *Bacillus*. Vários plasmídeos de uso na transferência de informação genética em *Corynebacterium* incluem pHM1519, pBLI, pSA77, ou pAJ667 (Pouwels et al., eds. (1985) *Cloning Vectors*. Elsevier: New York ISBN 0 444 904018).

Uma estratégia para maximizar a expressão de proteína recombinante consiste em expressar a proteína em bactérias hospedeiras com uma capacidade prejudicada de clivar proteoliticamente a proteína recombinante (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Outra estratégia consiste em alterar a sequência de ácido nucleico do ácido nucleico a ser inserido dentro de um vetor de expressão de modo que os códons individuais para cada aminoácido sejam os preferivelmente usados na bactéria escolhida para a expressão, como *C. glutamicum* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 2111-2118). Esta alteração de sequências de ácido nucleico da invenção pode ser realizada por técnicas de síntese de DNA padrão.

Exemplos de vetores *shuttle* de *C. glutamicum* e *E. coli* podem ser encontrados em Eikmanns et al (*Gene*. (1991) 102, 93-8).

Em outra modalidade, o vetor de expressão de proteína vetor é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para expressão em levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSecI (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6: 229-234),, 2i, pAG-1, Yep6, Yep13, pEMBLYe23, pMFa (Kurjan e Herskowitz, (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54: 113-123), e pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vetores e métodos para a construção de vetores apropriados para uso em outros fungos, como os fungos filamentosos, incluem os detalhados em : van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J. (1991) em: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J. F.

Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, e Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors Elsevier: New York (ISBN 0 444 904018).

Para os fins da presente invenção, uma ligação operativa é entendida como sendo uma disposição sequencial de promotor, sequência de codificação, terminador, e, opcionalmente, outros elementos regulatórios de tal modo que cada um dos elementos regulatórios pode preencher sua função, de acordo com sua determinação, quando expressando a sequência de codificação.

Para outros sistemas de expressão apropriados para tanto para células procarióticas como eucarióticas, ver os capítulos 16 e 17 de Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003.

Outro aspecto da invenção pertence a organismos ou células hospedeiras dentro das quais um vetor de expressão recombinante da invenção foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados de modo interpermutável aqui. Deve-se entender que estes termos referem-se tão somente a uma célula em questão particular, mas também à progênie ou progênie em potencial desta célula. Porque algumas modificações podem ocorrer nas gerações sucessivas, devido às suas influências de mutação ou ambientais, esta progênie não pode, de fato, ser idêntica à célula parental, mas ainda está incluída dentro do escopo do termo como usado aqui.

DNA vetor pode ser introduzido dentro de células procarióticas ou eucarióticas via técnicas convencionais de transformação ou transfecção. Como usado aqui, os termos "transformação" e "transfecção", "conjugação" e "transdução" se destinam a fazer referência a várias técnicas reconhecidas na arte para a introdução do ácido nucleico estrangeiro (por exemplo, DNA ou RNA linear (por exemplo, um vetor linearizado ou uma construção de gene sozinha sem um vetor) ou ácido nucleico na forma de um vetor (por exemplo, plasmídeo, fago, fasmídeo, fagemídeo, transposon ou outro DNA)

dentro de uma célula hospedeira, incluindo coprecipitação de fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção, competência natural, transferência mediada por produto químico ou eletroporação. Os métodos apropriados para a transformação ou transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook, et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003), e outros manuais de laboratório.

A fim de identificar e selecionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a antibióticos) é geralmente introduzido dentro das células hospedeiras junto com o gene de interesse. Os marcadores selecionáveis preferidos incluem os que conferem resistência a fármacos, como G418, higromicina e metotrexato. Ácido nucleico codificando um marcador selecionável pode ser introduzido dentro de uma célula hospedeira no mesmo vetor como o codificando polipeptídeos da presente invenção ou pode ser introduzido em um vetor separado. As células estavelmente transfectadas com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas por seleção de fármacos (por exemplo, células que foram incorporadas no marcador selecionável irão sobreviver, enquanto as outras células morrem).

Em outra modalidade, micro-organismos recombinantes podem ser produzidos que contêm sistemas selecionados que permitem a expressão regulada do gene introduzido. Por exemplo, inclusão de uma sequência nucleotídica da presente invenção sobre um vetor colocando o mesmo sob o controle do lac operon permite a expressão do gene somente na presença de IPTG. Estes sistemas regulatórios são bem conhecidos na técnica.

Em uma modalidade, o método compreende cultivar os organismos da invenção (em que um vetor de expressão recombinante codificando, por exemplo, um polipeptídeo da presente invenção foi introduzido, ou dentro deste genoma foi introduzido um gene codificando uma enzima de tipo selvagem ou alterada) em um meio apropriado para a produção de metionina. Em outra modalidade, o método além disso compreende isolar metionina

do meio ou da célula hospedeira.

Crescimento de meios de cultura de Escherichia coli e Corynebacterium glutamicum e condições de cultura

O versado na técnica conhece o cultivo de micro-organismos comuns, como *C.glutamicum* e *E.coli*. Assim, um ensinamento geral será dado abaixo com relação ao cultivo de *C.glutamicum*. Uma informação correspondente pode ser recuperada de livros de texto padrão para o cultivo de *E.coli*.

As cepas de *E. coli* são cultivadas como rotina em caldo MB e LB, respectivamente (Follettie, M. T., Peoples, O., Agoropoulou, C., e Sinskey, A J. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 4096-4103). Meio mínimo para *E. coli* é M9 e MCGC modificado (Yoshihama, M., Higashiro, K., Rao, E. A., Akedo, M., Shanabruch, W G., Follettie, M. T., Walker, G. C., e Sinskey, A. J. (1985) *J. Bacteriol.* 162,591-507), respectivamente. Glicose pode ser adicionada a uma concentração final de 1%. Antibióticos podem ser adicionados nas seguintes quantidades (microgramas por mililitro): ampicilina, 50; canamicina, 25; ácido nalidixico, 25; aminoácidos, vitaminas, e outros suplementos podem ser adicionados nas seguintes quantidades: metionina, 9,3 mM; arginina, 9,3 mM; histidina, 9,3 mM; tiamina, 0,05 mM. As células de *E. coli* são cultivadas em rotina a 37 C, respectivamente.

Corynebacteria geneticamente modificada é tipicamente cultivada em meio de crescimento sintético ou natural. Vários meios de crescimento diferentes para *Corynebacteria* são tanto bem conhecidos como prontamente disponíveis (Lieb et al. (1989) *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) *Biotechnology Letters*, 11: 11-16; Patente DE 4.120.867; Liebl(1992) "The Genus *Corynebacterium*, in: *The Procaryotes*, Volume II, Balows, A. et al., eds. Springer-Verlag).

Estes meios consistem em uma ou mais fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e elementos de traço. As fontes de carbono preferidas são açúcares, como mono-, di-, ou polissacarídeos. Por exemplo, glicose, frutose, mannose, galactose, ribose, sorbose, ribose, lactose, maltose, sacarose, rafinose, amido ou celulose servem como fontes

de carbono excelentes.

Também é possível fornecer açúcar ao meio via compostos complexos como melaços e outros subprodutos de refino de açúcar. Também pode ser vantajoso fornecer misturas de diferentes fontes de carbono.

- 5 Outras fontes de carbono possíveis são álcoois e ácidos orgânicos, como metanol, etanol, ácido acético ou ácido láctico. As fontes de nitrogênio são geralmente de compostos de nitrogênio orgânicos ou inorgânicos, ou materiais contendo estes compostos. As fontes de nitrogênio exemplares incluem gás amônia ou sais de amônia, como NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , nitratos, ureia, aminoácidos ou fontes de nitrogênio complexas como licor de milho, farinha de soja, proteína de soja, extrato de levedura, extrato de carne e outros.

- A superprodução de metionina é possível usando fontes de enxofre diferentes. Sulfatos, tiosulfatos, sulfitos e também fontes de enxofre mais reduzidas, como H_2S e sulfetos e derivados, também podem ser usadas. Também as fontes de enxofre orgânico como mercaptano, tioglicolatos, tiocianatos, e tioureia, aminoácidos contendo enxofre, como cisteína e outros compostos contendo enxofre podem ser usados para alcançar uma produção eficiente de metionina. Formato também pode ser possível como um suplemento, como o são outras fontes de C1 como metanol ou formaldeído. São particularmente apropriados metanotiol e seu dímero dimetildissulfeto.

- Os compostos de sal inorgânicos que podem ser incluídos no meio incluem os sais de cloreto, fosforoso- ou sulfato, de cálcio, magnésio, sódio, cobalto, molibdênio, potássio, manganês, zinco, cobre e ferro. Os compostos quelantes podem ser adicionados ao meio para manter os íons metal em solução. Os compostos quelantes particularmente utilizáveis incluem os di-hidroxifenóis, como catecol ou protocatecuato ou ácidos orgânicos, como ácido cítrico. É típico para o meio também conter outros fatores de crescimento, como vitaminas ou promotores de crescimento, cujos exemplos incluem biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato e piridoxina. Os fatores de crescimento e sais com frequência se originam de componentes de meio complexo, como extrato de levedura, melaços, li-

cor de milho e outros. A composição exata dos compostos de meio depende fortemente do experimento imediato e é individualmente decidida para cada caso específico. Informação sobre a otimização do meio é disponível no livro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach (Eds. P. M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Também é possível selecionar meios de crescimento a partir de fornecedores comerciais, como padrão 1 (Merck) ou BHI (infusão de núcleo de grão, DIFCO) ou outros.

Todos os componentes do meio devem ser esterilizados, ou por calor (20 min a 0,1 MPa (1,5 bars) e 121°C) ou por filtração estéril. Os componentes podem ser ou esterilizados juntos ou, se necessário, separadamente.

Todos os componentes do meio podem estar presentes no começo do crescimento, ou eles podem ser opcionalmente adicionados continuamente ou em batelada. As condições de cultura são definidas separadamente para cada experiência.

A temperatura deve estar em uma faixa entre 15°C e 45°C. A temperatura pode ser mantida constante ou pode ser alterada durante o experimento. O pH do meio pode estar na faixa de 5 a 8,5, preferivelmente em torno de 7,0 e pode ser mantido por adição de tampões ao meio. Um tampão exemplar para este fim é tampão de fosfato de potássio. Os tampões sintéticos como MOPS, HEPES, ACES e outros podem ser alternativamente ou simultaneamente usados. Também é possível manter um pH da cultura constante através da adição de NaOH ou NH₄OH durante o crescimento. Se os componentes do meio completo, como extrato de levedura forem usados, a necessidade de tampões adicionais pode ser reduzida, devido ao fato de que muitos compostos completos têm elevadas capacidades de tampão. Se um fermentador for usado para cultivar os micro-organismos, o pH também pode ser controlado usando amônia gasosa.

O tempo de incubação está geralmente em uma faixa de várias horas a vários dias. Este tempo é selecionado a fim de permitir que uma quantidade máxima de produto se acumule no caldo. As experiências de

crescimento descritas podem ser realizadas em vários vasos, como placas de microtitulação, tubos de vidro, frascos de vidro ou fermentadores de vidro ou metal de tamanhos diferentes. Para a triagem de um grande número de clones, os micro-organismos devem ser cultivados em placas de microtitulação, tubos de vidro, ou frascos de agitação, com ou sem anteparos. Preferi-
5 velmente, são usados frascos de agitação de 100 ml, cheios com 10% (em volume) do meio de crescimento requerido. Os frascos devem ser agitados em um agitador giratório (amplitude 25 mm) usando uma faixa de velocidade de 100-300' rpm. As perdas por evaporação podem ser diminuídas pela ma-
10 nutenção de uma atmosfera úmida; alternativamente, uma correção matemática para perdas de evaporação deve ser realizada.

Se clones geneticamente modificados forem testados, um clone de controle não-modificado ou um clone de controle contendo o plasmídeo básico, sem qualquer inserto, também deve ser testado. O meio é inoculado
15 em um OD600 de 0,5-1,5 usando células cultivadas em placas ágar, como placas CM (10g/l de glicose, 2,5g/l de NaCl, 2g/l de ureia, 10g/l de polipeptona, 5g/l de extrato de levedura, 5g/l de extrato de carne, 22g/l de NaCl, 2g/l de ureia, 10g/l de polipeptona, 5g/l de extrato de levedura, 5g/l de extrato de carne, 22g/l de ágar, pH 6,8 com NaOH a 2M) que tinha sido incubada a
20 30°C.

A inoculação do meio é obtida ou por introdução de uma suspensão salina de células de *C. glutamicum* de placas CM ou adição de uma pré-cultura líquida desta bactéria.

As condições de meio e cultura acima também podem ser apli-
25 cadas para outros organismos como *S. coel* e *T. maritima*.

Listagem de Sequência

<110> BASF AG
 <120> Metionina sintases com inibição reduzida de produto
 <130> B 8484/MH
 5 <140> PCT/EP2007/064471
 <141> 21-12-2007
 <150> EP 06 127 363.7
 <151> 29-12-2006
 <160> 32
 10 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 <211> 1221
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 15 <220>
 <221> misc_aspecto
 <223> metionina sintase MetH
 <400> 1

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

Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg
115 120 125

Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu
130 135 140

5 Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala
165 170 175

Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln Asp Ala
10 180 185 190

Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr Val
195 200 205

Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu
210 215 220

15 Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala
225 230 235 240

Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His
245 250 255

Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu
20 260 265 270

Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln
275 280 285

Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Met Val Gly Gly
290 295 300

25 Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Asp Ala Val
305 310 315 320

Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala
325 330 335

Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val
30 340 345 350

Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser
355 360 365

Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu
 370 375 380
 Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln
 385 390 395 400
 5 Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val
 405 410 415
 Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala
 420 425 430
 Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val
 10 435 440 445
 Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser
 450 455 460
 Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile
 465 470 475 480
 15 Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile
 485 490 495
 Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys
 20 515 520 525
 Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu
 530 535 540
 Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 25 Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 565 570 575
 Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590
 Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 30 595 600 605
 Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
 610 615 620

Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
625 630 635 640

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

5 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670

Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685

Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
10 690 695 700

Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
705 710 715 720

Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 725 730 735

15 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750

Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765

Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
20 770 775 780

Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
785 790 795 800

Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 805 810 815

25 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 820 825 830

Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845

Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
30 850 855 860

Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
865 870 875 880

Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
 885 890 895
 Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
 900 905 910
 5 Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
 915 920 925
 Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
 930 935 940
 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
 10 945 950 955 960
 Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
 965 970 975
 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
 980 985 990
 15 Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
 995 1000 1005
 Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp His Val Ala Leu Val Tyr
 1010 1015 1020
 Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp Asp Val Val Ile Leu
 20 1025 1030 1035
 Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met Arg Phe Ser Phe
 1040 1045 1050
 Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala Asp Phe Ile
 1055 1060 1065
 25 Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp Val Met
 1070 1075 1080
 Pro Phe Gln Leu Val Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe Ala
 1085 1090 1095
 Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val
 30 1100 1105 1110
 His Gly Ile Gly Val Gln Leu Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp
 1115 1120 1125

His Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser
 1130 1135 1140
 Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu
 1145 1150 1155
 5 Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro
 1160 1165 1170
 Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Leu Glu Pro Gly
 1175 1180 1185
 Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu
 10 1190 1195 1200
 Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr
 1205 1210 1215
 Phe Asn Val
 1220
 15 <210> 2
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 20 <221> DOMÍNIO
 <222> (1)..(245)
 <223> Domínio de ligação de homocisteína de metionina sintase Meth
 <400> 2
 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
 25 1 5 10 15
 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
 20 25 30
 Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
 35 40 45
 30 Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
 50 55 60
 Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu

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

 <210> 3
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> motivo de sequência de metionina sintase
 30 <220>
 <221> FONTE
 <222> (1)..(11)

```

    <223> /Nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
    <221> variante
    <222> (1)..(1)
5    <223> /substituir="Val"          /substituir="Arg"
    <220>
    <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Glu"          /substituir="Arg"
10   <220>
    <221> variante
    <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Ala"          /substituir="Gln"
    <220>
15   <221> variante
    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Leu"          /substituir="Val"
    <220>
    <221> variante
20   <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Arg"          /substituir="Ser"
    <220>
    <221> variante
    <222> (6)..(6)
25   <223> /substituir="Glu"          /substituir="Ala"          /substituir="Lys"
    <220>
    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Gln"          /substituir="Leu"
30   <220>
    <221> variante
    <222> (9)..(9)

```

<223> /substituir="Asn" /substituir="Ser"
 <220>
 <221> variante
 <222> (10)..(10)
 5 <223> /substituir="Thr" /substituir="Glu"
 <220>
 <221> variante
 <222> (11)..(11)
 <223> /substituir="Arg"
 10 <220>
 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (1)..(7),(9)..(11)
 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
 relação aos nas anotações para as referidas posições"
 15 <400> 3
 Ser Ser Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> motivo de sequência de metionina sintase
 <220>
 25 <221> FONTE
 <222> (1)..(15)
 <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
 <220>
 <221> variante
 30 <222> (1)..(1)
 <223> /substituir="Ile"
 <220>

```

    <221>  variante
    <222>  (2)..(2)
    <223>  /substituir="Leu"
    <220>
5  <221>  variante
    <222>  (3)..(3)
    <223>  /substituir="Val"      /substituir="Leu"
    <220>
    <221>  variante
10 <222>  (4)..(4)
    <223>  /substituir="Ala"      /substituir="Leu"
    <220>
    <221>  variante
    <222>  (7)..(7)
15 <223>  /substituir="Gly"
    <220>
    <221>  variante
    <222>  (8)..(8)
    <223>  /substituir="Tyr"
20 <220>
    <221>  variante
    <222>  (11)..(11)
    <223>  /substituir="Met"      /substituir="Glu"
    <220>
25 <221>  variante
    <222>  (12)..(12)
    <223>  /substituir="Ile"      /substituir="Phe"
    <220>
    <221>  variante
30 <222>  (13)..(13)
    <223>  /substituir="Met"
    <220>

```

```

<221> variante
<222> (14)..(14)
<223> /substituir="Ala" /substituir="Ser" /substituir="Lys"
<220>
5 <221> variante
<222> (15)..(15)
<223> /substituir="Gln" /substituir="Tyr"
<220>
<221> MISC_ASPECTO
10 <222> (1)..(4),(7)..(8),(11)..(15)
<223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
relação aos nas anotações para referidas posições"
<400> 4
Val Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe
15 1 5 10 15
<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> motivo de sequência de metionina sintase
<220>
<221> FONTE
<222> (1)..(15)
25 <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
<220>
<221> variante
<222> (1)..(1)
<223> /substituir="Pro" /substituir="Tyr"
30 <220>
<221> variante
<222> (2)..(2)

```

- <223> /substituir="Thr" /substituir="Asn"
 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
- 5 <223> /substituir="Leu" /substituir="Asp" /substituir="Glu"
 <220>
 <221> variante
 <222> (4)..(4)
 <223> /substituir="Asp" /substituir="Ala" /substituir="Leu"
- 10 <220>
 <221> variante
 <222> (5)..(5)
 <223> /substituir="Asp" /substituir="Pro"
 <220>
- 15 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (6)..(6)
 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
 maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
 <220>
- 20 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (7)..(7)
 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
 maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
 <220>
- 25 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (8)..(8)
 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
 maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
 <220>
- 30 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (9)..(9)
 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.

- maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
- <220>
- <221> MISC_ASPECTO
- <222> (10)..(10)
- 5 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
- <220>
- <221> MISC_ASPECTO
- <222> (11)..(11)
- 10 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
- <220>
- <221> MISC_ASPECTO
- <222> (12)..(12)
- 15 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
- <220>
- <221> MISC_ASPECTO
- <222> (13)..(13)
- 20 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.
maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
- <220>
- <221> variante
- <222> (14)..(14)
- 25 <223> /substituir="Trp"
- <220>
- <221> MISC_ASPECTO
- <222> (14)..(14)
- <223> /nota="sem aminoácido nesta posição no microorganismo T.
maritima"
- 30 <220>
- <221> variante

```

    <222> (15)..(15)
    <223> /substituir="Pro"
    <220>

    <221> MISC_ASPECTO
5    <222> (15)..(15)
    <223> /nota="sem aminoácido nesta posição no microorganismo T.
        marítima"
    <220>

    <221> MISC_ASPECTO
10   <222> (1)..(15)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"
    <400> 5
        Leu Asp Val Glu Lys Phe Arg Gly Glu Arg Phe Ala Asp Asp Phe
15   1           5           10           15

    <210> 6
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Artificial
20   <220>

    <223> motivo de sequência de metionina sintase
    <220>

    <221> FONTE
25   <222> (1)..(17)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>

    <221> variante
    <222> (2)..(2)
30   <223> /substituir="Val"
    <220>

    <221> variante

```

```

    <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Leu" /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante
5    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Ser" /substituir="Lys"
    <220>
    <221> variante
    <222> (5)..(5)
10   <223> /substituir="Lys" /substituir="Ala"
    <220>
    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Glu"
15   <220>
    <221> variante
    <222> (8)..(8)
    <223> /substituir="Ile"
    <220>
20   <221> variante
    <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Val" /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante
25   <222> (10)..(10)
    <223> /substituir="Ala" /substituir="Leu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (11)..(11)
30   <223> /substituir="Ser" /substituir="Ala" /substituir="Lys"
    <220>
    <221> variante

```

```

    <222> (12)..(12)
    <223> /substituir="Val"
    <220>
    <221> variante
5    <222> (14)..(14)
    <223> /substituir="Glu"          /substituir="Asn"
    <220>
    <221> variante
    <222> (15)..(15)
10   <223> /substituir="Glu"          /substituir="Ser"
    <220>
    <221> variante
    <222> (17)..(17)
    <223> /substituir="Ile"
15   <220>
    <221> MISC_ASPECTO
    <222> (2)..(5),(7)..(12),(14)..(15),(17)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"
20   <400> 6
    Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr
    1              5              10              15
    Phe
    <210> 7
25   <211> 15
    <212> PRT
    <213> Artificial
    <220>
    <223> motivo de sequência de metionina sintase
30   <220>
    <221> FONTE
    <222> (1)..(15)

```

```

    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>

    <221> variante
    <222> (1)..(1)
5    <223> /substituir="Ala"
    <220>

    <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Ser"
10   <220>

    <221> variante
    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Val"          /substituir="Ser"
    <220>

15   <221> variante
    <222> (6)..(6)
    <223> /substituir="Cys"          /substituir="Ile"          /substituir="Val"
    <220>

    <221> variante
20   <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Ile"
    <220>

    <221> variante
    <222> (8)..(8)
25   <223> /substituir="Leu"
    <220>

    <221> variante
    <222> (13)..(13)
    <223> /substituir="Asn"
30   <220>

    <221> variante
    <222> (14)..(14)

