



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

INGENIERÍA METABÓLICA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA LA DEGRADACION DE ALGINATO DE SODIO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA , MENCIÓN ING.
QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

JOSE ALFREDO DUGUET SAEZ

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE
PROFESOR CO-GUÍA:
BÁRBARA ANDREWS

MIEMBROS DE LA COMISION:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ALVARO OLIVERA NAPPA
VICTOR CIFUENTES GUZMÁN

SANTIAGO DE CHILE
2017

Resumen

Dada la necesidad de diversificar la matriz energética existe la necesidad de buscar nuevas fuentes de biomasa para las energías renovables no convencionales, entre las cuales las algas pardas son una fuente de carbono por su composición en carbohidratos fermentables, entre los que se destacan el polisacárido alginato. Para industrializar un proceso de sacarificación y fermentación de alginato es necesario contar con un organismo reconocido como seguro por la FDA (G.R.A.S.). El siguiente trabajo consiste en el establecimiento de una ruta degradativa de alginato en *S. cerevisiae* S288c, mediante la construcción de módulos de expresión de las enzimas del tipo alginato liasa, oligoalginato liasa, DEHU reductasa y KDG quinasa, KDGP aldolasa en el cromosoma XVII y el transportador GAT en vector episomal. Se obtuvo un transformante de *S. cerevisiae* S288c clon 47 resistente a higromicina B.

La cepa recombinante posee un crecimiento de un 37,5% superior a la cepa nativa en condiciones de 5 y 10 g/L de glucosa y alginato, con una degradación de hasta 6 g/L de alginato a las 60 horas, correspondiente a un 63% del total de alginato. Los análisis enzimáticos revelan que no es posible encontrar la expresión de DEHU reductasa en el organismo. La expresión de las enzimas alginolíticas está presente en el medio intracelular, como también en la fracción extracelular mediante el uso de un péptido señal.

Estudios de docking molecular muestran similitudes estructurales de los transportadores del tipo de la superfamilia del facilitador mayor de ácido D-galacturónico, ácido D-quínico con transportadores de xilosa y glucosa, y sugieren que pueden ser utilizados para la asimilación de ácidos urónicos. Los resultados experimentales muestran que *S. cerevisiae* S288-47 posee mayor crecimiento utilizando el transportador heterólogo GAT-1, por sobre quTD.

Se requieren estudios adicionales para incrementar la capacidad de degradación del alginato por parte de esta levadura, y la asimilación de los ácidos urónicos, además de ser complementado con otras rutas degradativas de azúcares provenientes de algas como manitol.

Abstract

The overwhelming need to develop strategies in the context of the diversification of fuels has triggered to look for novel biomass sources for non-conventional renewable energies, where brownseaweed are an interesting carbon source by their fermentable carbohydrate composition, where the most abundant is alginate. For the industrialization of a saccharification and fermentation process of alginate it is necessary count with an organism with specific properties recognized as safe by the FDA (G.R.A.S.). This study is focused in the establishment of a degradative pathway of alginate in *Saccharomyces cerevisiae* S288c, with the construction of expression modules of enzymes alginate lyase, oligoalginate lyases, DEHU reductase, KDG kinase, KDGP aldolase in chromosome XVII and the galacturonic acid transporter GAT in the episomal vector pSV. A transformant of *S. cerevisiae* S288c clone 47 is obtained resistant to hygromycin B.

The recombinante strain has a growth 37,5% greater than the wild type in conditions of 5 and 10 g/L glucose and alginate correspondingly, with a degradation yield of 6 g/L at 60 hours, equivalent to a 63% of total sodim alginate. Enzymatic essays reveals that is not possible to identify expression of DEHU reductase. Expression of alginolytic enzymes is present in the insoluble and soluble fraction using oligo saccharyl transferase signalpeptide for extracellular excretion.

Molecular docking studies shows structural similarity of the mayor facilitator superfamiliy transnporters of D-galacturonic acid and D-quinic acid with known xylose and glucose transporters, the suggests that can be utilized for uronic acid uptake. Experimental results shows that *S. cerevisiae* S288c-47 has greater cell growth using GAT-1 than quTD transporter.

Future prospects are focused in increasing alginate degradation capacity and uronic acid uptake, besides complementing with other degradative pathways from seaweed carbohydrates as mannitol.

Dedicatoria

Mis agradecimientos a mi familia quienes me apoyaron durante todo este proceso de aprendizaje y crecimiento profesional. Esta investigación está dedicada a incentivar a futuros estudiantes que es posible impactar el mundo en el vivimos ya sea desarrollando nuevas tecnologías o contribuyendo con la difusión del conocimiento, aportaremos un pequeño grano de arena que en futuros porvenires podrá generar un impacto sin precedentes.