```

```

    <223> /substituir="Ala"          /substituir="Ser"
    <220>

    <221> variante

    <222> (15)..(15)
5    <223> /substituir="Thr"
    <220>

    <221> MISC_ASPECTO
    <222> (1)..(2),(4),(6)..(8),(13)..(15)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
10      relação aos nas anotações para referidas posições"
    <400> 7

    Glu Ala Gly Ala Asp Leu Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn
    1              5              10              15

    <210> 8
15    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Artificial
    <220>

    <223> motivo de sequência de metionina sintase
20    <220>

    <221> FONTE
    <222> (1)..(9)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>

25    <221> variante
    <222> (1)..(1)

    <223> /substituir="His"          /substituir="Thr"          /substituir="Arg"
    <220>

    <221> variante
30    <222> (2)..(2)

    <223> /substituir="Ser"          /substituir="Ile"          /substituir="Met"
    <220>

```

```

<221> variante
<222> (3)..(3)
<223> /substituir="Ala"          /substituir="Lys"
<220>

5  <221> variante
    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Met"
    <220>

    <221> variante
10  <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Gly"        /substituir="Arg"
    <220>

    <221> variante
    <222> (6)..(6)
    <223> /substituir="Glu"        /substituir="Lys"
15  <220>

    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="His"
20  <220>

    <221> variante
    <222> (8)..(8)
    <223> /substituir="Gln"        /substituir="Gly"
    <220>

25  <221> variante
    <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Met"        /substituir="Leu"
    <220>

    <221> MISC_ASPECTO
30  <222> (1)..(9)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"

```

```

<400> 8
Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Ile
1          5
<210> 9
5 <211> 22
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> motivo de sequência de metionina sintase
10 <220>
<221> FONTE
<222> (1)..(22)
<223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
<220>
15 <221> variante
<222> (1)..(1)
<223> /substituir="Pro" /substituir="Glu"
<220>
<221> variante
20 <222> (2)..(2)
<223> /substituir="Glu" /substituir="Ser"
<220>
<221> variante
<222> (3)..(3)
25 <223> /substituir="Leu" /substituir="Lys"
<220>
<221> variante
<222> (4)..(4)
<223> /substituir="Val" /substituir="Ser" /substituir="Leu"
30 <220>
<221> variante
<222> (5)..(5)

```

```

    <223> /substituir="His"      /substituir="Ala"      /substituir="Asp"
    <220>
    <221> variante
    <222> (6)..(6)
5  <223> /substituir="Pro"
    <220>
    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Ile"
10 <220>
    <221> variante
    <222> (8)..(8)
    <223> /substituir="Ser"      /substituir="Asn"      /substituir="Val"
    <220>
15 <221> variante
    <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Glu"      /substituir="Phe"      /substituir="Arg"
    <220>
    <221> variante
20 <222> (10)..(10)
    <223> /substituir="Ala"      /substituir="Asn"
    <220>
    <221> variante
    <222> (11)..(11)
25 <223> /substituir="Ala"
    <220>
    <221> variante
    <222> (12)..(12)
    <223> /substituir="Ala"      /substituir="Val"
30 <220>
    <221> variante
    <222> (13)..(13)

```

```

    <223> /substituir="Arg"      /substituir="Lys"
    <220>

    <221> variante
    <222> (14)..(14)

5    <223> /substituir="Leu"      /substituir="Ile"
    <220>

    <221> variante
    <222> (17)..(17)

    <223> /substituir="Ala"      /substituir="Arg"
10   <220>

    <221> variante
    <222> (18)..(18)

    <223> /substituir="Cys"      /substituir="Ala"
    <220>

15   <221> variante
    <222> (20)..(20)

    <223> /substituir="Glu"
    <220>

    <221> variante
20   <222> (22)..(22)

    <223> /substituir="Met"      /substituir="Trp"      /substituir="Lys"
    <220>

    <221> MISC_ASPECTO
    <222> (1)..(14), (17)..(18), (20), (22)

25   <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"

    <400> 9

Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val Ala Arg
1           5           10           15

30   Glu Val Ala Asp Glu Phe

        20

    <210> 10

```

```

    <211> 8
    <212> PRT
    <213> Artificial
    <220>
5    <223> motivo de sequência de metionina sintase
    <220>
    <221> FONTE
    <222> (1)..(8)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
10   <220>
    <221> variante
    <222> (1)..(1)
    <223> /substituir="Ala"          /substituir="Arg"
    <220>
15   <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Thr"
    <220>
    <221> variante
20   <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Asp"          /substituir="Pro"
    <220>
    <221> variante
    <222> (4)..(4)
25   <223> /substituir="Glu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Arg"          /substituir="Lys"
30   <220>
    <221> variante
    <222> (6)..(6)

```

<223> /substituir="Gln" /substituir="Pro"
 <220>
 <221> variante
 <222> (8)..(8)

5 <223> /substituir="Trp" /substituir="Tyr"
 <220>
 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (1)..(8)
 <223> /nota="sem aminoácido nesta posição no microorganismo T.

10 <223> maritima"
 <220>
 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (1)..(6),(8)
 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com

15 <223> relação aos nas anotações para referidas posições"
 <400> 10
 Gly Arg Asn Gly Met Arg Arg Phe
 1 5
 <210> 11

20 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> motivo de sequência de metionina sintase

25 <220>
 <221> FONTE
 <222> (1)..(13)
 <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
 <220>

30 <221> variante
 <222> (2)..(2)
 <223> /substituir="Leu" /substituir="Ala" /substituir="Phe"

```

    <220>
    <221> variante
    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Val" /substituir="Asp"
5  <220>
    <221> variante
    <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Met" /substituir="Ile"
    <220>
10 <221> variante
    <222> (8)..(8)
    <223> /substituir="Thr"
    <220>
    <221> variante
15 <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Asn" /substituir="Gly"
    <220>
    <221> variante
    <222> (10)..(10)
20 <223> /substituir="Arg" /substituir="Glu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (11)..(11)
    <223> /substituir="Thr"
25 <220>
    <221> variante
    <222> (12)..(12)
    <223> /substituir="Ala"
    <220>
30 <221> variante
    <222> (13)..(13)
    <223> /substituir="Thr" /substituir="Tyr"

```

<220>
 <221> MISC_ASPECTO
 <222> (2),(4)..(5),(8)..(13)
 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
 5 relação aos nas anotações para referidas posições"
 <400> 11
 Val Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser
 1 5 10
 <210> 12
 10 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> motivo de sequência de metionina sintase
 15 <220>
 <221> FONTE
 <222> (1)..(20)
 <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
 <220>
 20 <221> variante
 <222> (1)..(1)
 <223> /substituir="Tyr"
 <220>
 <221> variante
 25 <222> (2)..(2)
 <223> /substituir="Asp" /substituir="Glu"
 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 30 <223> /substituir="Val" /substituir="Gly" /substituir="Glu"
 <220>
 <221> variante

```

    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Phe"
    <220>

    <221> variante
5    <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Val" /substituir="Tyr"
    <220>

    <221> variante
    <222> (6)..(6)
10   <223> /substituir="Asp" /substituir="Ala" /substituir="Glu"
    <220>

    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Ala" /substituir="Asn"
15   <220>

    <221> variante
    <222> (8)..(8)
    <223> /substituir="Glu"
    <220>

20   <221> variante
    <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Gln" /substituir="Arg"
    <220>

    <221> variante
25   <222> (10)..(10)
    <223> /substituir="Arg"
    <220>

    <221> variante
    <222> (11)..(11)
30   <223> /substituir="Asn" /substituir="Ser" /substituir="Thr"
    <220>

    <221> variante

```

```

    <222> (12)..(12)
    <223> /substituir="Thr" /substituir="Val"
    <220>
    <221> variante
5  <222> (13)..(13)
    <223> /substituir="Glu" /substituir="Lys"
    <220>
    <221> variante
    <222> (14)..(14)
10 <223> /substituir="Ala" /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante
    <222> (15)..(15)
    <223> /substituir="Leu" /substituir="Met"
15 <220>
    <221> variante
    <222> (16)..(16)
    <223> /substituir="Val"
    <220>
    <221> variante
20 <222> (17)..(17)
    <223> /substituir="Ala"
    <220>
    <221> variante
25 <222> (18)..(18)
    <223> /substituir="Glu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (20)..(20)
30 <223> /substituir="Ala" /substituir="Val"
    <220>
    <221> misc_ASPECTO

```

```

<222> (1)..(18),(20)
<223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"
<400> 12
5 Phe Thr Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala Leu Gly Ile Ile
  1           5           10           15
  Glu Gly Gly Gly
    20
<210> 13
10 <211> 7
    <212> PRT
    <213> Artificial
    <220>
    <223> motivo de sequência de metionina sintase
15 <220>
    <221> FONTE
    <222> (1)..(7)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
20 <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Leu"          /substituir="Gly"
    <220>
    <221> variante
25 <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Leu"          /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante
    <222> (4)..(4)
30 <223> /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante

```

- <222> (5)..(5)
 <223> /substituir="Val" /substituir="Phe"
 <220>
 <221> MISC_ASPECTO
- 5 <222> (2)..(5)
 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
 relação aos nas anotações para referidas posições"
 <400> 13
 Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr
- 10 1 5
 <210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 15 <220>
 <223> motivo de sequência de metionina sintase
 <220>
 <221> FONTE
 <222> (1)..(14)
- 20 <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
 <220>
 <221> variante
 <222> (1)..(1)
 <223> /substituir="Phe" /substituir="Ser"
- 25 <220>
 <221> variante
 <222> (3)..(3)
 <223> /substituir="Thr" /substituir="Ile"
 <220>
- 30 <221> variante
 <222> (5)..(5)
 <223> /substituir="Asn" /substituir="Glu"

```

<220>
<221> variante
<222> (6)..(6)
<223> /substituir="Thr"          /substituir="Ala"          /substituir="Leu"
5 <220>
<221> variante
<222> (9)..(9)
<223> /substituir="Ser"
<220>
10 <221> variante
<222> (11)..(11)
<223> /substituir="Leu"          /substituir="Phe"
<220>
<221> variante
15 <222> (12)..(12)
<223> /substituir="Ala"
<220>
<221> variante
<222> (13)..(13)
20 <223> /substituir="Ala"
<220>
<221> variante
<222> (14)..(14)
<223> /substituir="Arg"          /substituir="Lys"
25 <220>
<221> MISC_ASPECTO
<222> (1),(3),(5)..(6),(9),(11)..(14)
<223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
      relação aos nas anotações para referidas posições"
30 <400> 14
      Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln

```

```

    <210> 15
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Artificial
5    <220>
    <223> motivo de sequência de metionina sintase
    <220>
    <221> FONTE
    <222> (1)..(12)
10   <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
    <221> variante
    <222> (1)..(1)
    <223> /substituir="Val"
15   <220>
    <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Gly"          /substituir="Ser"
    <220>
20   <221> variante
    <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Leu"          /substituir="Val"          /substituir="Arg"
    <220>
    <221> variante
25   <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Asp"          /substituir="Glu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (5)..(5)
30   <223> /substituir="Val"
    <220>
    <221> variante

```

```

    <222> (6)..(6)
    <223> /substituir="Phe"
    <220>
    <221> variante
5    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Leu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (8)..(8)
10   <223> /substituir="Met"
    <220>
    <221> variante
    <222> (9)..(9)
    <223> /substituir="Val"      /substituir="Ile"      /substituir="Ala"
15   <220>
    <221> variante
    <222> (10)..(10)
    <223> /substituir="Ser"
    <220>
20   <221> variante
    <222> (11)..(11)
    <223> /substituir="Gly"      /substituir="Met"
    <220>
    <221> MISC_ASPECTO
25   <222> (1)..(11)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"
    <400> 15
    Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr
30   1          5          10
    <210> 16
    <211> 13

```

```

<212>  PRT
<213>  Artificial
<220>
<223>  motivo de sequência de metionina sintase
5  <220>
    <221>  FONTE
    <222>  {1}..{13}
    <223>  /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
10  <221>  variante
    <222>  (1)..(1)
    <223>  /substituir="Ile"          /substituir="Phe"
    <220>
    <221>  variante
15  <222>  (2)..(2)
    <223>  /substituir="Thr"          /substituir="Asp"
    <220>
    <221>  variante
    <222>  (3)..(3)
20  <223>  /substituir="Asp"          /substituir="Glu"
    <220>
    <221>  variante
    <222>  (4)..(4)
    <223>  /substituir="Ala"          /substituir="Lys"
25  <220>
    <221>  variante
    <222>  (5)..(5)
    <223>  /substituir="Ser"
    <220>
30  <221>  MISC_ASPECTO
    <222>  (6)..(6)
    <223>  /nota="sem aminoácido nesta posição nos microorganismos T.

```

```

maritima, C. glutamicum, Str. coelicolor"
<220>
<221> variante
<222> (7)..(7)
5 <223> /substituir="Arg"
<220>
<221> variante
<222> (8)..(8)
<223> /substituir="Thr" /substituir="Ser"
10 <220>
<221> variante
<222> (10)..(10)
<223> /substituir="Leu" /substituir="Ser" /substituir="Thr"
<220>
15 <221> variante
<222> (12)..(12)
<223> /substituir="Gln" /substituir="Thr"
<220>
<221> variante
20 <222> (13)..(13)
<223> /substituir="Thr" /substituir="Asp"
<220>
<221> MISC_ASPECTO
<222> (1)..(8),(10),(12)..(13)
25 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
relação aos nas anotações para referidas posições"
<400> 16
Val Glu Thr Thr Gly Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu
1 5 10
30 <210> 17
<211> 7
<212> PRT

```

```

    <213> Artificial
    <220>
    <223> motivo de sequência de metionina sintase
    <220>

5    <221> FONTE
    <222> (1)..(7)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
    <221> variante
10   <222> (1)..(1)
    <223> /substituir="Glu"          /substituir="Ala"
    <220>
    <221> variante
    <222> (2)..(2)
15   <223> /substituir="Asn"
    <220>
    <221> variante
    <222> (3)..(3)
    <223> /substituir="Phe"
20   <220>
    <221> variante
    <222> (4)..(4)
    <223> /substituir="Tyr"          /substituir="Ala"
    <220>
25   <221> variante
    <222> (5)..(5)
    <223> /substituir="Asn"          /substituir="Ile"
    <220>
    <221> variante
30   <222> (6)..(6)
    <223> /substituir="Ser"          /substituir="Thr"
    <220>

```

```

    <221> variante
    <222> (7)..(7)
    <223> /substituir="Phe"
    <220>
5  <221> MISC_ASPECTO
    <222> (1)..(7)
    <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
        relação aos nas anotações para referidas posições"
    <400> 17
10 Gly Ala Ala Leu Thr Ala Leu
    1          5
    <210> 18
    <211> 17
    <212> PRT
15 <213> Artificial
    <220>
    <223> motivo de sequência de metionina sintase
    <220>
    <221> FONTE
20 <222> (1)..(17)
    <223> /nota="motivo de sequência de metionina sintase"
    <220>
    <221> variante
    <222> (1)..(1)
25 <223> /substituir="His"      /substituir="Glu"
    <220>
    <221> variante
    <222> (2)..(2)
    <223> /substituir="Ala"
30 <220>
    <221> variante
    <222> (3)..(3)

```

<223> /substituer="Glu" /substituer="Asp"
 <220>
 <221> variante
 <222> (4)..(4)
 5 <223> /substituer="Ala"
 <220>
 <221> variante
 <222> (5)..(5)
 <223> /substituer="Leu"
 10 <220>
 <221> variante
 <222> (6)..(6)
 <223> /substituer="Thr" /substituer="Ala"
 <220>
 15 <221> variante
 <222> (7)..(7)
 <223> /substituer="Phe" /substituer="Leu"
 <220>
 <221> variante
 20 <222> (9)..(9)
 <223> /substituer="Ile"
 <220>
 <221> variante
 <222> (12)..(12)
 25 <223> /substituer="Ser"
 <220>
 <221> variante
 <222> (13)..(13)
 <223> /substituer="Leu"
 30 <220>
 <221> variante
 <222> (16)..(16)

```

<223> /substituir="Ala"      /substituir="Glu"
<220>
<221> MISC_ASPECTO
<222> (1)..(7),(9),(12)..(13),(16)
5 <223> /nota="resíduos dados na sequência não tem preferência com
    relação aos nas anotações para referidas posições"
<400> 18
Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala Thr Gly Pro Asp
1           5           10           15
10 Glu
<210> 19
<211> 1221
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum
15 <220>
<221> MUTAGENE
<222> (33)..(33)
<223> metionina sintase MetH carregando mutação M33A
<400> 19
20 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
1           5           10           15
Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
20           25           30
Ala Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
25           35           40           45
Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
50           55           60
Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu
65           70           75           80
30 Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr
85           90           95
Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val

```

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

	355	360	365
	Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu		
	370	375	380
	Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln		
5	385	390	395 400
	Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val		
	405	410	415
	Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala		
	420	425	430
10	Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val		
	435	440	445
	Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser		
	450	455	460
	Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile		
15	465	470	475 480
	Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile		
	485	490	495
	Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala		
	500	505	510
20	Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys		
	515	520	525
	Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu		
	530	535	540
	Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu		
25	545	550	555 560
	Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile		
	565	570	575
	Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe		
	580	585	590
30	Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser		
	595	600	605
	Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val		

610 615 620
 Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
 5 645 650 655
 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685
 10 Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
 690 695 700
 Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 15 725 730 735
 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750
 Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765
 20 Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
 770 775 780
 Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
 785 790 795 800
 Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 25 805 810 815
 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 820 825 830
 Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845
 30 Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
 850 855 860
 Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu

•

1115 1120 1125
 His Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser
 1130 1135 1140
 Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu
 5 1145 1150 1155
 Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro
 1160 1165 1170
 Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Leu Glu Pro Gly
 1175 1180 1185
 10 Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu
 1190 1195 1200
 Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr
 1205 1210 1215
 Phe Asn Val
 15 1220
 <210> 20
 <211> 1221
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 20 <220>
 <221> MUTAGENE
 <222> (33)..(33)
 <223> metionina sintase MetH carregando mutação M33L
 <400> 20
 25 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
 20 25 30
 Gly Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
 30 35 40 45
 Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
 50 55 60

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

Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala
325 330 335

Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val
340 345 350

5 Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser
355 360 365

Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu
370 375 380

Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln
10 385 390 395 400

Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val
405 410 415

Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala
420 425 430

15 Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val
435 440 445

Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser
450 455 460

Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile
20 465 470 475 480

Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile
485 490 495

Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala
500 505 510

25 Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys
515 520 525

Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu
530 535 540

Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
30 545 550 555 560

Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
565 570 575

Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590
 Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 595 600 605
 5 Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
 610 615 620
 Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
 10 645 650 655
 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685
 15 Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
 690 695 700
 Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 20 725 730 735
 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750
 Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765
 25 Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
 770 775 780
 Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
 785 790 795 800
 Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 30 805 810 815
 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 820 825 830

Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845
 Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
 850 855 860
 5 Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
 865 870 875 880
 Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
 885 890 895
 Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
 10 900 905 910
 Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
 915 920 925
 Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
 930 935 940
 15 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
 945 950 955 960
 Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
 965 970 975
 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
 20 980 985 990
 Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
 995 1000 1005
 Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp His Val Ala Leu Val Tyr
 1010 1015 1020
 25 Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp Asp Val Val Ile Leu
 1025 1030 1035
 Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met Arg Phe Ser Phe
 1040 1045 1050
 Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala Asp Phe Ile
 30 1055 1060 1065
 Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp Val Met
 1070 1075 1080

Pro Phe Gln Leu Val Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe Ala
 1085 1090 1095
 Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val
 1100 1105 1110
 5 His Gly Ile Gly Val Gln Leu Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp
 1115 1120 1125
 His Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser
 1130 1135 1140
 Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu
 10 1145 1150 1155
 Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro
 1160 1165 1170
 Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Leu Glu Pro Gly
 1175 1180 1185
 15 Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu
 1190 1195 1200
 Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr
 1205 1210 1215
 Phe Asn Val
 20 1220
 <210> 21
 <211> 1221
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 25 <220>
 <221> MUTAGENE
 <222> (86)..(86)
 <223> metionina sintase Meth carregando mutação F86L
 <400> 21
 30 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala

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

	275	280	285
	Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Met Val Gly Gly		
	290	295	300
	Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Asp Ala Val		
5	305	310	315 320
	Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala		
	325	330	335
	Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val		
	340	345	350
10	Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser		
	355	360	365
	Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu		
	370	375	380
	Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln		
15	385	390	395 400
	Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val		
	405	410	415
	Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala		
	420	425	430
20	Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val		
	435	440	445
	Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser		
	450	455	460
	Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile		
25	465	470	475 480
	Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile		
	485	490	495
	Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala		
	500	505	510
30	Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys		
	515	520	525
	Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu		

530 535 540
 Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 5 565 570 575
 Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590
 Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 595 600 605
 10 Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
 610 615 620
 Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
 15 645 650 655
 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685
 20 Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
 690 695 700
 Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 25 725 730 735
 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750
 Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765
 30 Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
 770 775 780
 Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser

785 790 795 800
 Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 805 810 815
 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 5 820 825 830
 Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845
 Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
 850 855 860
 10 Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
 865 870 875 880
 Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
 885 890 895
 Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
 15 900 905 910
 Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
 915 920 925
 Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
 930 935 940
 20 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
 945 950 955 960
 Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
 965 970 975
 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
 25 980 985 990
 Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
 995 1000 1005
 Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp His Val Ala Leu Val Tyr
 1010 1015 1020
 30 Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp Asp Val Val Ile Leu
 1025 1030 1035
 Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met Arg Phe Ser Phe

	1040	1045	1050
	Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg	Phe Leu Cys Ile Ala	Asp Phe Ile
	1055	1060	1065
	Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val	Lys Asp Gly Gln Val	Asp Val Met
5	1070	1075	1080
	Pro Phe Gln Leu Val Thr Met	Gly Asn Pro Ile Ala	Asp Phe Ala
	1085	1090	1095
	Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn	Glu Tyr Arg Glu Tyr	Leu Glu Val
	1100	1105	1110
10	His Gly Ile Gly Val Gln Leu	Thr Glu Ala Leu Ala	Glu Tyr Trp
	1115	1120	1125
	His Ser Arg Val Arg Ser Glu	Leu Lys Leu Asn Asp	Gly Gly Ser
	1130	1135	1140
	Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu	Asp Lys Thr Lys Phe	Phe Asp Leu
15	1145	1150	1155
	Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe	Ser Phe Gly Tyr Gly	Ser Cys Pro
	1160	1165	1170
	Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys	Leu Val Glu Leu Leu	Glu Pro Gly
	1175	1180	1185
20	Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser	Glu Glu Leu Gln Leu	His Pro Glu
	1190	1195	1200
	Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val	Leu Tyr His Pro Glu	Ala Lys Tyr
	1205	1210	1215
	Phe Asn Val		
25	1220		
	<210> 22		
	<211> 1221		
	<212> PRT		
	<213> Corynebacterium glutamicum		
30	<220>		
	<221> MUTAGENE		
	<222> (134)..(134)		

<223> metionina sintase Meth carregando mutação S134N

<400> 22

Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser

1 5 10 15

5 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala

20 25 30

Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe

35 40 45

Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp

10 50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr

85 90 95

15 Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val

100 105 110

Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg

115 120 125

Arg Phe Val Val Gly Asn Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu

20 130 135 140

Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala

145 150 155 160

Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala

165 170 175

25 Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln Asp Ala

180 185 190

Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr Val

195 200 205

Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu

30 210 215 220

Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala

225 230 235 240

Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His
 245 250 255
 Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu
 260 265 270
 5 Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln
 275 280 285
 Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Met Val Gly Gly
 290 295 300
 Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Asp Ala Val
 10 305 310 315 320
 Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala
 325 330 335
 Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val
 340 345 350
 15 Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser
 355 360 365
 Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu
 370 375 380
 Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln
 20 385 390 395 400
 Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val
 405 410 415
 Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala
 420 425 430
 25 Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val
 435 440 445
 Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser
 450 455 460
 Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile
 30 465 470 475 480
 Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile
 485 490 495

Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys
 515 520 525
 5 Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu
 530 535 540
 Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 10 565 570 575
 Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590
 Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 595 600 605
 15 Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
 610 615 620
 Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
 20 645 650 655
 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685
 25 Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
 690 695 700
 Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 30 725 730 735
 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750

Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765
 Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
 770 775 780
 5 Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
 785 790 795 800
 Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 805 810 815
 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 10 820 825 830
 Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845
 Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
 850 855 860
 15 Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
 865 870 875 880
 Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
 885 890 895
 Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
 20 900 905 910
 Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
 915 920 925
 Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
 930 935 940
 25 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
 945 950 955 960
 Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
 965 970 975
 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
 30 980 985 990
 Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
 995 1000 1005

	Arg Leu	Lys Ser Glu Gly Ile	Leu Asp His Val Ala	Leu Val Tyr
	1010		1015	1020
	Gly Tyr	Phe Pro Ala Val Ala	Glu Gly Asp Asp Val	Val Ile Leu
	1025		1030	1035
5	Glu Ser	Pro Asp Pro His Ala	Ala Glu Arg Met Arg	Phe Ser Phe
	1040		1045	1050
	Pro Arg	Gln Gln Arg Gly Arg	Phe Leu Cys Ile Ala	Asp Phe Ile
	1055		1060	1065
	Arg Pro	Arg Glu Gln Ala Val	Lys Asp Gly Gln Val	Asp Val Met
10	1070		1075	1080
	Pro Phe	Gln Leu Val Thr Met	Gly Asn Pro Ile Ala	Asp Phe Ala
	1085		1090	1095
	Asn Glu	Leu Phe Ala Ala Asn	Glu Tyr Arg Glu Tyr	Leu Glu Val
	1100		1105	1110
15	His Gly	Ile Gly Val Gln Leu	Thr Glu Ala Leu Ala	Glu Tyr Trp
	1115		1120	1125
	His Ser	Arg Val Arg Ser Glu	Leu Lys Leu Asn Asp	Gly Gly Ser
	1130		1135	1140
	Val Ala	Asp Phe Asp Pro Glu	Asp Lys Thr Lys Phe	Phe Asp Leu
20	1145		1150	1155
	Asp Tyr	Arg Gly Ala Arg Phe	Ser Phe Gly Tyr Gly	Ser Cys Pro
	1160		1165	1170
	Asp Leu	Glu Asp Arg Ala Lys	Leu Val Glu Leu Leu	Glu Pro Gly
	1175		1180	1185
25	Arg Ile	Gly Val Glu Leu Ser	Glu Glu Leu Gln Leu	His Pro Glu
	1190		1195	1200
	Gln Ser	Thr Asp Ala Phe Val	Leu Tyr His Pro Glu	Ala Lys Tyr
	1205		1210	1215
	Phe Asn	Val		
30	1220			
	<210>	23		
	<211>	3666		

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> misc_ASPECTO

5 <223> metionina sintase meth

<400> 23

	atgtctactt cagttacttc accagccac aacaacgcac attcctccga atttttggat	60
	gcgttggcaa accatgtgtt gatcggcgac ggcgccatgg gcacccagct ccaaggcttt	120
	gacctggacg tggaaaagga ttctcttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac	180
10	acccgccctg atgtgttgag gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg	240
	gttgagacca atacttttgg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat	300
	cgttgccgtg agcttgcccta caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg	360
	gggccgggcc gaaacggcat gcggcgtttc gtggttgggt ccttgggacc tggaacgaag	420
	cttccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgctgt ggcaactaca ggaagcagcg	480
15	cttgatcatca tcgacgggtg tggcgatgcc ttttgattg agactgctca ggacttgctt	540
	caggtcaagg ctgcggttca cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg	600
	cccattatth gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc	660
	ggtgccgcgt tgacagcgct gcagccactg ggtatcgaca tgatttgtct gaactgcgcc	720
	accggcccag atgagatgag cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatatctct	780
20	gtgtcgggtga tgcctaacgc aggtcttctt gtctcgggta aaaacgggtg agaataccca	840
	cttgaggctg aggatttggc gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc	900
	atggtgggtg gttgttgttg caccacacct gagcacatcc gtgcgggtcc cgatgcgggtg	960
	gttggtgttc cagagcagga aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag	1020
	caggcctccc gcgaggtgga gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctgggtgcca	1080
25	ttgtcccagg aaaccggcat ttccatgac ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag	1140
	gcattccgtg aggcaatgct gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag	1200
	caaaccgcg atggtgcaca catgctggat ctttgtgttg attacgtggg acgagacggc	1260
	accgcccata tggcgacctt ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg	1320
	attgactcca ccgagccaga ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc	1380
30	atcggttaact ccgtcaactt tgaagacggc gatggccctg agtcccgtta ccagcgcata	1440
	atgaaactgg taaagcagca cgggtcggcc gtggttgccg tgaccattga tgaggaaggc	1500
	caggcacgta ccgctgagca caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc	1560

	ggcagctacg gcctggatat caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct	1620
	actggccagg aagaaaccag gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgagagctg	1680
	aagaagctct acccagaaat ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg	1740
	aaccctgctg cacgccagggt tcttaactct gtgttccctca atgagtgcac tgaggctggt	1800
5	ctggactctg cgattgcgca cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc	1860
	cagcgcaag tggcgttggga tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg	1920
	caggaattca tgcagctggt tgagggcgtt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct	1980
	gaacagctgg ccgctatgcc tttgtttgag cgtttggcac agcgcatcat cgacggcgat	2040
	aagaatggcc ttgaggatga tctggaagca ggcatgaagg agaagtctcc tattgcgac	2100
10	atcaacgagg accttctcaa cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag	2160
	atgcagctgc cattcgtgct gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg	2220
	gaaccgttca tggaagagga agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc	2280
	aaaatcgctg tggccaccgt caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac	2340
	atcattttgt ccaacaacgg ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc	2400
15	gccatgttgg aagcagcgga agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt	2460
	gtgaagtcca ccgtggtgat gaaggaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc	2520
	aattaccag tcattttggg tggcgtgctg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc	2580
	aacgaggtgt acaccggtga ggtgtactac gcccgatg ctttcgaggg cctgcgcctg	2640
	atggatgagg tgatggcaga aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct	2700
20	attgagcagg cgaagaagaa ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt	2760
	gccgcggagc gtaaagctaa tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc	2820
	accgatactc caaccgcggc accaccgttc tggggaaccc gcattgtcaa gggctctgcc	2880
	ttggcggagt tcttgggcaa cttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggtctg	2940
	aatccaccc gcggcaacga ggtccaagc tatgaggatt tggtggaac tgaaggccga	3000
25	ccacgcctgc gctactggct ggatcgctg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc	3060
	ttggtgtatg gctacttccc agcgtcgcg gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc	3120
	ccgatccac acgcagccga acgcatgcgc tttagcttcc cagccagca gcgcggcagg	3180
	ttcttgtgca tcgcggattt cattcgcca cgcagcaag ctgtcaagga cggccaagtg	3240
	gacgtcatgc cattccagct ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag	3300
30	ttgttcgcag ccaatgaata ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc	3360
	accgaagcat tggccgagta ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac	3420
	ggtggatctg tcgctgattt tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac	3480

cgcggcgccc gcttctcctt tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag 3540
ctggtggaat tgctcgagcc aggccgtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg 3600
caccagagc agtccacaga cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac 3660
gtctaa 3666

5 <210> 24
<211> 735
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*
<220>

10 <221> misc_ASPECTO
<223> dominio de ligação de homocisteína de metionina sintase meth
<400> 24

atgtctactt cagttacttc accagccac aacaacgcac attcctccga atttttggat 60
gcgttggcaa accatgtggt gatcggcgac ggcgccatgg gcaccagct ccaaggcttt 120

15 gacctggacg tggaaaagga tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac 180
acccgccctg atgtgttgag gcagattcac cgcgccact ttgaggcggg agctgacttg 240
gttgagacca atacttttgg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat 300
cgttgccgtg agcttgcccta caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg 360
gggccggggc gaaacggcat gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag 420

20 cttccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgcgtg ggcactacaa ggaagcagcg 480
cttggcatca tcgacggtgg tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt 540
caggtcaagg ctgcggttca cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg 600
cccattattt gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc 660
ggtgccgcgt tgacagcgct gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc 720

25 accggcccag atgag 735

<210> 25
<211> 3666
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

30 <220>
<221> misc_ASPECTO
<223> sequência de codificação de metionina sintase MetH carregando mutação

M33A

<400> 25

	atgtctactt cagttacttc accagccac aacaacgcac attcctccga atttttggat	60
	gcgttgga accatgtgtt gatcggcgac ggcgccatgg gcaccagct ccaaggcttt	120
5	gacctggacg tggaaaagga ttctcttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac	180
	accgccttg atgtgttgag gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg	240
	gttgagacca atacttttg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat	300
	cgttgccgtg agcttgccca caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg	360
	gggcggggcc gaaacggcat gcggcgcttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag	420
10	cttccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgctg ggcactacaa ggaagcagcg	480
	cttggcatca tcgacgggtg tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt	540
	cagggtcaagg ctgcggttca cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg	600
	ccattatatt gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc	660
	ggtgccgctg tgacagcgt gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc	720
15	accggcccag atgagatgag cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct	780
	gtgtcggtga tgccaaacgc aggtcttcct gtcctgggta aaaacgggtgc agaataccca	840
	cttgaggctg aggatttggc gcaggcgtg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc	900
	atggtgggtg gttgttggg caccacacct gagcacatcc gtgcgggtccg cgatgcgggtg	960
	gttgggtgtc cagagcagga aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag	1020
20	caggcctccc gcgaggtgga gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctccgtgcca	1080
	ttgtcccagg aaaccggcat ttccatgatc ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag	1140
	gcattccgtg aggcaatgct gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag	1200
	caaaccgcg atggtgcaca catgctggat cttgtgtgg attacgtggg acgagacggc	1260
	accgccgata tggcgacctt ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg	1320
25	attgactcca ccgagccaga ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc	1380
	atcgtaact cgtcaactt tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcac	1440
	atgaaactgg taaagcagca cgggtgcggc gtggttgccg tgaccattga tgaggaaggc	1500
	caggcacgta ccgctgagca caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc	1560
	ggcagctacg gcctggatat caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct	1620
30	actggccagg aagaaaccag gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg	1680
	aagaagctct acccagaaat ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatctt cttcggcctg	1740
	aaccctgctg cagccaggt tcttaactct gtgttcctca atgagtgcac tgaggctggt	1800

	ctggactctg cgattgcgca cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc	1860
	cagcgcggaag tggcgttgga tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg	1920
	caggaattca tgcagctggt tgagggcggt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct	1980
	gaacagctgg ccgctatgcc tttgtttgag cgtttggcac agcgcatcat cgacggcgat	2040
5	aagaatggcc ttgaggatga tctggaagca ggcatgaagg agaagtctcc tattgcgac	2100
	atcaacgagg accttctcaa cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag	2160
	atgcagctgc cattcgtgct gcaatcggca gaaacatga aaactgcggt ggcctatttg	2220
	gaaccgttca tggaaagagga agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc	2280
	aaaatcgtcg tggccaccgt caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac	2340
10	atcattttgt ccaacaacgg ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc	2400
	gccatgttgg aagcagcggg agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt	2460
	gtgaagtcca ccgtggtgat gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc	2520
	aattaccag tcattttggg tggcgctgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc	2580
	aacgaggtgt acaccggtga ggtgtactac gcccgatg ctttcgaggg cctgcgcctg	2640
15	atggatgagg tgatggcaga aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct	2700
	attgagcagg cgaagaagaa ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt	2760
	gccgcggagc gtaaagctaa tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc	2820
	accgatactc caaccgcggc accaccgttc tggggaacct gcattgtcaa gggctcgccc	2880
	ttggcggagt tcttgggcaa ccttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggtctg	2940
20	aaatccaccc gcggcaacga ggtccaagc tatgaggatt tggtggaac tgaaggccga	3000
	ccacgcctgc gctactggct ggatcgctg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc	3060
	ttggtgtatg gctacttccc agcggctcgc gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc	3120
	ccgatccac acgcagccga acgcatgcgc ttagcttcc cagccagca gcgcggcagg	3180
	ttcttgtgca tcgcggattt cattcgcca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg	3240
25	gacgtcatgc cattccagct ggtcaccatg ggtaactcta ttgctgattt cgccaacgag	3300
	ttgttcgcag ccaatgaata ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc	3360
	accgaagcat tggccgagta ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac	3420
	ggtggatctg tcgctgattt tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac	3480
	cgcggcgccc gcttctcctt tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag	3540
30	ctggtggaat tgctcgagcc aggcggtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg	3600
	caccagagc agtccacaga cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac	3660
	gtctaa	3666

```

<210> 26
<211> 3666
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
5 <220>
<221> misc_ASPECTO
<223> sequência de codificação de metionina sintase MetH carregando mutação
      M33L
<400> 26
10 atgtctactt cagttacttc accagccac aacaacgcac attcctccga atttttggat 60
   gcggttgcaa accatgtggt gatcggcgac ggcgccatgg gcacccagct ccaaggcttt 120
   gacctggacg tggaaaagga tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac 180
   acccgccctg atgtgttgag gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg 240
   gttgagacca atacttttgg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat 300
15 cgttgccgtg agcttgcta caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg 360
   gggccggggc gaaacggcat gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag 420
   cttccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgctg ggcactacaa ggaagcagcg 480
   cttggcatca tcgacggtg tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt 540
   caggtcaagg ctgcggttca cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg 600
20 cccattattt gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc 660
   ggtgccgcgt tgacagcgct gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc 720
   accggcccag atgagatgag cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct 780
   gtgtcggtg tgcctaacgc aggtcttcct gtctgggta aaaacggtgc agaataccca 840
   cttgaggctg aggatttggc gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc 900
25 atggtgggtg gttgttggtg caccacacct gagcacatcc gtgcggtccg cgatgcggtg 960
   gttggtgttc cagagcagga aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg cctgttgag 1020
   caggcctccc gcgaggtgga gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctcggtgcca 1080
   ttgtcccagg aaaccggcat ttccatgatc ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag 1140
   gcattccgtg aggcaatgct gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag 1200
30 caaaccgcg atggtgcaca catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc 1260
   accgcgata tggcgacctt ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg 1320
   attgactcca ccgagccaga ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc 1380

```

	atcgttaact ccgtcaactt tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcatac	1440
	atgaaactgg taaagcagca cgggtgcggcc gtggttgccg tgaccattga tgaggaagggc	1500
	caggcacgta ccgctgagca caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc	1560
	ggcagctacg gcctggatat caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct	1620
5	actggccagg aagaaaccag gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg	1680
	aagaagctct acccagaaat ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatitc cttcggcctg	1740
	aaccctgctg cacgccaggt tcttaactct gtgttcctca atgagtgcac tgaggctggc	1800
	ctggactctg cgattgcgca cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc	1860
	cagcgcgaag tggcgttga tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg	1920
10	caggaattca tgcagctgtt tgagggcgtt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct	1980
	gaacagctgg ccgctatgcc tttgtttgag cgtttggcac agcgcacatc cgacggcgat	2040
	aagaatggcc ttgaggatga tctggaagca ggcataagga agaagtctcc tattgcgac	2100
	atcaacgagg accttctcaa cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag	2160
	atgcagctgc cattcgtgct gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg	2220
15	gaaccgttca tggaagagga agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc	2280
	aaaatcgtcg tggccaccgt caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac	2340
	atcattttgt ccaacaacgg ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc	2400
	gccatgttgg aagcagcgga agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt	2460
	gtgaagtcca ccgtggtgat gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcaccc	2520
20	aattaccag tcattttggg tggcgtcgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc	2580
	aacgaggtgt acaccggtga ggtgtactac gcccgatg ctctcgaggg cctgcgcctg	2640
	atggatgagg tgatggcaga aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct	2700
	attgagcagg cgaagaagaa ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt	2760
	gccgcggagc gtaaagctaa tgcggtctcc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc	2820
25	accgatactc caaccgcggc accaccgttc tggggaaccc gcattgtcaa gggctctgcc	2880
	ttggcggagt tcttgggcaa cttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggtctg	2940
	aaatccaccc gcggcaacga ggtccaagc tatgaggatt tgggtgaaac tgaaggccga	3000
	ccacgcctgc gctactggct ggatcgctg aagtctgagg gcatttttga ccacgtggcc	3060
	ttggtgtatg gctacttccc agcggtcgcg gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc	3120
30	ccggatccac acgcagccga acgcatgcgc tttagcttcc cagccagca gcgcggcagg	3180
	ttcttgtgca tcgcggattt cattcgccca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg	3240
	gacgtcatgc cattccagct ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag	3300

ttgttcgcag ccaatgaata ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc 3360
 accgaagcat tggccgagta ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac 3420
 ggtggatctg tcgctgattt tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac 3480
 cgcggcgccc gcttctcctt tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag 3540
 5 ctggtggaat tgctcgagcc aggccgtatc ggcgaggagt tgtecgagga actccagctg 3600
 caccagagc agtccacaga cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac 3660
 gtctaa 3666
 <210> 27
 <211> 3666
 10 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> misc_ASPECTO
 <223> sequência de codificação de metionina sintase MetH carregando mutação
 15 F86L
 <400> 27
 atgtctactt cagttacttc accagcccac aacaacgcac attcctccga atttttggat 60
 gcggttgcaa accatgtggt gatcgggcag ggccgcatgg gcacccagct ccaaggcttt 120
 gacctggacg tggaaaagga tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac 180
 20 acccgccctg atgtgttgag gcagattcac cgcgccctact ttgaggcggg agctgacttg 240
 gttgagacca atacttttgg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat 300
 cgttgccgtg agcttgccca caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg 360
 gggccggggc gaaacggcat gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag 420
 ctcccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgctg ggcactacaa ggaagcagcg 480
 25 cttggcatca tcgacggtg tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt 540
 caggtcaagg ctgcggttca cggcgttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg 600
 cccattatit gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg tcttgagatc 660
 ggtgccgcgt tgacagcgct gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc 720
 accggcccag atgagatgag cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct 780
 30 gtgtcggtga tgcctaacgc aggtcttcct gtctgggta aaaacggtgc agaataccca 840
 cttgaggctg aggatttggc gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc 900
 atggtgggtg gttgttggg caccacacct gagcacatcc gtgcgggtcc cgatgcggtg 960

	gttggtgttc cagagcagga aacctccaca ctgaccaaga tccctgcagg ccctgttgag	1020
	caggcctccc gcgaggtgga gaaagaggac tccgtcgcgt cgctgtacac ctcggtgcc	1080
	ttgtcccagg aaaccggcat ttccatgacg ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag	1140
	gcattccgtg aggcaatgct gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag	1200
5	caaaccgcg atggtgcaca catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc	1260
	accgccgata tggcgacctt ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg	1320
	attgactcca ccgagccaga ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc	1380
	atcgtaaact ccgtcaactt tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcac	1440
	atgaaactgg taaagcagca cggtgcggcc gtggttgccg tgaccattga tgaggaaggc	1500
10	caggcacgta ccgctgagca caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc	1560
	ggcagctacg gcctggatat caaagacacg gttgtggact gcctgacctt cccgatctct	1620
	actggccagg aagaaaccag gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg	1680
	aagaagctct acccagaaat ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg	1740
	aaccctgctg cagccaggt tcttaactct gtgttcctca atgagtgcac tgaggctggt	1800
15	ctggactctg cgattgcgca cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc	1860
	cagcgcgaag tggcgttgga tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg	1920
	caggaattca tgcagctgtt tgaggggcgtt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct	1980
	gaacagctgg ccgctatgcc tttgtttgag cgtttggcac agcgcatcat cgacggcgat	2040
	aagaatggcc ttgaggatga tctggaagca ggcataagg agaagtctcc tattgcgac	2100
20	atcaacgagg accttctcaa cggcatgaag accgtgggtg agctgtttgg ttccggacag	2160
	atgcagctgc cattcgtgct gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggt ggcctatttg	2220
	gaaccgttca tggaagagga agcagaagct accgatctg cgcaggcaga gggcaagggc	2280
	aaaatcgtcg tggccaccgt caagggcgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac	2340
	atcattttgt ccaacaacgg ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc	2400
25	gccatgttgg aagcagcgga agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt	2460
	gtgaagtcca ccgtggtgat gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc	2520
	aattaccag tcattttggg tggcgctgcg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc	2580
	aacgaggtgt acaccggtga ggtgtactac gcccgatg ctttcgaggg cctgcgcctg	2640
	atggatgagg tgatggcaga aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct	2700
30	attgagcagg cgaagaagaa ggcggaacgt aaggctcgta atgagcgttc ccgcaagatt	2760
	gccgcggagc gtaaagctaa tgcggctccc gtgattgttc cggagcgttc tgatgtctcc	2820
	accgatactc caaccgcggc accaccgttc tggggaaccc gcattgtcaa gggctctgcc	2880

	ttggcggagt tcttgggcaa ccttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggctctg	2940
	aaatccaccc gcggcaacga gggccaagc tatgaggatt tggtgaaaac tgaaggccga	3000
	ccacgcctgc gctactggct ggatcgctg aagtctgagg gcatttttga ccacgtggcc	3060
	ttggtgtatg gctacttccc agcggtcgcg gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc	3120
5	ccggatccac acgcagccga acgcatgcgc tttagcttcc cacgccagca gcgcggcagg	3180
	ttcttgtgca tcgcggatth cattcgcccc cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg	3240
	gacgtcatgc cattccagct ggtaaccatg ggtaaatccta ttgctgattt cgccaacgag	3300
	ttgttcgcag ccaatgaata ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc	3360
	accgaagcat tggccgagta ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac	3420
10	ggtggatctg tcgctgattt tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac	3480
	cgcgggcgccc gcttctcctt tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag	3540
	ctggtggaat tgctcgagcc aggcggtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg	3600
	cacccagagc agtccacaga cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac	3660
	gtctaa	3666
15	<210> 28	
	<211> 3666	
	<212> DNA	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
20	<221> misc_ASPECTO	
	<223> sequência de codificação de metionina sintase Meth carregando mutação S134N	
	<400> 28	
	atgtctactt cagttacttc accagcccac aacaacgcac attcctccga atttttggat	60
25	gcgttggaac accatgtgtt gatcggcgac ggcccatgg gcacccagct ccaaggcttt	120
	gacctggacg tggaaaagga tttccttgat ctggaggggt gtaatgagat tctcaacgac	180
	acccgccctg atgtgttgag gcagattcac cgcgcctact ttgaggcggg agctgacttg	240
	gttgagacca atacttttgg ttgcaacctg ccgaacttgg cggattatga catcgctgat	300
	cgttgccgtg agcttgcta caagggcact gcagtggcta gggaagtggc tgatgagatg	360
30	gggccgggcc gaaacggcat gcggcgtttc gtggttggtt ccctgggacc tggaacgaag	420
	cttccatcgc tgggccatgc accgtatgca gatttgctg ggcaactaaa ggaagcagcg	480
	cttgcatca tcgacggtg tggcgatgcc tttttgattg agactgctca ggacttgctt	540

	cagggtcaagg ctgcggttca cggcggttcaa gatgccatgg ctgaacttga tacattcttg	600
	cccattatatt gccacgtcac cgtagagacc accggcacca tgctcatggg ttctgagatc	660
	ggtgccgcgt tgacagcgct gcagccactg ggtatcgaca tgattggtct gaactgcgcc	720
	accggcccag atgagatgag cgagcacctg cgttacctgt ccaagcacgc cgatattcct	780
5	gtgtcgggtga tgcctaacgc aggtcttctt gtcttgggta aaaacgggtgc agaataacca	840
	cttgaggctg aggatttggc gcaggcgctg gctggattcg tctccgaata tggcctgtcc	900
	atggtgggtg gttgttgtgg caccacacct gagcacatcc gtgcgggtccg cgatgcgggtg	960
	gttgggtgtt cagagcagga aacctccaca ctgaccaaga tccttgcagg cctgtttgag	1020
	caggcctccc gcgaggtgga gaaagaggac tccgtcgctg cgctgtacac ctcggtgcca	1080
10	ttgtcccagg aaaccggcat ttccatgacg ggtgagcgca ccaactccaa cggttccaag	1140
	gcattccgtg aggcaatgct gtctggcgat tgggaaaagt gtgtggatat tgccaagcag	1200
	caaaccgcg atggtgcaca catgctggat ctttgtgtgg attacgtggg acgagacggc	1260
	accgccgata tggcgacctt ggcagcactt cttgctacca gctccacttt gccaatcatg	1320
	attgactcca ccgagccaga ggttattcgc acaggccttg agcacttggg tggacgaagc	1380
15	atcgttaaact ccgtcaactt tgaagacggc gatggccctg agtcccgcta ccagcgcac	1440
	atgaaactgg taaagcagca cgggtgcggc gtgggttgcgc tgaccattga tgaggaaggc	1500
	caggcacgta ccgtgagca caaggtgcgc attgctaaac gactgattga cgatatcacc	1560
	ggcagctacg gcctggatat caaagacatc gttgtggact gcctgacctt cccgatctct	1620
	actggccagg aagaaaccag gcgagatggc attgaaacca tcgaagccat ccgcgagctg	1680
20	aagaagctct acccagaaat ccacaccacc ctgggtctgt ccaatatttc cttcggcctg	1740
	aaccctgctg cagccaggt tcttaactct gtgttctctc atgagtgcac tgaggctggt	1800
	ctggactctg cgattgcgca cagctccaag attttgccga tgaaccgcat tgatgatcgc	1860
	cagcgcgaag tggcgttgga tatggtctat gatcgccgca ccgaggatta cgatccgctg	1920
	caggaattca tgcagctggt tgagggcggt tctgctgccg atgccaagga tgctcgcgct	1980
25	gaacagctgg ccgtatgcc tttgtttgag cgtttggcac agcgcacatc cgacggcgat	2040
	aagaatggcc ttgaggatga tctggaagca ggcatgaagg agaagtctcc tattgcgac	2100
	atcaacgagg accttctcaa cggcataag accgtgggtg agctgtttgg ttcoggacag	2160
	atgcagctgc cattcgtgct gcaatcggca gaaaccatga aaactgcggg ggcctatttg	2220
	gaaccgttca tggaagagga agcagaagct accggatctg cgcaggcaga gggcaagggc	2280
30	aaaatcgctg tggccaccgt caagggtgac gtgcacgata tcggcaagaa cttggtggac	2340
	atcattttgt ccaacaacgg ttacgacgtg gtgaacttgg gcatcaagca gccactgtcc	2400
	gccatgttgg aagcagcggg agaacacaaa gcagacgtca tcggcatgtc gggacttctt	2460

gtgaagtcca ccgtggtgat gaaggaaaac cttgaggaga tgaacaacgc cggcgcatcc 2520
 aattaccag tcattttggg tggcgtgctg ctgacgcgta cctacgtgga aaacgatctc 2580
 aacgaggtgt acaccggtga ggtgtactac gcccgatgat ctttcgaggg cctgcgcctg 2640
 atggatgagg tgatggcaga aaagcgtggt gaaggacttg atcccaactc accagaagct 2700
 5 attgagcagg cgaagaagaa ggcggaacgt aaggctcgta atgagcggtc cgcgaagatt 2760
 gccgcggagc gtaaagctaa tgcggctccc gtgattgttc cggagcggtc tgatgtctcc 2820
 accgatactc caaccgcggc accacggttc tggggaaccc gcattgtcaa gggctctgcc 2880
 ttggcggagt tcttgggcaa cttgatgag cgcgccttgt tcatggggca gtggggctctg 2940
 aaatccaccc gcgcaacga ggtccaagc tatgaggatt tggtggaac tgaaggccga 3000
 10 ccacgcctgc gctactggct ggatcgctg aagtctgagg gcattttgga ccacgtggcc 3060
 ttggtgtatg gctacttccc agcggctcgc gaaggcgatg acgtggtgat cttggaatcc 3120
 ccgcatccac acgcagccga acgcatgcgc tttagcttcc cagccagca gcgcggcagg 3180
 ttcttgtgca tcgcggattt cattcgcca cgcgagcaag ctgtcaagga cggccaagtg 3240
 gacgtcatgc cattccagct ggtcaccatg ggtaatccta ttgctgattt cgccaacgag 3300
 15 ttgttcgcag ccaatgaata ccgcgagtac ttggaagttc acggcatcgg cgtgcagctc 3360
 accgaagcat tggccgagta ctggcactcc cgagtgcgca gcgaactcaa gctgaacgac 3420
 ggtggatctg tcgctgattt tgatccagaa gacaagacca agttcttcga cctggattac 3480
 cgcgcgccc gcttctcctt tggttacggt tcttgccctg atctggaaga ccgcgcaaag 3540
 ctggtggaat tgctcgagcc aggcggtatc ggcgtggagt tgtccgagga actccagctg 3600
 20 caccagagc agtccacaga cgcgtttgtg ctctaccacc cagaggcaaa gtactttaac 3660
 gtctaa 3666
 <210> 29
 <211> 1170
 <212> PRT
 25 <213> Streptomyces coelicolor
 <220>
 <221> misc_ASPECTO
 <223> metionina sintase meth
 <400> 29
 30 Met Ala Ser Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Asp Thr Arg Thr Arg Val
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Arg Glu Ala Leu Ala Thr Arg Val Val Val Ala Asp Gly

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

	275	280	285
	His Glu Thr Phe Val Arg Glu Tyr Gly Leu Ser Leu Val Gly Gly Cys		
	290	295	300
	Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Leu Arg Gln Val Val Glu Arg Val Arg		
5	305	310	315 320
	Asp Thr Ala Pro Thr Ala Arg Asp Pro Arg Pro Glu Pro Gly Ala Ala		
	325	330	335
	Ser Leu Tyr Gln Thr Val Pro Phe Arg Gln Asp Thr Ser Tyr Leu Ala		
	340	345	350
10	Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ala Asn Gly Ser Lys Lys Phe Arg Glu Ala		
	355	360	365
	Met Leu Asp Gly Arg Trp Asp Asp Cys Val Glu Met Ala Arg Asp Gln		
	370	375	380
	Ile Arg Glu Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val Gly		
15	385	390	395 400
	Arg Asp Gly Val Ala Asp Met Glu Glu Leu Ala Gly Arg Phe Ala Thr		
	405	410	415
	Ala Ser Thr Leu Pro Ile Val Leu Asp Ser Thr Glu Val Asp Val Ile		
	420	425	430
20	Arg Ala Gly Leu Glu Lys Leu Gly Gly Arg Ala Val Ile Asn Ser Val		
	435	440	445
	Asn Tyr Glu Asp Gly Ala Gly Pro Glu Ser Arg Phe Ala Arg Val Thr		
	450	455	460
	Lys Leu Ala Arg Glu His Gly Ala Ala Leu Ile Ala Leu Thr Ile Asp		
25	465	470	475 480
	Glu Val Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu Lys Lys Val Glu Ile Ala Glu		
	485	490	495
	Arg Leu Ile Asp Asp Leu Thr Gly Asn Trp Gly Ile His Glu Ser Asp		
	500	505	510
30	Ile Leu Val Asp Cys Leu Thr Phe Thr Ile Cys Thr Gly Gln Glu Glu		
	515	520	525
	Ser Arg Lys Asp Gly Leu Ala Thr Ile Glu Gly Ile Arg Glu Leu Lys		

530 535 540
 Arg Arg His Pro Asp Val Gln Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile Ser
 545 550 555 560
 Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Ile Leu Leu Asn Ser Val Phe Leu
 5 565 570 575
 Asp Glu Cys Val Lys Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Val His Ala Ser
 580 585 590
 Lys Ile Leu Pro Ile Ala Arg Phe Asp Glu Glu Gln Val Thr Thr Ala
 595 600 605
 10 Leu Asp Leu Ile Tyr Asp Arg Arg Arg Glu Gly Tyr Asp Pro Leu Gln
 610 615 620
 Lys Leu Met Gln Leu Phe Glu Gly Ala Thr Ala Lys Ser Leu Lys Ala
 625 630 635 640
 Ser Lys Ala Glu Glu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Glu Glu Arg Leu Lys
 15 645 650 655
 Arg Arg Ile Ile Asp Gly Glu Lys Asn Gly Leu Glu Gln Asp Leu Asp
 660 665 670
 Glu Ala Leu Arg Glu Arg Pro Ala Leu Glu Ile Val Asn Asp Thr Leu
 675 680 685
 20 Leu Asp Gly Met Lys Val Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln Met
 690 695 700
 Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Val Met Lys Thr Ala Val
 705 710 715 720
 Ala His Leu Glu Pro His Met Glu Lys Thr Asp Asp Asp Gly Lys Gly
 25 725 730 735
 Thr Ile Val Leu Ala Thr Val Arg Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys
 740 745 750
 Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser Asn Asn Gly Tyr Asn Val Val Asn
 755 760 765
 30 Leu Gly Ile Lys Gln Pro Val Ser Ala Ile Leu Glu Ala Ala Asp Glu
 770 775 780
 His Arg Ala Asp Val Ile Gly Met Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr

	785		790		795		800
	Val	Ile	Met	Lys	Glu	Asn	Leu
					Glu	Glu	Leu
					Asn	Gln	Arg
					Lys	Leu	Ala
			805		810		815
	Ala	Asp	Tyr	Pro	Val	Ile	Leu
					Gly	Gly	Ala
					Ala	Ala	Leu
					Thr	Arg	Ala
5			820		825		830
	Val	Glu	Gln	Asp	Leu	His	Glu
					Ile	Tyr	Asp
					Gly	Glu	Val
					Arg	Tyr	Ala
			835		840		845
	Arg	Asp	Ala	Phe	Glu	Gly	Leu
					Arg	Leu	Met
					Asp	Ala	Leu
					Ile	Gly	Ile
			850		855		860
10	Lys	Arg	Gly	Val	Pro	Gly	Ala
					Lys	Leu	Pro
					Glu	Leu	Lys
					Gln	Arg	Arg
			865		870		875
							880
	Val	Arg	Ala	Ala	Thr	Val	Glu
					Ile	Asp	Glu
					Arg	Pro	Glu
					Glu	Gly	His
			885		890		895
	Val	Arg	Ser	Asp	Val	Ala	Thr
					Asn	Pro	Val
					Pro	Thr	Pro
					Pro	Pro	Phe
15			900		905		910
	Arg	Gly	Thr	Arg	Val	Val	Lys
					Gly	Ile	Gln
					Leu	Lys	Glu
					Tyr	Ala	Ser
			915		920		925
	Trp	Leu	Asp	Glu	Gly	Ala	Leu
					Phe	Lys	Gly
					Gln	Trp	Gly
					Leu	Lys	Gln
			930		935		940
20	Ala	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Pro
					Ser	Tyr	Glu
					Glu	Leu	Val
					Glu	Ser	Glu
			945		950		955
							960
	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly
					Leu	Leu	Asp
					Arg	Leu	Gln
					Thr	Asp	Asn
			965		970		975
	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Val
					Tyr	Gly	Tyr
					Phe	Pro	Cys
					Val	Ser	Lys
25			980		985		990
	Asp	Asp	Asp	Leu	Ile	Val	Leu
					Asp	Asp	Asp
					Gly	Asn	Glu
					Arg	Thr	Arg
			995		1000		1005
	Phe	Thr	Phe	Pro	Arg	Gln	Arg
					Arg	Gly	Arg
					Arg	Leu	Cys
					Leu	Ala	
			1010		1015		1020
30	Asp	Phe	Phe	Arg	Pro	Glu	Glu
					Ser	Gly	Glu
					Thr	Asp	Val
					Val	Gly	
			1025		1030		1035
	Phe	Gln	Val	Val	Thr	Val	Gly
					Ser	Arg	Ile
					Gly	Glu	Glu
					Thr	Ala	

1040 1045 1050
 Arg Met Phe Glu Ala Asn Ala Tyr Arg Asp Tyr Leu Glu Leu His
 1055 1060 1065
 Gly Leu Ser Val Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His
 5 1070 1075 1080
 Ala Arg Val Arg Ser Glu Leu Gly Phe Ala Gly Glu Asp Pro Ala
 1085 1090 1095
 Glu Met Glu Asp Met Phe Ala Leu Lys Tyr Arg Gly Ala Arg Phe
 1100 1105 1110
 10 Ser Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Pro Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys
 1115 1120 1125
 Ile Ala Ala Leu Leu Glu Pro Glu Arg Ile Gly Val His Leu Ser
 1130 1135 1140
 Glu Glu Phe Gln Leu His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Ile Val
 15 1145 1150 1155
 Ile His His Pro Glu Ala Lys Tyr Phe Asn Ala Arg
 1160 1165 1170
 <210> 30
 <211> 1226
 20 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> misc_ASPECTO
 <223> metionina sintase dependente de cobalamina MetH
 25 <400> 30
 Ser Ser Lys Val Glu Gln Leu Arg Ala Gln Leu Asn Glu Arg Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Asp Gly Gly Met Gly Thr Met Ile Gln Ser Tyr Arg Leu Asn
 20 25 30
 30 Glu Ala Asp Phe Arg Gly Glu Arg Phe Ala Asp Trp Pro Cys Asp Leu
 35 40 45
 Lys Gly Asn Asn Asp Leu Leu Val Leu Ser Lys Pro Glu Val Ile Ala

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

305 310 315 320
 Ser Arg Ala Val Glu Gly Leu Ala Pro Arg Lys Leu Pro Glu Ile Pro
 325 330 335
 Val Ala Cys Arg Leu Ser Gly Leu Glu Pro Leu Asn Ile Gly Glu Asp
 5 340 345 350
 Ser Leu Phe Val Asn Val Gly Glu Arg Thr Asn Val Thr Gly Ser Ala
 355 360 365
 Lys Phe Lys Arg Leu Ile Lys Glu Glu Lys Tyr Ser Glu Ala Leu Asp
 370 375 380
 10 Val Ala Arg Gln Gln Val Glu Asn Gly Ala Gln Ile Ile Asp Ile Asn
 385 390 395 400
 Met Asp Glu Gly Met Leu Asp Ala Glu Ala Ala Met Val Arg Phe Leu
 405 410 415
 Asn Leu Ile Ala Gly Glu Pro Asp Ile Ala Arg Val Pro Ile Met Ile
 15 420 425 430
 Asp Ser Ser Lys Trp Asp Val Ile Glu Lys Gly Leu Lys Cys Ile Gln
 435 440 445
 Gly Lys Gly Ile Val Asn Ser Ile Ser Met Lys Glu Gly Val Asp Ala
 450 455 460
 20 Phe Ile His His Ala Lys Leu Leu Arg Arg Tyr Gly Ala Ala Val Val
 465 470 475 480
 Val Met Ala Phe Asp Glu Gln Gly Gln Ala Asp Thr Arg Ala Arg Lys
 485 490 495
 Ile Glu Ile Cys Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Thr Glu Glu Val Gly
 25 500 505 510
 Phe Pro Pro Glu Asp Ile Ile Phe Asp Pro Asn Ile Phe Ala Val Ala
 515 520 525
 Thr Gly Ile Glu Glu His Asn Asn Tyr Ala Gln Asp Phe Ile Gly Ala
 530 535 540
 30 Cys Glu Asp Ile Lys Arg Glu Leu Pro His Ala Leu Ile Ser Gly Gly
 545 550 555 560
 Val Ser Asn Val Ser Phe Ser Phe Arg Gly Asn Asp Pro Val Arg Glu

	565	570	575
	Ala Ile His Ala Val Phe Leu Tyr Tyr Ala Ile Arg Asn Gly Met Asp		
	580	585	590
5	Met Gly Ile Val Asn Ala Gly Gln Leu Ala Ile Tyr Asp Asp Leu Pro		
	595	600	605
	Ala Glu Leu Arg Asp Ala Val Glu Asp Val Ile Leu Asn Arg Arg Asp		
	610	615	620
	Asp Gly Thr Glu Arg Leu Leu Glu Leu Ala Glu Lys Tyr Arg Gly Ser		
	625	630	635
10	Lys Thr Asp Asp Thr Ala Asn Ala Gln Gln Ala Glu Trp Arg Ser Trp		
	645	650	655
	Glu Val Asn Lys Arg Leu Glu Tyr Ser Leu Val Lys Gly Ile Thr Glu		
	660	665	670
	Phe Ile Glu Gln Asp Thr Glu Glu Ala Arg Gln Gln Ala Thr Arg Pro		
15	675	680	685
	Ile Glu Val Ile Glu Gly Pro Leu Met Asp Gly Met Asn Val Val Gly		
	690	695	700
	Asp Leu Phe Gly Glu Gly Lys Met Phe Leu Pro Gln Val Val Lys Ser		
	705	710	715
20	Ala Arg Val Met Lys Gln Ala Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Ile Glu		
	725	730	735
	Ala Ser Lys Glu Gln Gly Lys Thr Asn Gly Lys Met Val Ile Ala Thr		
	740	745	750
	Val Lys Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Ile Val Gly Val Val		
25	755	760	765
	Leu Gln Cys Asn Asn Tyr Glu Ile Val Asp Leu Gly Val Met Val Pro		
	770	775	780
	Ala Glu Lys Ile Leu Arg Thr Ala Lys Glu Val Asn Ala Asp Leu Ile		
	785	790	795
30	Gly Leu Ser Gly Leu Ile Thr Pro Ser Leu Asp Glu Met Val Asn Val		
	805	810	815
	Ala Lys Glu Met Glu Arg Gln Gly Phe Thr Ile Pro Leu Leu Ile Gly		

	820	825	830
	Gly Ala Thr Thr Ser Lys Ala His Thr Ala Val Lys Ile Glu Gln Asn		
	835	840	845
	Tyr Ser Gly Pro Thr Val Tyr Val Gln Asn Ala Ser Arg Thr Val Gly		
5	850	855	860
	Val Val Ala Ala Leu Leu Ser Asp Thr Gln Arg Asp Asp Phe Val Ala		
	865	870	875 880
	Arg Thr Arg Lys Glu Tyr Glu Thr Val Arg Ile Gln His Gly Arg Lys		
	885	890	895
10	Lys Pro Arg Thr Pro Pro Val Thr Leu Glu Ala Ala Arg Asp Asn Asp		
	900	905	910
	Phe Ala Phe Asp Trp Gln Ala Tyr Thr Pro Pro Val Ala His Arg Leu		
	915	920	925
	Gly Val Gln Glu Val Glu Ala Ser Ile Glu Thr Leu Arg Asn Tyr Ile		
15	930	935	940
	Asp Trp Thr Pro Phe Phe Met Thr Trp Ser Leu Ala Gly Lys Tyr Pro		
	945	950	955 960
	Arg Ile Leu Glu Asp Glu Val Val Gly Val Glu Ala Gln Arg Leu Phe		
	965	970	975
20	Lys Asp Ala Asn Asp Met Leu Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Thr Leu		
	980	985	990
	Asn Pro Arg Gly Val Val Gly Leu Phe Pro Ala Asn Arg Val Gly Asp		
	995	1000	1005
	Asp Ile Glu Ile Tyr Arg Asp Glu Thr Arg Thr His Val Ile Asn		
25	1010	1015	1020
	Val Ser His His Leu Arg Gln Gln Thr Glu Lys Thr Gly Phe Ala		
	1025	1030	1035
	Asn Tyr Cys Leu Ala Asp Phe Val Ala Pro Lys Leu Ser Gly Lys		
	1040	1045	1050
30	Ala Asp Tyr Ile Gly Ala Phe Ala Val Thr Gly Gly Leu Glu Glu		
	1055	1060	1065
	Asp Ala Leu Ala Asp Ala Phe Glu Ala Gln His Asp Asp Tyr Asn		

1070 1075 1080
 Lys Ile Met Val Lys Ala Leu Ala Asp Arg Leu Ala Glu Ala Phe
 1085 1090 1095
 Ala Glu Tyr Leu His Glu Arg Val Arg Lys Val Tyr Trp Gly Tyr
 5 1100 1105 1110
 Ala Pro Asn Glu Asn Leu Ser Asn Glu Glu Leu Ile Arg Glu Asn
 1115 1120 1125
 Tyr Gln Gly Ile Arg Pro Ala Pro Gly Tyr Pro Ala Cys Pro Glu
 1130 1135 1140
 10 His Thr Glu Lys Ala Thr Ile Trp Glu Leu Leu Glu Val Glu Lys
 1145 1150 1155
 His Thr Gly Met Lys Leu Thr Glu Ser Phe Ala Met Trp Pro Gly
 1160 1165 1170
 Ala Ser Val Ser Gly Trp Tyr Phe Ser His Pro Asp Ser Lys Tyr
 15 1175 1180 1185
 Tyr Ala Val Ala Gln Ile Gln Arg Asp Gln Val Glu Asp Tyr Ala
 1190 1195 1200
 Arg Arg Lys Gly Met Ser Val Thr Glu Val Glu Arg Trp Leu Ala
 1205 1210 1215
 20 Pro Asn Leu Gly Tyr Asp Ala Asp
 1220 1225
 <210> 31
 <211> 768
 <212> PRT
 25 <213> Thermotoga maritima
 <400> 31
 Met Arg Asn Arg Arg Glu Val Ser Lys Leu Leu Ser Glu Arg Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Gly Ala Tyr Gly Thr Glu Phe Met Lys Tyr Gly Tyr Asp
 30 20 25 30
 Asp Leu Pro Glu Glu Leu Asn Ile Lys Ala Pro Asp Val Val Leu Lys
 35 40 45

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

Ser Pro Ser Lys Leu Val Thr Phe Asp His Phe Val Val Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Arg Ile Asn Pro Ala Gly Arg Lys Lys Leu Trp Ala Glu Met Gln Lys
 325 330 335
 5 Gly Asn Glu Glu Ile Val Ile Lys Glu Ala Lys Thr Gln Val Glu Lys
 340 345 350
 Gly Ala Glu Val Leu Asp Val Asn Phe Gly Ile Glu Ser Gln Ile Asp
 355 360 365
 Val Arg Tyr Val Glu Lys Ile Val Gln Thr Leu Pro Tyr Val Ser Asn
 10 370 375 380
 Val Pro Leu Ser Leu Asp Ile Gln Asn Val Asp Leu Thr Glu Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu Arg Ala Tyr Pro Gly Arg Ser Leu Phe Asn Ser Ala Lys Val Asp
 405 410 415
 15 Glu Glu Glu Leu Glu Met Lys Ile Asn Leu Leu Lys Lys Tyr Gly Gly
 420 425 430
 Thr Leu Ile Val Leu Leu Met Gly Lys Asp Val Pro Lys Ser Phe Glu
 435 440 445
 Glu Arg Lys Glu Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Lys Ile Leu Glu Arg His
 20 450 455 460
 Asp Phe Ser Asp Arg Val Ile Phe Asp Pro Gly Val Leu Pro Leu Gly
 465 470 475 480
 Ala Glu Gly Lys Pro Val Glu Val Leu Lys Thr Ile Glu Phe Ile Ser
 485 490 495
 25 Ser Lys Gly Phe Asn Thr Thr Val Gly Leu Ser Asn Leu Ser Phe Gly
 500 505 510
 Leu Pro Asp Arg Ser Tyr Tyr Asn Thr Ala Phe Leu Val Leu Gly Ile
 515 520 525
 Ser Lys Gly Leu Ser Ser Ala Ile Met Asn Pro Leu Asp Glu Thr Leu
 30 530 535 540
 Met Lys Thr Leu Asn Ala Thr Leu Val Ile Leu Glu Lys Lys Glu Leu
 545 550 555 560

Pro Arg Ala Glu Val Lys Glu Glu Lys Leu Val Glu Ile Ile Leu Ser
565 570 575

Gly Asn Arg Ser Glu Leu Glu Lys Leu Val Glu Asp Phe Leu Lys Glu
580 585 590

5 Lys Asp Pro Leu Ser Val Ile Glu Glu His Leu Arg Pro Ala Met Glu
595 600 605

Arg Ile Gly Glu Leu Tyr Asp Lys Gly Lys Ile Phe Leu Pro Gln Leu
610 615 620

Ile Leu Ala Ala Gln Thr Val Lys Pro Val Phe Asp Lys Leu Thr Ser
10 625 630 635 640

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

Lys Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Ile Val Ala Ser Val Ile
660 665 670

15 Arg Ser Ser Gly Tyr Arg Val Val Asp Leu Gly Lys Asp Val Asp Thr
675 680 685

Ser Glu Ile Val Glu Ala Val Glu Lys Glu Arg Pro Val Ala Leu Gly
690 695 700

Leu Ser Ala Met Met Thr Thr Thr Val Gly Arg Ile Lys Glu Val Val
20 705 710 715 720

Glu Lys Leu Lys Glu Lys Asn Leu Lys Ile Pro Val Ile Val Gly Gly
725 730 735

Ala Ser Leu Asn Glu Lys Leu Ala Lys Glu Leu Gly Ala Asp Tyr Tyr
740 745 750

25 Ala Lys Asn Ala Ser Glu Ala Val Lys Ile Leu Lys Ser Leu Gly Arg
755 760 765

<210> 32

<211> 1068

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> sequência de consenso

<220>

<221> misc_ASPECTO

<223> sequência de consenso meth (de *Corynebacterium glutamicum*,
Streptomyces coelicolor, *Escherichia coli* e *Thermotoga*
maritima)

<400> 32

Ser Ser Thr Pro Ala Ser Lys Val Ser Glu Leu Arg Asp Ala Leu Ala

1 5 10 15

Glu Arg Val Leu Val Leu Asp Gly Ala Met Gly Thr Met Leu Gln Ala

10 20 25 30

Tyr Leu Asp Leu Asp Asp Phe Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu

35 40 45

Asn Leu Thr Arg Pro Asp Val Val Arg Ala Ile His Arg Ala Tyr Phe

50 55 60

15 Glu Ala Gly Ala Asp Ile Ile Glu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Thr Ile

65 70 75 80

Ala Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Glu Asp Arg Leu Glu Ile Ala Phe Ala

85 90 95

Ala Ala Arg Val Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Phe Gly Ala Arg Gly

20 100 105 110

Lys Arg Phe Val Leu Gly Ser Leu Gly Pro Thr Thr Lys Leu Pro Ser

115 120 125

Leu Gly His Ala Pro Phe Asp Asp Leu Arg Glu Ala Tyr Arg Glu Ser

130 135 140

25 Ala Glu Gly Leu Val Glu Gly Gly Ala Asp Ala Ile Leu Ile Glu Thr

145 150 155 160

Gln Asp Leu Leu Gln Leu Lys Ala Ala Val Leu Ala Val Arg Ala Leu

165 170 175

Asp Glu Leu Gly Leu Asp Leu Pro Ile Ile Ile Ser Val Thr Val Glu

30 180 185 190

Thr Thr Gly Thr Met Leu Ser Gly Ser Glu Ile Gly Ala Phe Leu Thr

195 200 205

Ala Leu Asp Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala Thr
210 215 220

Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Arg His Ala
225 230 235 240

5 Asp Ile Pro Leu Thr Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu Gly
245 250 255

Lys Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Asp Ala Asp Asp Leu Ala Ala Ile Asp
260 265 270

Ser Phe Val Glu Tyr Gly Leu Ser Ile Val Gly Gly Cys Cys Gly Thr
10 275 280 285

Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Lys Ala Val Gly Leu Ala Pro
290 295 300

Ala Arg Asp Lys Pro Glu Ile Ala Ser Leu Tyr Ser Pro Val Pro Leu
305 310 315 320

15 Gln Asp Thr Phe Val Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ala Asn Gly Ser
325 330 335

Lys Lys Phe Arg Glu Ala Met Leu Asp Gly Lys Trp Glu Asp Cys Val
340 345 350

Asp Ile Ala Lys Gln Gln Val Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu
20 355 360 365

Asn Val Asp Tyr Val Gly Arg Asp Gly Val Ala Asp Met Glu Lys Leu
370 375 380

Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser
385 390 395 400

25 Thr Glu Val Asp Val Ile Arg Lys Gly Leu Glu Leu Gly Gly Arg Ser
405 410 415

Ile Val Asn Ser Val Asn Val Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg
420 425 430

Phe Arg Ile Ile Lys Leu Leu Lys Lys His Gly Ala Ala Leu Ile Val
30 435 440 445

Leu Thr Ile Asp Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu Lys Lys Val Glu
450 455 460

Ile Ala Glu Arg Leu Ile Lys Ile Leu Thr Gly Trp Gly Ile Asp Asp
 465 470 475 480
 Ile Ile Val Asp Pro Leu Thr Phe Pro Ile Ala Thr Gly Gln Glu Glu
 485 490 495
 5 Ser Arg Lys Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Ile Lys
 500 505 510
 Arg Lys His Pro Asp Ile Asn Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile Ser
 515 520 525
 Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Leu Leu Asn Ser Val Phe Leu Glu
 10 530 535 540
 Cys Ile Lys Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Val Asn Ala Ser Lys Ile
 545 550 555 560
 Leu Pro Met Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Ala Leu Asp Leu Ile
 565 570 575
 15 Tyr Asp Arg Arg Glu Gly Tyr Asp Pro Leu Gln Glu Leu Met Gln Leu
 580 585 590
 Phe Glu Gly Ala Ser Ala Asp Lys Ala Lys Ala Glu Glu Leu Arg Ala
 595 600 605
 Leu Pro Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly
 20 610 615 620
 Leu Glu Gln Asp Leu Glu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Ser Pro Ile Glu
 625 630 635 640
 Ile Ile Asn Glu Leu Leu Asp Gly Met Lys Val Val Gly Glu Leu Phe
 645 650 655
 25 Gly Ser Gly Gln Met Gln Leu Pro Gln Val Leu Gln Ser Ala Glu Val
 660 665 670
 Met Lys Thr Ala Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Ala Ser Ala
 675 680 685
 Glu Ala Gly Lys Gly Thr Ile Val Ile Ala Thr Val Lys Gly Asp Val
 30 690 695 700
 His Asp Ile Gly Lys Asn Ile Val Asp Ile Ile Leu Ser Asn Asn Gly
 705 710 715 720

Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Val Pro Leu Ser Ala Ile Leu
 725 730 735
 Glu Ala Ala Glu Glu His Arg Ala Asp Val Ile Gly Leu Ser Gly Leu
 740 745 750
 5 Leu Val Lys Ser Thr Val Ile Met Lys Glu Val Leu Glu Glu Leu Asn
 755 760 765
 Asn Ala Ala Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala Leu Thr Arg Ala
 770 775 780
 Tyr Val Glu Asn Asp Leu Glu Ile Tyr Ser Gly Glu Val Tyr Tyr Ala
 10 785 790 795 800
 Arg Asn Ala Ser Glu Gly Leu Arg Leu Met Asp Ala Leu Ile Ala Asp
 805 810 815
 Lys Arg Gly Asp Ser Pro Glu Ala Lys Lys Glu Arg Lys Arg Arg Ala
 820 825 830
 15 Ala Thr Leu Glu Ala Pro Asp Arg Ser Asp Val Ala Thr Asp Asn Pro
 835 840 845
 Pro Pro Phe Gly Thr Arg Val Val Lys Gly Ile Leu Glu Phe Leu Asn
 850 855 860
 Leu Asp Glu Ala Leu Phe Gly Gln Trp Gly Leu Lys Arg Glu Gly Pro
 20 865 870 875 880
 Ser Tyr Glu Asp Leu Val Glu Ser Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Leu
 885 890 895
 Asp Arg Leu Ser Asp Leu Leu Ala Leu Val Tyr Gly Tyr Phe Pro Ala
 900 905 910
 25 Val Ala Gly Asp Asp Ile Ile Ile Leu Asp Asp Asp Glu Arg Met Arg
 915 920 925
 Phe Ser Phe Pro Arg Gln Arg Gly Arg Leu Cys Leu Ala Asp Phe Ile
 930 935 940
 Arg Pro Lys Glu Gly Asp Val Ile Gly Phe Gln Leu Val Thr Met Gly
 30 945 950 955 960
 Ile Ala Asp Ala Leu Phe Ala Ala Asn Asp Tyr Arg Asp Tyr Leu Glu
 965 970 975

	Val	His	Gly	Leu	Ala	Val	Gln	Leu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Tyr	Trp
						980				985					990	
	His	Ala	Arg	Val	Arg	Ser	Glu	Leu	Ala	Asp	Pro	Asp	Glu	Asp	Leu	Phe
							995				1000				1005	
5	Leu	Tyr	Arg	Gly	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Asp	
		1010					1015					1020				
	Leu	Glu	Asp	Arg	Ala	Lys	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Pro	Glu	Arg	Ile	
		1025					1030					1035				
	Gly	Val	Leu	Ser	Glu	Glu	Phe	Gln	Leu	His	Pro	Glu	Gln	Ser	Thr	
10		1040					1045					1050				
	Asp	Ala	Phe	Val	Ile	His	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Tyr	Phe	Asn	Val	
		1055					1060					1065				

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência nucleotídica codificando pelo menos um polipeptídeo que é uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou um fragmento funcional da mesma tendo a propriedade de
5 inibição reduzida de produto por metionina.

2. Sequência nucleotídica de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo codificado carrega pelo menos uma mutação em sua sequência de aminoácido comparada com a sequência de aminoácido de tipo selvagem de modo que a atividade enzimática da referida metionina sintase
10 dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou do referido fragmento funcional é inibida por metionina em uma extensão menor do que a atividade enzimática de uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional que carrega a sequência de aminoácido do tipo selvagem.

15 3. Sequência nucleotídica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a referida metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma tendo a propriedade de inibição reduzida de produto por metionina carrega a mutação em seu domínio de ligação de homocisteína.

20 4. Sequência de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, selecionada dentre o grupo de sequências de DNA consistindo em:

a) sequências de DNA compreendendo a sequência nucleotídica codificando pelo menos uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma tendo a propriedade de
25 inibição reduzida de produto por metionina que carrega pelo menos uma mutação em SEQ ID No. 1.

b) sequências de DNA compreendendo a sequência nucleotídica carregando a mutação em SEQ ID No 23.

30 c) sequência de DNA que é pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de DNA de a) ou b)

d) sequência de DNA ou pelo menos uma parte da mesma que hibridiza sob condições estridentes em uma sequência nucleotídica de a), b) ou c).

5. Sequência de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4,

5 selecionada dentre o grupo consistindo em:

a) sequência de DNA compreendendo a sequência nucleotídica codificando pelo menos uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma tendo a propriedade de inibição reduzida de produto por metionina que carrega pelo menos uma mutação em SEQ ID No. 2.

b) sequências de DNA compreendendo a sequência nucleotídica carregando a mutação em SEQ ID No 24.

c) sequência de DNA que é pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de DNA de a) ou b)

d) sequência de DNA ou pelo menos uma parte da mesma que hibridiza sob condições estridentes em uma sequência nucleotídica de a), b) ou c).

6. Sequência de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5,

20 codificando pelo menos uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma tendo a propriedade de inibição reduzida de produto por metionina que carrega pelo menos uma mutação em uma sequência selecionada dentre o grupo de SEQ IDs No. 3 a 18.

25 7. Sequência de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6,

codificando pelo menos uma metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa ou fragmento funcional da mesma que carrega pelo menos uma mutação em uma posição correspondendo a M33, F86 ou S134 de SEQ ID No.1.

30 8. Sequência de DNA de acordo com a reivindicação 7, em que M33 ou aminoácido correspondente é mudado em G ou A, F86 ou o amino-

ácido correspondente é mudado em L, e S 134 ou o aminoácido correspondente é mudado em N.

9. Sequência de DNA de acordo com a reivindicação 8, codificando um polipeptídeo de acordo com SEQ ID Nos. 19, 20, 21 ou 22.

5 10. Sequência de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a atividade enzimática da metionina sintase dependente de cobalamina enzimaticamente ativa codificada ou um fragmento funcional da mesma tendo uma propriedade de inibição reduzida de produto por metionina é pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%,
10 90%, 100% e preferivelmente pelo menos um fator de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 ou 1000 menos inibida na presença de metionina comparada a uma metionina sintase dependente de cobalamina de tipo selvagem correspondente.

11. Vetor compreendendo em direção 5' a 3':

- a) um promotor que é funcional para expressão de sequências nucleotídicas em uma célula hospedeira
- 15 b) operativamente ligado ao mesmo uma sequência nucleotídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 9,
- c) uma sequência de terminação.

12. Polipeptídeo codificado por uma sequência nucleotídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

13. Célula hospedeira compreendendo uma sequência nucleotídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

14. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 13, em que a célula hospedeira é um micro-organismo que é preferivelmente selecionado dentre o grupo consistindo em *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* e *T. maritima*.

15. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 14, em que o micro-organismo é selecionado dentre o grupo consistindo em *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium acetoglutamicum* (ATCC
30 15806), *Corynebacterium acetoacidophilum* (ATCC 13870), *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539), *Corynebacterium melassecola* (ATCC 17965), *Corynebacterium glutamicum* (KFCC10065), *Corynebacterium glu-*

tamicum (DSM 17322), *Corynebacterium efficiens* (YS-314) e *Corynebacterium glutamicum* (ATCC21608).

16. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, em que o(s) gene(s) endógeno(s) para metionina sintetase(s) dependente(s) de cobalamina é (são) deletado(s) ou funcionalmente rompido(s).

17. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, em que a quantidade e/ou a atividade de pelo menos uma das seguintes sequências nucleotídicas é aumentada em comparação com o organismo hospedeiro inicial correspondente:

- sequência nucleotídica codificando para aspartato quinase lysC,
- sequência nucleotídica codificando para glicerina aldeído-3-fosfato desidrogenase gap,
- sequência nucleotídica codificando para 3-fosfatoglicerato quinase pgk,
- sequência nucleotídica codificando para piruvatocarboxilase pyc,
- sequência nucleotídica codificando para triosefosfato isomerase tpi,
- sequência nucleotídica codificando para homosserina-O-acetiltransferase metA,
- sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-sintase metB,
- sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-liase metC,
- sequência nucleotídica codificando para serina-hidroximetil transferase glyA,
- sequência nucleotídica codificando para O-acetil-homosserina-sulfidrilase metY,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatosserina amino-transferase serC,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatosserina-fosfatase serB,

- sequência nucleotídica codificando para serina acetiltransferase cysE,
 - sequência nucleotídica codificando para homosserina-desidrogenase hom,
 - 5 • sequência nucleotídica codificando para metionina sintase metE,
 - sequência nucleotídica codificando para fosfatoadenosina-fosfatossulfato-redutase cysH,
 - sequência nucleotídica codificando para sulfato adenilil transferase-subunidade I,
 - 10 • sequência nucleotídica codificando para CysN-sulfato adenilil transferase-subunidade 2,
 - sequência nucleotídica codificando para ferredoxina-NADP-redutase,
 - sequência nucleotídica codificando para ferredoxina,
 - 15 • sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-desidrogenase, e/ou
 - sequência nucleotídica codificando para frutose-1-6-bisfosfatase.
18. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, em que a quantidade e/ou a atividade de pelo menos uma
- 20 das seguintes sequências nucleotídicas é reduzida em comparação com o organismo hospedeiro inicial correspondente:
- sequência nucleotídica codificando para homosserina quinase thrB,
 - sequência nucleotídica codificando para treonina desidratase
 - 25 ilvA,
 - sequência nucleotídica codificando para treonina sintase thrC,
 - sequência nucleotídica codificando para meso-diaminopimelato-D-desidrogenase ddh,
 - sequência nucleotídica codificando para fosfoenolpiruvato car-
 - 30 bóxi quinase pck,
 - sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-6-isomerase pgi,

- sequência nucleotídica codificando para piruvato-oxidase poxB,
- sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato sintase dapA,
- sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato reductase dapB,
- sequência nucleotídica codificando para diaminopicolinato-descarboxilase lysA,
- sequência nucleotídica codificando para glicosil transferase e/ou
- sequência nucleotídica codificando para lactato hidrogenase.

19. Célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, em que eficiência de produções de metionina é aumentada por pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90%, 100% e preferivelmente pelo menos um fator de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 ou 1000 em comparação com uma célula hospedeira inicial em que nenhuma sequência como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, é expressada.

20. Método de produzir metionina em um organismo hospedeiro, em que a sequência nucleotídica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, é expressada em um organismo hospedeiro.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o organismo hospedeiro é um micro-organismo que é preferivelmente selecionado dentre o grupo consistindo em *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. coel* e *T. maritima*.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o micro-organismo é selecionado dentre o grupo consistindo em *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium acetoglutamicum* (ATCC 15806), *Corynebacterium acetoacidophilum* (ATCC 13870), *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539), *Corynebacterium melassecola* (ATCC 17965), *Corynebacterium glutamicum* (KFCC10065), *Corynebacterium glutamicum* (DSM 17322), *Corynebacterium efficiens* (YS-314) e *Corynebacterium glutamicum* (ATCC21608).

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22,

compreendendo as seguintes etapas:

- a) transfectar um vetor como definido na reivindicação 11, em uma célula hospedeira,
- b) cultivar as células hospedeiras e opcionalmente
- 5 c) recuperar metionina.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23,

em que o(s) gene(s) endógeno(s) para metionina sintetase(s) dependente(s) de cobalamina é (são) deletado(s) ou funcionalmente rompido(s).

10 25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 24, em que a quantidade e/ou a atividade de pelo menos uma das seguintes sequências nucleotídicas é aumentada em comparação com o organismo hospedeiro inicial correspondente:

- sequência nucleotídica codificando para aspartato quinase lysC,
- 15 • sequência nucleotídica codificando para glicerina aldeído-3-fosfato desidrogenase gap,
- sequência nucleotídica codificando para 3-fosfatoglicerato quinase pgk,
- sequência nucleotídica codificando para piruvatocarboxilase pyc,
- 20 • sequência nucleotídica codificando para triosefosfato isomerase tpi,
- sequência nucleotídica codificando para homosserina-O-acetiltransferase metA,
- sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-sintase
- 25 metB,
- sequência nucleotídica codificando para cistationa-gama-liase metC,
- sequência nucleotídica codificando para serina-hidroximetil transferase glyA,
- 30 • sequência nucleotídica codificando para O-acetil-homosserina-sulfidrilase metY,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatosserina amino-

- transferase serC,
- sequência nucleotídica codificando para fosfatoserina-fosfatase serB,
 - sequência nucleotídica codificando para serina acetiltransferase cysE,
 - sequência nucleotídica codificando para homosserina-desidrogenase hom,
 - sequência nucleotídica codificando para metionina sintase metE,
 - sequência nucleotídica codificando para fosfatoadenosina-fosfatossulfato-redutase cysH,
 - sequência nucleotídica codificando para sulfato adenilil transferase-subunidade I,
 - sequência nucleotídica codificando para CysN-sulfato adenilil transferase-subunidade 2,
 - sequência nucleotídica codificando para ferredoxina-NADP-redutase,
 - sequência nucleotídica codificando para ferredoxina,
 - sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-desidrogenase, e/ou
 - sequência nucleotídica codificando para frutose-1-6-bisfosfatase.
26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 25, em que a quantidade e/ou a atividade de pelo menos uma das seguintes sequências nucleotídicas é reduzida em comparação com o organismo hospedeiro inicial correspondente:
- sequência nucleotídica codificando para homosserina quinase thrB,
 - sequência nucleotídica codificando para treonina desidratase ilvA,
 - sequência nucleotídica codificando para treonina sintase thrC,
 - sequência nucleotídica codificando para meso-diaminopimelato-D-desidrogenase ddh,
 - sequência nucleotídica codificando para fosfoenolpiruvato car-

bóxi quinase pck,

- sequência nucleotídica codificando para glicose-6-fosfato-6-isomerase pgi,

- sequência nucleotídica codificando para piruvato-oxidase poxB,

5 • sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato sintase dapA,

- sequência nucleotídica codificando para di-hidrodipicolinato reductase dapB,

10 • sequência nucleotídica codificando para diaminopicolinato-descarboxilase lysA,

- sequência nucleotídica codificando para glicosil transferase e/ou

- sequência nucleotídica codificando para lactato hidrogenase.

27. Uso de sequências nucleotídicas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para produzir metionina.

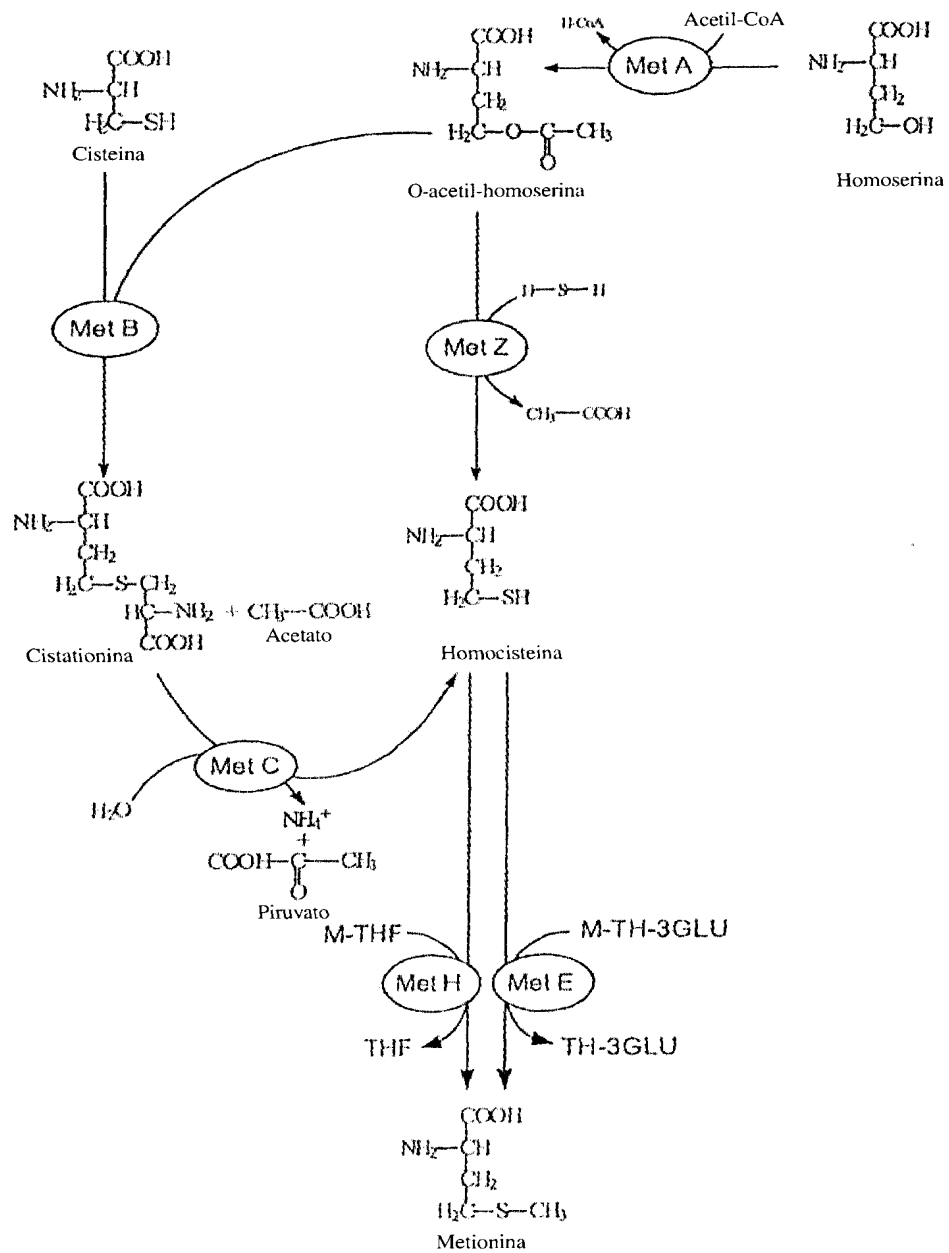


Fig. 1

Fig. 2

database meth_Cglutamicum (1)	1	-MSTSVTSPAHNNAHSSEFLDALANHVLI	50
meth_Scoel_NC_003888		(1) MASSPSTPPADTRTRVSALREALATRVVADGAMGTMIQAQNPTLD----	
meth_Ecoli		(1) -----SSKVEQLRAQLNERILVLDGGMGTMIQSYRLNEADFRG	
meth_Termotoga		(1) -----MNRREVSKLLSERVLLLDGAYGTEFMKYGYDDLPL---	
Consenso		(1) SS T PA SKVSELRDALAERVVLVDGAMGTMLQAY LDLD	
	51		100
database meth_Cglutamicum		(47) -----DFLDLEGCEILNDTRPDVLRQIHRAVFEAGADLVEINTFGCNLP	
meth_Scoel_NC_003888		(47) -----DFQQLEGCEVNLNLRPDIVRSVHEEYFAAGVDCVETNTFGANHS	
meth_Ecoli		(39) ERFADWPCDLKGNNDLLVLSKPEVIAAIHNAYFEAGADIIETNTFNSTTI	
meth_Termotoga		(36) -----EELNIKAPDVVLKVHRSYIESGSDVILTNTFGATRM	
Consenso		(51) DF DLEGCEILNLRPDVVRAIHRAYFEAGADIIETNTFGAT I	
	101		150
database meth_Cglutamicum		(92) NLADYDIADRCRELAYKGTAVAREVADEMGPRNGMRRFVVGSLGPGTKL	
meth_Scoel_NC_003888		(92) ALGEYDIPERVHELSEAGARVAREVADEFG-ARDGRQRWVLGSMGPGTKL	
meth_Ecoli		(89) AMADYQMESLSAEINFAAKLARACADEWTARTPEKPRYVAGVLGPTNRT	
meth_Termotoga		(72) KLRKHGLEDKLDPIVRNAVRIARRAAGEKL-----VFGDIGPTGEL	
Consenso		(101) ALADYDIEDRL EIAFAAAARVAREVADEFG AR GK RFLVGLSLGPTTKL	
	151		200
database meth_Cglutamicum		(142) PSLG-----HAPYADLRGHYKEAALGIIDGGDAFLIETAQDILLQV	
meth_Scoel_NC_003888		(141) PTLG-----HAPYTVLRDAYQRNAEGLVAGGADALLVETTQDILLQT	
meth_Ecoli		(139) ASISPDVNDPAFRNITFDGLVAAYRESTKALVEGGADLIIETVFDTLNA	
meth_Termotoga		(113) PYPLG-----STLFEFEYENFRETVEIMVEEGVDGIIIFETFSDILEL	
Consenso		(151) PSLG HAPFDDLREAYRESAEGLEVGGADAILIET QDILLQ	
	201		250
database meth_Cglutamicum		(183) KAAVHGVQDAMAEALDTFLPIICHVTVETTG-TMLMGSEIGAALTALQPLG	
meth_Scoel_NC_003888		(182) KASVLGARRALDVGLDPLIVSVTVETTG-TMLLGSEIGAALTALQPLG	
meth_Ecoli		(189) KAAVFAVKTEFEALGVELPIMISGTTDASGRITSLGQTTEAFYNSLRHAE	
meth_Termotoga		(155) KAAVLAAR----EVS RDVFLIAHMTFDEKG-RSLTGTDPANFAITFDELD	
Consenso		(201) KAAVLAVR ALDEIGLDLPIIISVTVETTG TMLSGSEIGAFLTALDPLG	
	251		300

database meth_Cglutamicum	(232)	IDMIGLNCA	GPDEMSEHLR	YL	SKHADIPV	SMPNAGLPVL	GKNGAEYPL
meth_Scoel_NC_003888	(231)	IDMIGLNCA	GPAPMSEHLR	YL	ARHSRIPL	TCMPNAGLPVL	GKDGAHYPL
meth_Ecoli	(239)	ALT	FGLNCALG	PD	ELRQYVQEL	SRIAECYV	TAHPNAGLPNAFG---EYDL
meth_Termotoga	(200)	IDALGINCS	LGPEEILPI	FQEL	SQYTDK	FLVVEPNAGK	PIVENGKTVYPL
Consenso	(251)	IDMIGLNCA	GPDEMSEHLR	YL	SRHADIP	LTMPNAGLPVL	GK GAEYPL
	301						
database meth_Cglutamicum	(282)	EAEDLAQ	ALAGFVSEY	GLSMVGG	CCGTTPEH	IRAVRD	AVVGVPEQETSTL
meth_Scoel_NC_003888	(281)	TAPELADA	HETFFVREY	GLSLVGG	CCGTTPEH	RQVVER	VRTAP-----
meth_Ecoli	(286)	DAD	TMAKQIRE	WAQA	GF	LNIVGG	CCGTTPQHIAAMRAVEGLAP-----
meth_Termotoga	(250)	KPHDFAV	HIDSYELG	-VNIFG	CCGTTPEH	VKLFRK	VLGNRKP-----
Consenso	(301)	DADDIA	AIDSFV	EYGLSIVG	CCGTTPEH	IRAVR	KAV GLAP
	351						
database meth_Cglutamicum	(332)	TKIPAG	VEQASRE	VEDSVAS	LYTSVPL	SQETG	ISMIGERTNSNGSKA
meth_Scoel_NC_003888	(325)	-----	TARDPR	PEPGA	ASLYQ	TVFPRQ	DTSYLAIGERTNANGSKK
meth_Ecoli	(330)	-----	RKLPEI	PVACRL	SGLEPL	NIGED	SLFVNVGERTNVTGSAK
meth_Termotoga	(293)	-----	LQRKKR	-IFAVS	SPSKLV	TFDHFV	WIGERINPAGRKK
Consenso	(351)	ARD	KPE	IASLYS	VPVL	QDT	FVMIGERTNANGSKK
	401						
database meth_Cglutamicum	(382)	FREAMLSG	DWEKCV	DI	AQQT	RDGAH	MLDLCVDYVGRDGTADMATLAALL
meth_Scoel_NC_003888	(365)	FREAMLD	GRWDDC	VE	MARDQI	REGAH	MLDLCVDYVGRDGVADMEELAGRF
meth_Ecoli	(370)	FKRLI	EEKYSE	ALD	VARQ	QVENGA	QIIDINMDEGMLDAEAAVRFNLNI
meth_Termotoga	(330)	LWAEMQ	KGNEE	I	VIKEAK	TQVEK	GAEVL
Consenso	(401)	FREAMLD	GKWEDC	V	DI	AQQV	RDGAHMLDLNVDYVGRDGVADMEKLANLL
	451						
database meth_Cglutamicum	(432)	ATS---	STLP	IMID	STEPE	VIR	TGLEHLGGRSIVNSVNFEDGDGPESRYQ
meth_Scoel_NC_003888	(415)	ATA---	STLP	IVLD	STEVD	VIRAG	LEKLGGRVINSVNYEDGAGPESRFA
meth_Ecoli	(420)	AGEP	DIARV	PIM	IDSS	KWDV	IEKGLKCIQGGKIVNSISMKEGVD---AFI
meth_Termotoga	(380)	PYV---	SNVPL	SLDI	QNV	DL	TERALRAYPGRSLFNSAKVDEEEL-----E
Consenso	(451)	ATA	STLP	IMID	STEVD	VIRK	GLE LGGRSIVNSVNFEDGDGPESRF
	501						
database meth_Cglutamicum	(479)	RIMKLV	KQHGA	AV	VA	LT	IDEEGQARTAEHKVRIAKRLIDDTGSGYGLDIK
meth_Scoel_NC_003888	(462)	RVTKL	AREHGA	AL	I	ALT	ID
meth_Ecoli	(467)	HHAKLL	RRYGAA	VV	MA	FDEQ	GQADTRARKIEICRRAYKILTEEVGFPPPE

```

meth_Termotoga (422) MKINLLKKYGGTLLVLLMG-KDVPKSFEEERKEYFEKALKILERHD--FSD
      Consenso (501) RIIKLLKKHGAALLVLTIDE GQARTAEKKVEIAERLIKILTG WGI D
                                     551
database meth_Cglutamicum (529) DIVVDCLTFFPISTGQEEETRRDGIETIEAIRELKKLYPEIHTTGLSNISF
meth_Scoel_NC_003888 (512) DILVDCLTFTICTGQEEESPKDGLATIEGIRELKRHPDVQTTGLSNISF
      meth_Ecoli (517) DIIFDPNIFAVATGIEEHNNAQDFIGACEDIKRELPHALISGGVSNVSF
meth_Termotoga (469) RVIFDPGVLPIGAEGKP-----VEVLKTIEFISSKG--FNTTVGLSNLSF
      Consenso (551) DIIVDPLTFPIATGQEEESRKDGIETIEAIREIKRKHDPDINTTGLSNISF
                                     601
database meth_Cglutamicum (579) GLN--PAARQVLNSVFLNECIEAGLDSAIAHSSKILPMNRIDDRQREVAL
meth_Scoel_NC_003888 (562) GLN--PAARILLNSVFLDECVKAGLDSAIVHASKILPIARFDEEQVTTAL
      meth_Ecoli (567) SFRGNDPVREAIHAVFLYYAIRNGMDMGIVNAGQLAIYDDLPaelRDave
meth_Termotoga (512) GLP----DRSYNTAFVLVIGISGLSSAIMNPLDETLMKTLNAT-----
      Consenso (601) GLN PAAR LLNSVFL ECIKAGLDSAIVNASKILPM RLDAEQRD AL
                                     700
database meth_Cglutamicum (627) DMVYDRRTEDYDPLQEFMQLFEGVSAADAKDARAEQLAAMPLFERLAQRI
meth_Scoel_NC_003888 (610) DLIYDRRREGYDPLQKLMQLFEGATAKSLKASKAEELAALPLEERLKRRI
      meth_Ecoli (617) DVILNRRDDGTERLLELAEKYRGSKTDDTANAQQAERWSWEVKNRLEYSL
meth_Termotoga (552) -----LVILEKK-----ELPRAEVKEEKLVEII
      Consenso (651) DLIYDRR EGYDPLQELMQLFEGASA D K AKAEELRALPLEERL RI
                                     750
database meth_Cglutamicum (677) IDGDKNGLEDDLEAGMKEKS-PIAIIINEDLLNGMKTVGELFGSGQMQLPF
meth_Scoel_NC_003888 (660) IDGEKNGLEQDLDEALRERP-ALEIVNDTLLDGMKVVGELFGSGQMQLPF
      meth_Ecoli (667) VKGITIEFIEQDTEEARQQAATRIEIVIEGPLMDGMNVVGDLFGEKGMFLPQ
meth_Termotoga (575) LSGNRSELEKLVEDFLKEKD-PLSVIEEHLRPAMERIGELYDKGKIFLPQ
      Consenso (701) IDGDKNGLEQDLEEAALKEKS PIEIINE LLDGMKVVGELFGSGQMQLPQ
                                     800
database meth_Cglutamicum (726) VLQSAETMKTAVAYLEPFMEEEAETGSAQAEKGKIVVATVKGDVHDIG
meth_Scoel_NC_003888 (709) VLQSAEVMKTAVAHLEPHMEKTDGDDG-----KGTIVLATVRGDVHDIG
      meth_Ecoli (717) VVKSARVMKQAVAYLEPFFIEASKEQG-----KTNGKMVIATVKGDVHDIG
meth_Termotoga (624) LILAAQTVPKVPFDKLTSMPLPSDSQGE-----TFVIATVKGDVHDIG
      Consenso (751) VLQSAEVMKTAVAYLEPFMEEASAEAG KGTIVLATVKGDVHDIG
                                     850

```

database meth_Cglutamicum	(776)	KNLVDIILSNNGYDVVNLGIKQPLSAMLEAAEEHKADVIGMSGLLVKSTV
meth_Scoel_NC_003888	(752)	KNLVDIILSNNGYVNVNLGIKQPVSAILEAADEHRADVIGMSGLLVKSTV
meth_Ecoli	(762)	KNIVGVVLQCNNYEIVDLGVMVPAEKILRTAKEVNADLIGLSGLITPSLD
meth_Termotoga	(665)	KNIVASVIRSSGYRVVDLCKDQVDTSEIVEAVEKERPVALGLSAMMTTVG
Consenso	(801)	KNIVDIILSNNGYDVVNLGIKQPLSAMLEAAEEHRADVIGLSGLLVKSTV
	851	
database meth_Cglutamicum	(826)	VMKENLEEEMNN-AGASNPVILGGAALTRTYVENDLNEVYTGEVYYARDA
meth_Scoel_NC_003888	(802)	IMKENLEELNQKLAADYPVILGGAALTRAYVEQDLHEIYDGEVRYARDA
meth_Ecoli	(812)	EMNVAKEMER--QGFTIPLLIGGATTSKAHTAVKIEQNYSGPTVYVQNA
meth_Termotoga	(715)	RIKEVVEKLKE--KNLKIPVIVGGASLN-----EKLAKELGADYYAKNA
Consenso	(851)	IMKEVLEEELNN AA YPVILGGAALTRAYVENDL EIYSGEVYYARNA
	901	
database meth_Cglutamicum	(875)	FEGLRLMDEVMAEKRGELDPNSPEAIEQAKKKAERKARNERSRKIAAER
meth_Scoel_NC_003888	(852)	FEGLRLMDALIGIKRG-----VP-----GAKLPELKQR-----RVRAATV
meth_Ecoli	(860)	SRTVGVVAALLSDTQRDDFVARTRKEYETVRIQHGRKKP-----RTPPVTL
meth_Termotoga	(757)	SEAVKILKSLGR-----
Consenso	(901)	SEGLRLMDALIADKRGD SP E AKK ERK R R AATL
	951	
database meth_Cglutamicum	(925)	KANAAPVIVPERSDVSTDTPTAAPFWGTRIVKGLPLAEFLGNLDERALF
meth_Scoel_NC_003888	(887)	EIDERPEEGHVRSVDATNPVPTPPFRGTRVVKGIQLKEYASWLDEGALF
meth_Ecoli	(906)	EAAAR-----DNDEAFDWQAYTPPVVAHRLGVQVEEASIEIETLRNYIDWTFP
meth_Termotoga	(769)	-----
Consenso	(951)	EA P DRSDVATDNP PPF GTRVVKGI L EFL NLDE ALF
	1001	
database meth_Cglutamicum	(975)	MGQWGLKSTRNEGSPSYEDLVETEGRPRLRYWLDRLKSEGILDHVALVYG
meth_Scoel_NC_003888	(937)	KGQWGLKQARTGEGPSYEELVESEGRPRLRGLLDRLQTD-NLLEAAVVYG
meth_Ecoli	(950)	FMTWSLAGKYPRILEDEVWGVEAQRLFKDANDMLDKLSAEKTLNPRGVVG
meth_Termotoga	(769)	-----
Consenso	(1001)	GQWGLK R EGPSYEDLVESEGRPRLR LDRL SD LL ALVYG
	1100	
database meth_Cglutamicum	(1025)	YFPVAEGDDVILESPDPHAAERMRFSPRQQRGR---FLCIADFIRPR
meth_Scoel_NC_003888	(986)	YFPCVSKDDDLIVLDDG---NERTFRFTFRQRRGR---RLCLADFFRPE

```

meth_Ecoli (1000) LFPANRVGDDIEIYRDETRTHVINSHHLRQQTEKTFANYCLADFVAPK
meth_Termotoga (769) -----
meth_Consenso (1051) YFPAVA GDDIIILDDD ERMRFSPRQ RGR LCLADFIRPK 1150
                                     1101
database meth_Cglutamicum (1072) EQAVKDGQVDVMPFQLVTMGNPIADFANELFAANEYREYLEVHGIGVQLT
meth_Scoel_NC_003888 (1030) E----SGETDVVGFGVVTGSRIGEETARMFEANAYRDYLELHGLSVQLA
meth_Ecoli (1050) LS----GKADYIGAFAVTGGLEEDALADAFEAQHDDYNKIMVKALADRLA
meth_Termotoga (769) -----
meth_Consenso (1101) E G DVIGFQLVTMG IAD A LFAANDYRDYLEVHGLAVQLA 1200
                                     1151
database meth_Cglutamicum (1122) EALAEYWHSRVSELKNDGGSVADFPEDKTKFFDLDYRGARFSFGYGS
meth_Scoel_NC_003888 (1076) EALAEYWHARVSELGFAG-----EDPAEMEDMFALKYRGARFSLGYGA
meth_Ecoli (1096) EAFAEYLHERVRKVWGYAP-----NENLSNEELIRENYQGIRPAPGYPA
meth_Termotoga (769) -----
meth_Consenso (1151) EALAEYWHARVSEL A DP D EDLF L YRGARFS GYGA 1250
                                     1201
database meth_Cglutamicum (1172) CPDLEDRAKLVELLEPGR-IGVELSEELQLHPEQSTDAFVLYHPEAKYFN
meth_Scoel_NC_003888 (1120) CPDLEDRAKIAALLEPER-IGVHLSEEFQLHPEQSTDAIVHHPEAKYFN
meth_Ecoli (1141) CPEHTEKATIWELLEVEKHTGMKLTESFAMWPGASVSGWYFSHPD SKYYA
meth_Termotoga (769) -----
meth_Consenso (1201) CPDLEDRAKI ELLEPER IGV LSEEFQLHPEQSTDAFVIHHPEAKYFN 1286
                                     1251
database meth_Cglutamicum (1221) V-----
meth_Scoel_NC_003888 (1169) AR-----
meth_Ecoli (1191) VAQIQRDQVEDYARRKGMVTEVERWLAPNLGYDAD
meth_Termotoga (769) -----
meth_Consenso (1251) V

```

Fig. 3:

a) SEQ ID No. 1:

MSTSVTSPAHNNAHSSEFLDALANHVLI GDGAMGTQLQGDFLDVEKDFLDLEGCNEILNDRPDVLRQIH RAYFEAGADLVETNTFGCNLPNLADYDIA
 DRCRELAYKGTAVAREVADEMPCGRNGMRRFVVGSLPGTKLPSLGHPAYADLRGHYKEAALGIIDGGDAFLIETAQDLLQVKAAVHGVQDAMAE LDT
 FLPIICHVTVETGTMLMGSEIGAALTALQPLGIDMIGLCATGPDSEMSEHLRYSKHADIPVSVMPNAGLPVLGKNGAEYPLEAEDLAQALAGFVSEY
 GLSMVGCCGTTPEHIRAVRDAVVGVEPEQETSTLTIPAGPVEQASREVEKEDSVASLYTSVPLSQETGISMIGERTNSGSKAFREAMLSGDWEKCV D
 IAKQQRDGAHMLDLCVDYVGRDGTADMATLAALLATSSTLPI MIDSTEPEVIRTGLEHLGGRSIVNSVNFEDGDGPESRYQRIMKLVKQHGA AVVALT
 IDEEGQARTAEHKVRIAKRLIDDI TGSYGLDIKDIVVDCLTFPISTGQEE TRRDGIETIEAIRLKKLYPEIHTTGLSNISFGLNPAARQV LNSVFLN
 ECIEAGLDSAIAHSSKILPMNRIDDRQREVALDMVYDRRTEDYDPLQEFFMQLFEGVSAADAKDARAEQLAAMPLFERLAQRIIDGDKNGLED DLEAGMK
 EKSPIAII NEDLLNGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAETMKTAVAYLEPFMEEEAEATGSAQAEKGKIVVATVKGDVHDIGKNLV DIIILSNNGYDVVN
 LGIKQPLSAMLEAAEEHKADVIGMSGLLVKSTVVMKENLEEMNAGASNPVILGGAALTRTYVENDLNEVYTG EYVYARDAFEGRLMDEVMAEK RGE
 GLDPNSPEAIEQAKKKAERKARNERSRKIAAERKANAAAPVIVPERSDVSTDTPTAAPFFWGT RIVKGLPLAEFLGNLDERALFMGOWGLKSTRNEGPS
 YEDLVETEGRPRLRYWLDRLKSEGILDHVALVYGYFPAVAEGDDWVILESPDPHAAERMRFSPRQQRGRFLCIA DFI RPREQAVKDGQVDVMPFQLVT
 MGNPIADFANELFAANEYREYLEVHGIGVQLTEALAEYWHRSVRSELKLN DGGSVADFPEDKTKFFDLDYRGARFSFGYGCSPDLEDRAKIVELLEPG
 RIGVELSEELQLHPEQSTDAFVLYHPEAKYFNV

b) SEQ ID No. 23:

Atgtctacttcagttacttcaccagcccaacaacgcacattctctccgaatttttggatcgcttg gcaaacccatgtgtgatcggcgacggcgccatg
 ggcacccagctccaaggcttgacctggacgtggaaaaggatttctctgatctggaggggtgta atgagattctcaacgacacccgccctgatgtgttg
 aggcagattcacgcgcctacttgaggcgggagctgacttggttgagaccaatacttttggttgcaacctgccgaaacttgccgattatgacatcgct
 gatcgttgccgtgagcttgctacaagggcactgcagtggttaggaagtggctgatgagatggggccgggcccgaacggcatgcggcgcttctcgtgggt
 ggttccctgggacctggaacgaagcttccatcgctcgctggccatgcacctatgcagatttgcgtgggcactacaaggaagcagcgcttggcatcatcgac
 ggtggtggcgatgcctttttgattgagactgctcaggacttgcctcaggtcaaggctgcggttcacggcgttcaagatgccatggctgaacttgataca
 ttcttgcccatatttgccacgtcacctgtagagaccacggcaccatgctcatgggttctgagatcggtgccgcttgacagcgtgcagccactgggt
 atcgacatgattggtctgaactgcgccacggcccagatgagatgagcgagcacctcgcttacctgtccaaagcacgccgatattcctgtgtcggtgatg
 cctaacgcaggtcttctcgtcctgggtgtataaaacgggtgcagaataccacttgaggctgaggtatttgccgagggcgctggctggtatcgtctccgaatat
 ggcctgtccatggtgggtggttgtgtggcaccacacactgagcacatccgtgcggtccgcgatgcggtggttgggttccagagcaggaaacctccaca
 ctgaccaagatccctgcaggccctgtgagcaggcctcccgcgaggtggagaaaggactccgtcgctcgctgtacacctcggtgccattgtcccag
 gaaacggcatttccatgatcggtagcgcaccacactccaacgggtccaaggcattccgtgaggaatgctgtctggcgattgggaaaagtgtgtggat
 attgccaagcagcaaaccccgatggtgcacacatgctggatctttgtgtgattacgtgggacgagacggcaccccgcatatggcgaccttggcagca
 ctctctgtaccagctccactttgccaatcatgattgactccacgagccagaggttatcgcacaggccttgagcacttgggtggacgaagcatcgtt
 aactccgtcaactttgaagacggcgatggccctgagtcctaccagcgcacatgaaactggtaaagcagcacggtgcggcgctggttgcgctgacc

Attgatgaggaaggccaggtacogctgagcacaaaggtgcgcatttgctaaaogactgattgacgatatcaccggcagctacggc
ctggatatcaaagacatcgttggactgcctgacctcccgatctctactggccaggaagaaaccaggcgagatggcatggaac
atcgaagccatccgcgagctgaagaagctctaccagaaatccacaccacctgggtctgtccaatatctcctcggcctgaacct
gctgcacgccaggtcttaactctgttccctcaatgagtgcattgaggtggtctggactctgcgattgcgcacagctccaagatt
ttgccgatgaaccgcattgatgatcgccagcggaagtggcgttgatatggtctatgatcgccgcaaccgaggttacgatccgctg
caggaattcatgcagctgtttagggcgtttctgctgccgatgccaaggatgctcgcgtgaacagctggccgctatgcctttgttt
gagcgtttggcacagcgcatcgcagcgcatagaatggccttgaggtgatctggaagcagggcatgaaggagaaagtctectatt
gcgatcatcaacgagaccttctcaacggcatgaagacctgggtgagctgttggttccggacagatgcagctgccattcgtgctg
caatcggcagaaaccatgaaaactgcgtggcctatttggaaccttcatggaagaggaagcagaagctaccggatctgcgcaggca
gaggcaagggaataatcgtcgggccacctcaagggtgacgtgcacgatcggcaagaacttggaggacatcatttgtccaac
aacggttacgacgtggtgaacttgggcatacagcagccactgtccgccatgttggaaagcagcggaagaacacaaagcagctc
ggcatgtcgggacttcttgaagtccacctgggtgatgaaggaaaaaccttgaggagatgaacaaacggcgcatccaattacca
gtcattttgggtggcgtgcgtgacgcgtacctacgtggaaaaacgatctcaacgaggtgtacacgggtgaggtgtaactacgcccgt
gatgctttcgaggcctgcgcctgatggatgaggtgatggcagaaaagcgtggtgaaggacttgatcccaactcaccagaagctatt
gagcaggcgaagaagaggcggaacgtgaagctcgtaatgagcgttcccgcaagattgccgggagcgtaaaagctaagtgcggctccc
gtgattgttccggagcgttctgatgtctccaccgatactccaacggcgccaccaccttctggggaacccgcattgtcaagggtctg
cccttggcgaggttcttgggcaaccttgatgagcgcgccttgttcatgggcagtggggtctgaaatccacccgggcaacgaggggt
ccaagctatgaggatttggtgaaactgaaggccgacccacgcctgcgtactggctggatgcgcctgaagtctgagggcattttggac
cacgtggccttgggtatggctacttcccagcggtcgcggaaaggcatgacgtgggtgatcttggaaatccccggatccacacgcagcc
gaacgcatgcgcttagcttcccacgcagcagcggcaggttcttgtgcacgcggatttcatctgccacgcgagcaagtgtc
aaggacggccaagtggacgtcatgccattccagctggtaacctattgctgatttcgccaacgagttgttcgcagcc
aatgaataccgcgagtaacttggaagttcacggcatcggcgtgcagctcaccgaagcatggccgagtaactggcactcccagtgccg
agcgaactcaagctgaacgacggttgatctgtcgtgattttgatccagaagacaagaccaagtctctcgacctggattaccgcggc
gcccgttctccttggttacggttcttgcctgatctggaagacgcgcaaaagctggtggaattgctcgagccagggccgtatcggc
gtggagttgtccgaggaactccagctgcacccagagcagtcacagcgcgttgtgctctaccacccagaggcaaaagtactttaac
gtctaa

Fig. 4

a) SEQ ID No. 2:

MSTSVTSPAHHNAHSSEFLDALANHVLIIGDGAMGTQLQGFDDLVEKDFLDLEGCNEILNDRPDVLRQIHRAYPEAGADLVEINTFGCNLPNLADYDIA
 DRCRELAYKGTAVAREVADEMGPGRNGMRRFVVGSLGPGTKLPSLGHAPYADLRGHYKEAALGIIDGGDAFLIETAQDILLQVKAAVHGVQDAMAEILD
 FLPIICHVTVEITGTMIMGSEIGAALTALQPLGIDMIGLNCATGPDE

b) SEQ ID No. 24

Atgtctacttcagttacttcaccagccccacaacgcacatttcctccgaatttttgatgcgttgccaaaccatgtgtgatcggcgacggcgccatg
 ggcaaccagctccaaggctttgacctggacgtggaaggatttccttgatctggaggggtgtaataatgagattctcaacgacacccgcctgatgtgtg
 aggcagattcaccgcgcctactttgagcgaggctgacttggttgagaccaataacttttggttgcaacctgccgaacttggcggattatgacatcgct
 gatcgttgccgtgagcttgccatacaaggccactgcagtggctagggaagtggctgatgagatggggccggggccgaaacggcatgcggcgtttcgtggtt
 ggttccctgggacctggaacgaagcttccatcgctgggccatgcaccgtatgcagatttgctgggcactacaaggaaagcagcgttggcatcatcgac
 ggtggtggcgatgcctttttgattgagactgctcaggacttgcctcaggtcaaggctgcggttcacggcgttcaagatgccatggctgaacttgataca
 ttcttgccattatttgccacgtcacctagagaccacggcaccatgctcatgggttctgagatcggtgccgcgttgacagcgtgcagccactgggt
 atcgacatgattgggtgaactgcggccaccggcccagatgag

Fig. 5

Seq ID No 3:

XX₁XX₂XX₃XX₄XX₅XX₆XX₇XX₈XX₉XX₁₀
 em que X₁ = S, V, R; X₂ = S, E, R; X₃ = E, A, Q; X₄ = F, L, V; X₅ = L, R, S; X₆ = D, E, A, K; X₇ = A, Q, L; X₈ = A, N, S; X₉ = N, T, E; X₁₀ = H, R

SEQ ID No 4:

XX₁XX₂XX₃XX₄DGX₅XX₆GTX₇XX₈XX₉XX₁₀XX₁₁
 em que X₁ = V, I; X₂ = V, L; X₃ = I, V, L; X₄ = g, A, L; X₅ = A, G; X₆ = M, Y; X₇ = Q, M, E; X₈ = L, I, F; X₉ = Q, M; X₁₀ = G, A, S, K; X₁₁ = F, Q, Y

SEQ ID No 5:

XX₁XX₂XX₃XX₄XX₅XX₆XX₇XX₈XX₉XX₁₀XX₁₁XX₁₂XX₁₃XX₁₄XX₁₅
 em que X₁ = L, P, Y; X₂ = D, T, N; X₃ = V, L, D, E; X₄ = E, D, A, L; X₅ = K, D, P; X₆ = F exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₇ = R exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₈ = G exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₉ = E exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₁₀ = F exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₁₁ = F exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₁₂ = A exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₁₃ = D exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₁₄ = D, W exceto em *T. marina*; X₁₅ = F, P exceto em *T. marina*

SEQ ID No 6:

LX₁XX₂XX₃XX₄PX₅XX₆XX₇XX₈XX₉XX₁₀HX₁₁XX₁₂YX₁₃
 Em que X₁ = N, V; X₂ = D, L, I; X₃ = T, S, K; X₄ = R, K, A; X₅ = D, E; X₆ = V, I; X₇ = L, V, I; X₈ = R, A, L; X₉ = Q, S, A, K; X₁₀ = I, V; X₁₁ = R, E, N; X₁₂ = A, E, S; X₁₃ = F, I;

SEQ ID No 7:

X₁X₂GXX₃DX₄X₅X₆TNTFX₇X₈X₉
em que X₁ = E, A; X₂ = A, S; X₃ = A, V, S; X₄ = L, C, I, V; X₅ = V, I; X₆ = E, L; X₇ = G, N; X₈ = C, A, S; X₉ = N, T;

SEQ ID No 8:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉
em que X₁ = L, H, T, R; X₂ = P, S, I, M; X₃ = N, A, K; X₄ = L, M; X₅ = A, G, R; X₆ = D, E, K; X₇ = Y, H; X₈ = D, Q, G; X₉ = I, M, L;

SEQ ID No 9:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ARX₁₅X₁₆AX₁₇EX₁₈
em que X₁ = A, P, E; X₂ = D, E, S; X₃ = R, L, K; X₄ = C, V, S, L; X₅ = R, H, A, D; X₆ = E, P; X₇ = L, I; X₈ = A, S, N, V; X₉ = Y, E, f, R; X₁₀ = K, A, N; X₁₁ = G, A; X₁₂ = T, A, V; X₁₃ = A, R, K; X₁₄ = V, L, I; X₁₅ = E, A, R; X₁₆ = V, C, A; X₁₇ = D, E; X₁₈ = F, M, W, K

SEQ ID No 10:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆RX₇
em que X₁ = G exceto em *T. marina*, A, R exceto em *T. marina*; X₂ = R, T exceto em *T. marina*; X₃ = N, D, P exceto em *T. marina*; X₄ = G, G, E exceto em *T. marina*; X₅ = M, R, K exceto em *T. marina*; X₆ = R, Q, P exceto em *T. marina*; X₇ = F, W, Y exceto em *T. marina*;

SEQ ID No 11:

VX₁GXX₂X₃GPPX₄X₅X₆X₇X₈X₉
Em que X₁ = V, L, A, F; X₂ = S, V, D; X₃ = L, M, I; X₄ = G, T; X₅ = T, N, G; X₆ = K, R, E; X₇ = L, T; X₈ = P, A; X₉ = S, T, Y;

SEQ ID NO 12:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈GX₁₉
em que X₁ = F, Y; X₂ = >, T, D, E; X₃ = D, V, G, E; X₄ = L, F; X₅ = R, V, Y; X₆ = G, D, A, E; X₇ = H, A, N; X₈ = Y, E; X₉ = K, Q, R; X₁₀ = E, R;
X₁₁ = A, N, S, T; X₁₂ = A, T, V; X₁₃ = L, E, K; X₁₄ = G, A, I; X₁₅ = I, L, M; X₁₆ = I, V; X₁₇ = E, A, E; X₁₈ = G, E; X₁₉ = G, A, V

SEQ ID No 13:

DX₁X₂X₃X₄ET
em que X₁ = A, L, G; X₂ = F, L, I; X₃ = L, I; X₄ = I, V, F

SEQ ID NO 14:

X₁DX₂LX₃X₄KAX₅VX₆X₇X₈X₉
em que X₁ = Q, F, S; X₂ = L, T, I; X₃ = Q, N, E; X₄ = V, T, A, L; X₅ = A, S; X₆ = H, L, F; X₇ = G, A; X₈ = V, A; X₉ = Q, R, K

SEQ ID No 15:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁T
em que X₁ = L, V; X₂ = D, G, S; X₃ = T, L, V, R; X₄ = F, D, E; X₅ = L, V; X₆ = P, F; X₇ = I, L; X₈ = I, M; X₉ = C, V, I, A; X₁₀ = H, S; X₁₁ = V, G, M

SEQ ID No 16:

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈LX₉GX₁₀X₁₁
Em que X₁ = V, I, F; X₂ = E, T, D; X₃ = T, D, E; X₄ = T, A, K; X₅ = G, S; X₆ = G exceto em *T. marina*, *C. glutamicum*, *S. coel.*; X₇ = T, R; X₈ = M, T, S; X₉ = M, L, S, T; X₁₀ = S, Q, T; X₁₁ = E, T, D

SEQ ID No 17:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$

em que $X_1 = G, E, A; X_2 = A, N; X_3 = A, F; X_4 = L, Y, A; X_5 = T, N, I; X_6 = A, S, T; X_7 = L, F$

SEQ ID No 18:

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}GPX_{11}E$

em que $X_1 = P, H, E; X_2 = L, A; X_3 = G, E, D; X_4 = I, A; X_5 = D, L; X_6 = M, T, A; X_7 = I, F, L; X_8 = L, I; X_9 = A, S; X_{10} = T, L; X_{11} = D, A, E$

Attgatgaggaaggccaggacgtaccgctgagcacaaggtgcgcattgtctaaacgactgattgacgatatcacccggcagctacggcctggatacaaa
 gacatcgttgtggactgcctgacctcccgatctctactgcccagggaagaaaccaggcgcagatggcataggaaaccatcgaagccatccgcgagctgaag
 aagctctaccagaaaatccacaccacctgggtctgtccaatatttccttcggcctgaacctctgcacgccaggttcttaactctgttccctcaat
 gagtgcattgaggctggtctggactctgcgattgcgcacagctccaagattttgccgatgaaccgcattgatgatcccgagcggaagtggcgttggat
 atggtctatgatcgccgcaccgaggattacgatccgctgcaggaaattcatgcagctgtttgaggcgtttctgctgccgatgccaaaggatgctcgcgt
 gaacagctggccgctatgcctttgtttgagcgtttggcacagcgcattcatcgacgcgttggtgagcgttttggttcgggacagatgcagctgccattcgtg
 gagaagtctcctattgcgatcatcaacgaggaccttctcaacggcatgaagaccgttggtgagcgttttggttcgggacagatgcagctgccattcgtg
 ctgcaatcggcagaaccatgaaaactgcggtggcctatttggaaccttcatggaagaggaagcagaagctaccggatctgcgcaggcagaggccaag
 ggcaaaatcgtcgtggccacctcaagggtgacgtgcacgatatcgcaagaacttggtggacatcatttgtccaacaacggttacgcagctggtgaac
 ttgggcatacaagcagccactgtccgccattgttgaagcagcgggaacacacaaagcagacgtcatcggcatgtcgggacttcttgtgaagtccacctg
 gtgatgaaggaaaaccttgaggagatgaacaacgcggcgcatccaattaccagtcattttgggtggcgtgcgctgacgcgtacctaactgggaaaac
 gatctcaacgaggtgtacaccggtgaggtgtactacgccgtgatgctttcgaggcctgcgcctgatggatgaggtgatggcagaaaaagcgtggtgaa
 ggacttgatcccaactcaccagaagctattgagcaggcgaagaaggaaggcggaactcgaatgagcgttcccgaagattgcgcggagcgt
 aaagctaatgcggctcccgtgattgttcgggagcgttctgatgtctccaccgatactccaacccggcaccaccttctgggaaacccgcattgtcaag
 ggtctgcccttggcggagtcttgggcaaccttgatgagcgccttgttcatgggcagtgggtctgaaatccaccgcggcaacgaggtccaagc
 tatgaggatttgggtgaaactgaaggccgaccacgcctgcgctactggctggatcgctgaagtctgaggcattttggaccacgtggccttgggtgat
 ggctacttcccagcgttcgcgaaggcgtgacgtggtgatcttggaaatccccggatccacacgcagcgaacgcattgcgctttagcttcccacgccag
 cagcgggcagggttcttgtgcatacgggatttcatctgcgccagcgaagctgtaaggacggccaagtggacgtcatgccattccagctgggtcacc
 atgggtaatcctattgctgatttcccaacgagttgttcgcagccaatgaataccgcgagtaacttggaagttcacggcatcggcgtgcagctcaccgaa
 gcattggccgagtaactggcactcccagtcgcagcgaactcaagctgaacgacggtggatctgtcgtgattttgatccagaagacaagaccaagtcc
 ttcgacctggattaccgcggcggccttctcctttgggtacggttcttgccctgatctggaagaccgcgcaagctggtggaattgctcgagccaggc
 cgtatcggcgtggagttgtccgaggaaactccagctgcacccagagcagtgctcctaccaccagaggcaaaagtactttaacgtc
 taa

Fig. 7

a) SEQ ID No. 20:

MSTSVTSPAHNNAHSEFLDALANHVLIIGDGAAGTQLQGFDLDVEKDFLDLEGCNEIILNDRPDVLRQIHRAIFYEAGADLVETNTFGCNLPNLADYDIA
 DRRELAYKGTAVAREVADEMGPGRNCMRRFVVGSLPGTKLPSLGHAPYADLRGHYKEAALGIDGGDAFLIETAQDLLQVKAAVHGVQDAMAEIDT
 FLPIICHVTETGTMLMSEIGAALTALQPLGIDMIGLNCATGPDSEMSEHLRYSKXADIPVSVMPNAGLPVLGKNGAEYPLEAEDLAQALAGFVSEY
 GLSMVGCCGTTPEHIRAVRDVAVGVPEQETSTLTIKIPAGPVEQASREVEKEDSVASLYTSVPLSQETGISMIGERTNSNGSKAFREAMLSGDWEKCV
 IAKQQRDGAHMLDLVDYVGRDGTADMATLAALLATSTLPIMIDSTEPEVIRTGLEHLGGRSIVNSVNFEDGDGPESRYQRIIMKLVKQHGAUVVALT
 IDEEQARTAEHKVRIAKRLIDITGSYGLDIKDIVVDCLTFPISTGQETRRDGIETIEAIRELKKLYPEIHTTLGLSNISFGLNPAARQVILNSVFLN
 ECIEAGLDSAIAHSSKILPMNRIDDRQREVALDMVYDRRTEDYDPLQEFMQLFEGVSAADAKDARAEQLAAMPLFERLAQRIDGDKNGLEDDLEAGMK
 EKSPIAIINEDLLNGMKTGELFGSGQMLPFVLQSAETMKTAVAYLEPFMEEEAEATGSAQAEKGKIVWATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYDVVN
 LGIKQPLSAMLEAAEEHKADVIGMSGLLVKSTVVMKENLEEMNNAGASNYPVILGGAALTRTYVENDLNEVYTGVEYYARDAFEGRLMDEVMAEKRGE
 GLDPNSPEAIEQAKKKAERKARNERSRKIAAERKANAAPIVPERSDVSTDTPTAAPPFWGTRIVKGLPLAEFLGNLDERALFMQWGLKSTRGNEGPS
 YEDLVETEGRPRLRYWLDRLKSEGILDHVALVGYFFPAVAEGDDVILESPDPHAAERMRFSPRQQRGRFLCIADFIRPREQAVKDGQVDMFPQLVLT
 MGNPIADFANELFAANEYREYLEVHGIGVQLTEALAEYWHRSRSELKNDGGSVADFDPEDTKFFDLDIRGARFSFGYGSCPDLEDRAKLVELLEPG
 RIGVELSEELQLHPEQSTDAFVLYHPEAKYFNV

b) SEQ ID No. 26:

atgtctacttcagttacttcaccagccccacaacacgcacattcctccgaatttttggatcggttgcaaacacatgtgttgatcgggcagcgcccatg
 ggcacccagctccaaaggcttgacctggacgtggaaaggattccttgatctggaggggtgtaagtgaattctcaacgacacccgcctgatgttg
 aggcagattcaccgcgcctactttgagcgggagctgacttggtgagaccaatacttttggttgcaacctgccgaactggcgattatgacatcgct
 gatcgctgcgctgagcttgcctacaaggccactgcagtggtgctagggaagtggctgatgagatggcgccggcgaacacggcatgcggcgtttcgtggt
 ggtccctgggacctggaacgaagcttccatcgctgggacctgcacctgatgcagatttgcgtgggcactacaaggaagcagcgcttggcatcatcgac
 ggtggtggcgatgccttttgattgagactgctcaggacttgcctcaggtcaaggctcggttcacggcgttcaagatgccatggctgaactgataca
 ttcttgccattatttgccacgtcaacctgagagaccacggcaccatgctcatgggttctgagatcggtgcgcggttgacagcgctgcagccactgggt
 atcgacatgattggtctgaactgcgcaccggccacagatgagatgagcagcactgcgttacctgtccaagcacgcgatatctctgtcggtgatg
 cctaacgcaggtcctcctgctcctgggttaaaaaacggtgcagaataaccactgagctgaggtattggcgagcgctggtggttccgtccgaatat
 ggcctgtccatggtgggtggtgtgtggcaccacacctgagcacatccgtgcggtccgcgatgcggtggttgggttccagagcaggaaccccccaca
 ctgaccaagatccctgcaggccctgtgagcaggcctcccgcgaggtggagaaaggagactccgtcgctgcgtgtacacctcggtgccattgtccag
 gaaacggcatttccatgatcggtgagcgcaccaactccaacggttccaaggcattccgtgaggaatgctgtctggcgattgggaaaaagtgtgtggat
 attgccaagcagcaaaccccgatggtgcacacatgctggatctttgtgtgattacgtgggacgagacggcaccgcgatatggcgaccttggcagca
 ctcttgctaccagctccactttgccaatcatgattgactccaccgagccagaggttatctgcacagggccttgagcactgggtggacgaagcactgtt
 aactccgtcaactttgaagacggcgatggccctgagttcccgctaccagcgcatcatgaaactggttaagcagcacggtgcggccggttgcgctgacc

attgatgaggaaggccaggcacgtaccgctgagcacaaaggtgcgcattgctaaacgactgattgacgatatcaccggcagctacggcctggatatcaaa
gacatcgttggactgcctgacctcccgatctctactgcccagggaagaaaccaggcgagatggcattgaaaccatcgaagccatccgcgagctgaag
aagctctaccagaaatccacacaccctgggtgtgtccaatattctctcgccctgaacctgctgcacgccaggttcttaactctgtgttctctcaat
gagtgcaattgaggctggctggactctgcgattgcgcacagctccaagattttgccgatgaaccgcattgatgatcgccagcgcaagtggcgttggat
atggtctatgatcgccgcaccgaggattacgatccgctgcagggaattcatgcagctgtttgaggcgcttctgctgccgatgccaaagatgctcgcgct
gaacagctggccgctatgcctttgtttgagcgtttggcacagcgcatcatcgacggcgataagaatggccttgaggtgatctggaagcaggcatgaag
gagaagtctctctattgcatcatcaacgaggaccttctcaacggcatgaagaccgtgggtgagctgtttggttccggacagatgcagctgccattcgtg
ctgcaatcggcagaaacccatgaaaactgcggtggcctatttggaaccgttcatggaagaggaagcagaagctaccggatctgcgcaggcagagggcaag
ggcaaaatcgtcgtggccaccgtcaagggtgacgtgcacgatatcggaagaacttggtagacatcattttgtccaaacacggttacgaactgggtgaac
ttgggcatacaagcagccactgtccgcatgttggaagcagcggaagaaacacaaagcagacgtcatcggcattgtcggaacttcttgtgaagtccaccgtg
gtgatgaaggaaaaaccttgaggagatgaacaaacgcggcgcatccaattaccagtcattttgggtggcgctgcgctgacgcgtacctaactgcgtggaacac
gatctcaacgaggtgtacaccggtgaggtgtactacgcccgtgatgcttgcaggcgctgcgctgatggatgaggtgatggcagaaaaagcgtggtgaa
ggacttgatcccaactcaccagaagctattgagcaggcggaagaaagggcggaacgtgaaggtcgttaatgagcgttcccgcaagattgcccgaggagcgt
aaagctaatacgcgctcccgtgatgttccggagcgttctgatgtctccaccgatactccaacggcgaccacacggttctgggaacccgcatgttcaag
ggtctgcccttggcgaggttcttgggcaaccttgatgagcgcgcttgttcatggggcagtggggtctgaaatccacccggcgcaacgaggggtccaagc
tatgaggatttgggtggaactgaaggccgacccacgcctgcgctactggctggatcgccctgaagtcctgagggcattttggaccacgtggccttgggtgat
ggctacttcccagcggtcgcggaaggcatgaactgggtgatcttggaatccccggatccacacgcagccgaacgcatgcgcttagcttcccacgcag
cagcgcggcaggttcttgtgcatcgcgatttcttcgcccacgcgagcaagctgtcaaggacggccaagtggacgtcatgccattccagctggtcacc
atgggtaatcctattgctgatttcgccaacgagttgttcgcagccaatgaataccgcgagtaacttggaagttcacggcatcggcgtgcagctcaccgaa
gcattggccgagtaactggcactcccgagtgccagcgaaactcaagctgaacgacgggtggatctgtcgctgattttgatccagaagacaagaccagttc
ttcgacctggattaccgcgggcccgcttctccttgggttacgggttcttgccctgatctggaagacccgcgcaagctgggtggaattgctcgagccagggc
cgtatcggcgtggagttgtccgaggaactccagctgcaccagagagcagtcacagacgcgttctgtgctctaccacccagaggcaagtaactttaacgtc
taa

Fig. 8

a) SEQ ID No. 22:

MSTSVTSPAHNNHSEFLDALANHVLIIGDAMGTQLQGFDDLVEKDFLDLEGCNEILNDTRPDVLRQIHRAYFEAGADLVETNTLGCNLPNLADYDLA
 DRRELAYKGTAVAREVADEMGPGRNGMRFRVVGSLGPGTKLPSLGHAPYADLRGHYKEAALGIIDGGDAFLIETAQDLLQVKAHVGVQDAMAEALDT
 FLPIICHVTVETTTGMLMSEIGAALTALQPLGIDMIGLNCATGPDSEMSEHLRYSKHADIPVSVMPNAGLPVLGKNGAEYPLEAEDLAQALAGFVSEY
 GLSMVGGCCGTTPEHIRAVRDVAVGVPEQETSTLTIKIPAGPVEQASREVEKEDSVASLYTSVPLSQETGISMIGERTNSNGSKAFREAMLSGDWEKCV
 IAKQQTRDGAHMLDLCDVYVGRDGTADMATLAALLATSSLTLPIMIDSTEPEVIRTGLEHLGGRSIVNSVNFEDGDGPESRYQIRIMKLVKQHGAADVVALT
 IDEEQARTAEHKVRIAKRLIDDIITGSYGLDIKDIVVDCLTFPISTGQEESTRDGIETIEAIRELKKLYPEIHTTLGLSNI SFGLNPAARQVLSVFLN
 ECIEAGLDSAIAHSSKILPMNRIDDRQREVALDMVYDRRTEDYDPLQEFMQLFEGVSAADAKDARAEQLAAMPLFERLAQRIIDGDKNGLEDDLEAGMK
 EKSPIAIINEDLLNGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAETMKTAVAYALEPFMEEEAEATGSAQAEKGKIVVATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYDVVN
 LGIKQPLSAMLEAAEEHKADVIGMSGLLVKSTVVMKENLEEMNAGASNYPVILGGAALTRTYVENDLNEVYTGVEYYARDAFEGRLMDEVMAEKRGE
 GLDPNSPEAIEQAKKKAERKARNERSRKIAAERKANAAPIVPERSDVSTDTPTAAPPFWGTIRIVKGLPLAEFLGNLDERALFMGQWGLKSTRNEGPS
 YEDLVETEGRPRLRYWDLRKSEGILDHVALVGYFFPAVAEGDDVILESPDPAHAERMFSPRQQRGRFLCIADFIRPREQAVKDGQVDMFFQLVT
 MGNPIADFANELFAANEYREYLEVHGIGVQLTEALAEYWHRSRSELKINDGGSVADFPEDKTKFFDLDYRGARFSFGYGSCPDLEDRAKLVELLEPG
 RIGVELSEELQLHPEQSTD A FVLYHPEAKYFNV

b) SEQ ID No. 27:

atgtctacttcagttacttcaccagcccaacacacattcctccgaatttttgatgcgttgccaaccatgtgttgatcggcgacggcgccatg
 ggcacccagctccaaaggcttgacctggacctggaaaggatttctcttgatctggaggggtgtaattgagattctcaacgacacccgcctgatgtgtg
 aggcagattcacccgcctactttgagggggagctgacttggtgagaccaatact**ttt**gggttgcaacctgccgaacttggcgattatgacatcgct
 gatcgttgcgtgagcttgctacaaggcactgcagtggctagggaagtggctgatgagatgggcccggccgaaacggcatgcccgtttcgtggtt
 ggttccctgggacctggaacgaagcttccatcgtgggacctgcacctgatgcagatttgcgtgggcactacaaggaagcagcgttggcatcatcgac
 ggtggtggcgatgcctttttgattgagactgctcaggacttgcctcaggtcaaggctgcgttcacggcgttcaagatgccatggctgaaacttgataca
 ttcttggccattatttggcacgtcacccgagaccacggcaccatgctcatgggttcagatcggtgccggttgacagcgtgcagccactgggt
 atcgacatgattggtctgaactgcgccacccgcccagatgagatgagcagcacctgcgttacctgtccaaagcacgccgatatctctgtgctggtgatg
 cctaaacgaggtcttctgtcctgggttaaaacggtgcagaaatccacctgaggtgaggttggcgagcggctggctggattcgtctccgaatat
 ggcctgtccatggtgggtggttgttggcaccacacctgagcacatccgtgcgttcccgatgcgttgggttccagagcaggaacacctccaca
 ctgaccaagatccctgcaggccctgttgagcaggcctcccgagaggttgagaaaggagactccgtcgctcgctgtacacctcgggtgccattgtccag
 gaaacggcatttccatgatcgggtgagcgacccaactccaaaggattccagagccattccgtgaggaatgctgtctggcgattgggaaaaagtgtgtggat
 attgccaaagcagcaaaccccgatggtgcacacatgctggatctttgtgtgattacgtgggacgagacggcaccgccgatatggcgaccttggcagca
 ctctctgctaccagctccactttgccaatcatgattgactccaccgagccagaggttatccgacagggccttgagcacttgggtggacgaagcactggt
 aactccgtcaactttgaagacggcgatggccctgagtcctccgctaccagcgcatcatgaaactggtaaagcagcacggtgcggccgtggttgcgctgacc

Attgatgaggaaggccaggcacgtaccgctgagcacaaaggtgcgcattgtctaaacgactgattgacgatatcacccggcagctacggcctggatatcaaaa
gacatcgttgtgactgcctgacctcccgatctctactgcccaggaaagaaacccaggcgagatggcattgaaacccatcgaaagccatccgcgagctgaag
aagctctaccagaaaaaccacaccacctgggtctgtccaatatctctcgccctgaacctgctgcacgccaggttcttaactctgtgttccctcaat
gagtgcattgaggctgtgtgactctgcgattgcgcacagctccaagattttgcccgatgaaccgcattgatgcgccagcggaagtggcgttggat
atggtctatgatgcgcgcaccgaggaattacgatccgctgcagggaattcatgcagctgtttgagggcgtttctgctgccgatgccaaaggatgctgcgcct
gaacagctggccgctatgcctttgtttgagcgtttggcacagcgcatcatcgacggcgataaagaatggccttgaggatgatctggaagcagggcatgaag
gagaagtctcctattgcgatcatcaacgaggaccttctcaacggcatgaagacctgttggaacctgtcatggaagaggaagcagaagctacggatctgcgcagggcagggcaag
ctgcaatcggcagaaacccatgaaaactgcgggtggcctatttggaacctgtcatggaagaggaagcagaagctacggatctgcgcagggcagggcaag
ggcaaaatcgtcgtggccacctcaagggtagctgcacgatatcggaagaacttggtagacatcatttgtccaaacaggttacgacgtggtagaac
ttgggcatacagcagccactgtccgccatgttggaagcagcggaagaaacacaaagcagacgtcatcggcattgtcgggacttcttgtgaagtccacctg
gtgatgaaggaaaaaccttgaggagatgaacaacgcggcgcatccaattacccagtcattttgggtggcgtgcgtgacgcgtacctaactgcgtggaatac
gatctcaacgaggtgtacaccgtgaggtgtactacgcccgtgatgcttcgagggcctgcgcctgatggatgaggtgatggcagaaaaagcgtggtgaa
ggacttgatcccaactcaccagaagctattgagcaggcgaagaagaaggcggaacgttaaggctcgtaatgagcgttcccgaagattgccgcggagcgt
aaagctaatacgcgctcccgtgatgttccggagcgttctgatgtctccaccgatactccaacccggcaccaccttctggggaacccgcattgtcaag
ggctgccccttggcggagttcttgggcaaccttgatgagcgcgccttgttcatggggcagtggggtctgaaatccacccgcggcaacgaggggtccaagc
tatgaggatttgggtggaacctgaaggccgaccacgcctgcgtactggctggatcgccctgaagctcgagggcatttggaccacgtggccttgggtgat
ggctacttcccagcgtcgcggaaggcagatgacgtggtgatcttggaaatccccggatccacacgcagccgaacgcagcgtttagcttcccacgcag
cagcgggcaggttcttgtgcacgcggatttcttcgcccacgcgagcaagctgtcaaggacggcccaagtggacgtcatgccattccagctggtcacc
atgggtaatecctattgctgatttcgccaacgagttgttcgcagccaatgaataccgcgagtaacttggaaagtcacggcatcggcgtgcagctcaccgaa
gcattggccgagtagtggcactcccagtcgcagcgaactcaagctgaacgacggtggatctgtcgtgatttggatccagaagacaagaccaagtcc
ttcgacctggattaccgcggcgcgccttctccttgggttacgggttcttggccctgatctggaagaccgcgcaagcgtggtggaattgctcgagccaggc
cgtatcggcgtggagttgtccgaggaactccagctgcaccagagcagtcacagacgcgtttgtgctctaccacccagagggcaagtaactttaacgtc
taa

Fig. 9

a) SEQ ID No. 22:

MSTSVTSPAHHNAHSEFLDALANHVLI GDGAMGTQLQGFDDLVEKDFLDLEGCNEILNDRPDVLRQIHRAFEAGADLVETNFTGCNLPNLADYDIA
 DRCRELAYKGTAVAREVADEMGPRNGMRRFVVGNLPGTKLPSLGHAPYADLRGHYKEAALGIIDGGDAFLIETAQDLLQKAAVHGVDAMAEALDT
 FLPIICHVTVETTGTMGMSEIGAALTALQPLGIDMIGLNCATGPDEMSEHLRYSKHADIPVSVMPNAGLPVLGKNAGAEYPLEAEDLAQALAGFVSEY
 GLSMVGCCCGTTPHEHIRAVRDVAVGVPEQETSTLTKIPAGVPEQASREVEKEDSVASLYTSVPLSQETGISMIGERTNSNGSKAFREAMLSGDWEKCV
 IAKQTRDGAHMLDLCDVYVGRDGTADMATLAALLATSSTLPI MIDSTEPEVIRTGLEHLGGRSIVNSVNFEDGDGPESRYQRIKMLVKQHGA AVVALT
 IDEEGQARTAEHKVRIAKRLIDDI TGSYGLDIDKIDVVDCLTFPISTGQEE TRRDGIE TIEAIRELKKLYPEIHTTGLSNISFGLNPAARQVLSVFLN
 ECIEAGLDSALAHSSKILPMNRIDDRQREVALDMVYDRRTEDYDPLQEFMQLFEGVSAADAKDARAEQLAAMPLFERLAQRIIDGDKNGLEDDLEAGMK
 EKSPIAI INEDLLNGMKTVGELFGSGQMQLPFVLQSAETMKTAVAYLEPFFMEEEAEATGSAQAEKGKIVVATVKGDVHDIGKNLVDIILSNNGYDVVN
 LGIKQPLSAMLEAAEEHKADVIGMSGLLVKSTVMKENLEEMNNAGASNYPVILGGAALTRTYVENDLNEVYTG EYY YARDAFEGLRMLMDEVMAEKRGE
 GLDPNSPEAIEQAKKKAERKARNERSRKIAAERKANAAPIVIPERSDVSTDTPTAAPPFWGT RIVKGLPLAEFLGNLDERALFMGQWGLKSTRGNEGPS
 YEDLVETEGRPRLRYWLDRLKSEGILDHVALVGYFFPAVAEGDDVILESPDPHAAERMRFSPRQQRGRFLCIADFIRPREQAVKDGQVDVMPFQLVT
 MGNPIADFANELFAANEYREYLEVHGIGVQLTEALAEYWHRSVRSELKLNDDGGSVADFPEDKTKFFDLDYRGARFSFGYGSCPDLEDRAKLVELLEPG
 RIGVELSEELQLHPEQSTDAFVLYHPEAKYFNV

b) SEQ ID No. 28:

atgtctacttcagttacttcaccagcccaacaaacgcacattcctccgaatttttgatgcgttgccaaacccatgtgtgatcggcgacggcgccatg
 ggcacccagctccaaaggcttgacctggacgtggaaggatttctctgatctggaggggtgtaataatgagattctcaacgacacccgcctgatgtgttg
 aggcagattcacccgcctactttgagcgggagctgacttggtgagaccaataacttttggttgcaacctgccgaacttgccgattatgacatcgct
 gatcgttgccgtgagcttgccacaaggcactgcagtggtgctagggaagtggctgatgagatgggcccggggccgaaacggcatgcggcgtttcgtggtt
 ggtt**ttcc**ctgggacctggaacgaagcttccatcgctggcccatgcacctgatgcagatttgctgtggccactacaaggaaagcagcgccttggcatcatcgac
 ggtggtggcgatgcctttttgatgagactgctcaggacttgcttcaggtcaaggctgcggttcacggcgttcaagatgccatggctgaacttgataca
 ttcttgcccatatttgccacgtcacctgacccagccacccatgctcatgggttctgagatcggtgcgcgttgacagcgtgcagccactgggt
 atcgacatgattggtctgaactgcgccaccggcccatgagatgagcagcacctgcgttacctgtccaagcacgcgcgtggtgattcgtctccgaatat
 cctaacgcaggtcttctgtcctgggtaaaaacggtgcagaaatacccaactgaggtgaggttggtggttccagagcaggaacacctccaca
 ggctgtccatggtgggtggttgttggcaccacacctgagcacatccgtgcggtccgcgatgcggtggttccagagcaggaacacctccca
 ctgaccaagatccctgcaggccctgttgagcaggccctccgcgaggtggagaaagaggactccgtcgctgcgtgtacacctcgggtgccattgtccca
 gaaacccgcatctccatgatcgggtgagcgacccaactccaacggttccaaggcatccgtgaggaatgctgtctggtggttgggaaaaagtgtgtgat
 attgccaaagcagcaaaccccgatggtgcacacatgctggatcttctgtggttacgtgggacgagacggcacccgcgatattggcgaacctggcagca
 ctctctgtaccagctccactttgccaatcatgattgactccaccgagccagaggttatcgcacaggccttgagcaactgggtggacgaagcatcggt
 aactccgtcaactttgaagacggcgatggccctgagtcctccgtaccagcgcatcatgaaactggtaaagcagcagcgtgcggccgtggttgcgctgacc

Attgatgagggaaggccacgtaccgctgagcacaaggctgcgcattgtctaaccgactgattgaogatatcacggcgacgtacggcctggatatcaaa
 gacatcgttgtggactgcctgacctcccgatctctactggccagggaagaaaccaggcgagatggcattgaaaccatcgaaagccatccgcgagctgaag
 aagctctacccagaaatccacaccacctgggtctgtccaataattccttcggcctgaacctgctgcacgccagggttcttaactctgtgttccctcaat
 gagtgcattgaggctggtctggaactctgcgattgcgcacagctccaagattttgccgatgaaccgcattgatgcgccagcgcaagtggcgttggat
 atggtctatgatcgccgcaccgaggattacgatccgctgcagggaattcatgcagctggttgaggcgcttctgctgccgatgccaaagatgctcgcgct
 gaacagctggccgctatgcctttgtttgagcgtttggcacagcgcatcatcgacggcgataaagaatggccttgaggatgatctggaagcaggcatgaag
 gagaagtctctattgcgatcatcaacgaggaccttctcaacggcatgaagacctgggtgagctgtttggttcggacagatgcagctgccattcgtg
 ctgcaatcggcagaaaccatgaaaactgcggtggcctatttggaaccgttcatggaagaggaagcagaaagctacccgatctgcgcaggcagagggcaag
 ggcaaaatcgtcgtggccacctcaagggtgacgtgcacgatatcggcaagaactgggtggacatcattttgtccaaacaacgggttacgacgtggtgaac
 ttgggcatacaagcagccactgtccgccatgttggaagcagcgggaagaaacacaaagcagacgtcatcgggcatgtcgggacttcttgtgaagtcacacgtg
 gtgatgaaggaaaaaccttgaggagatgaacaacgccggcgcatccaattaccagtcattttgggtggcgctgcgctgacgcgtacctacgtggaaaaac
 gatctcaacgaggtgtacaccggtgaggtgtactacgccctgatgctttcgaggccctgcgctgatggatgaggtgatggcagaaaaagcgtggtgaa
 ggacttgatcccaactcaccagaagctattgagcaggcgaagaagaagcggaacgttaaggctcgtaataagcgttcccgaagattgccgcggagcgt
 aaagctaatgcggctcccgtgattgttccggagcgttctgatgtctccaccgatactccaaacccgggcaccacggttctggggaaccccgattgtcaag
 ggtctgcccttggcgagttcttgggcaaccttgatgagcgcgccttgttcatggggcagtggggtctgaaatccaccccgcgcaacgaggggtccaaagc
 tatgaggatttgggtgaaactgaagccgaccacgcctgcgctactggctggaatccccggatccacacgcagccgaacgcacgtcgcttttagcttcccacgcag
 ggctacttcccagcggtcgcggaaggcgatgacgtggtgatcttggaatccccggatccacacgcagccgaacgcacgtcgctttagcttcccacgcag
 cagcgcgcaggttcttgtgcatcgcgatttcatcgcgccacgcgagcaagctgtcaaggacggccaaagtggacgtcatgccattccagctggtcacc
 atgggtaatcctattgctgatttcccaacgagttgttcgagccaatgaataccgcgagctacttggaagttcacggcatcggcgtgcagctcacccgaa
 gcattggccgagtaactggcactcccagtgccgagcgaactcaagctgaacgacggtggatctgtcgtgatatttgatccagaagacaaagcttc
 ttcgacctggattaccgcggcggccgcttctccttggttacggttcttgccctgatctggaagacccgcgcaagctggtggaattgctcgagccaggc
 cgtatcggcgtggagttgtccgaggaaactccagctgcaccagagcagttccacagacgcgttttgtgctctaccacccagaggcaaaagtactttaacgtc
 taa

RESUMO

Patente de Invenção: **"METIONINA SINTASES COM INIBIÇÃO REDUZIDA DE PRODUTO"**.

A presente invenção refere-se às sequências nucleotídicas codificando cobalamina-metionina sintase enzimaticamente ativa e fragmentos funcionais da mesma sendo modificados em comparação com a enzima de tipo selvagem respectiva de modo que referidas enzimas mostram uma inibição reduzida de produto por metionina. A presente invenção também refere-se aos polipeptídeos sendo codificados por tais sequências nucleotídicas e células hospedeiras compreendendo estas sequências nucleotídicas. Além disso, a presente invenção refere-se a métodos para produzir metionina em organismos hospedeiros ao fazer uso destas sequências nucleotídicas.