Agradecimientos

Mis más profundos agradecimientos al Dr. Juan Asenjo, quién me invitó a conocer el mundo de la ciencia desde un enfoque innovador. También agradezco a la Dra. Barbara Andrews por todo su apoyo, disposición y guía en el desarrollo de este trabajo de tesis, a Nancy por apoyo incondicional y brindar su valiosa experiencia técnica en laboratorio y a mis compañeros de doctorado por su apoyo en momentos de trabajo duro.

Financiamiento

Este proyecto de tesis ha sido financiado con el apoyo de Beca Doctorado Nacional CONICYT Folio N° 21120740, Concurso Tesis Doctoral en Empresa (PAI) N° 781413012.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I: Producción de combustibles a partir de algas.....	1
1. Marco General	1
2. Descripción de las macroalgas	3
2.1. Componentes de las macroalgas	4
3. Carbohidratos hidrolizables de las algas pardas.....	6
4. El polímero de alginato y sus enzimas degradadoras.....	7
5. Producción de combustibles a partir de macroalgas	9
6. El género <i>Saccharomyces</i>	12
7. Establecimiento de una ruta metabólica degradativa de alginato	13
Capítulo II: Ingeniería metabólica en <i>S. cerevisiae</i>	16
1. Diseño de una ruta heteróloga degradativa de alginato de sodio	16
2. Búsqueda de transportadores de ácidos urónicos.....	17
3. Metodología.....	22
3.1. Construcción de Módulos de expresión mediante DNA Assembly OE-PCR.....	22
3.2. Construcción de Cluster mediante Gibson Assembly.	26
4. Resultados y Discusión	27
4.1. Módulos de Expresión	27
4.2. Cluster de transformación	36
Capítulo III: Obtención y análisis funcional de la cepa recombinante.....	41
1. Metodología.....	41
1.1. Transformación genética.....	41
1.2. Cultivo de la cepa recombinante.....	42
2. Resultados y Discusión	43
2.1. Transformación genética.....	43
2.2. Cultivo de la cepa recombinante.....	45
Capítulo IV: Molecular Docking de transportadores de ácidos urónicos	50
1. Introducción.....	50
1.1. Modelación de proteínas	50
1.2. Modelamiento de proteínas por homología.....	50
1.3. Estrategia de modelación.....	51
2. Metodología in silico.....	52
3. Resultados y Discusión	54

Capítulo V: Construcción de vectores episomales y Análisis enzimáticos de la ruta.....	66
1. Metodología.....	66
1.1. Construcción de vectores de expresión en <i>S. cerevisiae</i>	66
1.2. Condiciones de crecimiento.....	67
1.3. Análisis de las enzimas presentes en Sc47	67
1.4. Electroforesis en SDS-PAGE	68
1.5. Ensayos enzimáticos	68
2. Resultados y Discusiones	69
2.1. Vectores Episomales	69
2.2. Electroforesis de proteínas	69
2.3. Actividad enzimática de las fracciones	73
Conclusiones.....	77
Bibliografía.....	78
Anexos	89
A. Tabla de partidores	A
B. Protocolos.....	B
B.1. Extracción de DNAg.....	B
B.2. Extracción de ARN	B
B.3. PCR KOD Hotstart Kit y OE-PCR	B
B.4. PCR Phusion Kit	B
B.5. Extracción DNA plasmidial.....	B
B.6. Extracción Gel agarose	B
B.7. Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> (DH5-alfa y Top10)	B
B.8. Transformación de células electrocompetentes <i>E. coli</i>	B
C. Tabla de construcción de módulos.....	C
D. Cepas de levaduras	D
E. Cepas de <i>E. coli</i>	E
F. Tabla herramientas de modelamiento estructural y proteínas y Docking Molecular .	F
G. Tabla de Molecular Docking	G
H. Tabla de purificación enzimática.....	H
I. Resultados de secuenciación.....	I

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformaciones de los bloques de M-M (A) y G-G (B).....	6
Figura 2 Bloques de poli-guluronato en interacción con iones de calcio (Gacesa, 1988)....	7
Figura 3 Mecanismo general de degradación de enzimas alginato liasa (endolítica) y oligoalginato liasa (exolítica) (Kim et al., 2011).	8
Figura 4. Ruta degradativa de alginato. Las enzimas que participan en la ruta son alginato liasa (Aly), oligoalginato liasa (Oly), DEHU reductasa (DehR), KDG quinasa (KDGK), KDGPA aldolasa (KDGPA).....	14
Figura 5. Metodo de ensamble para construcción de Módulos mediante DNA Assembly (OE-PCR).....	25
Figura 6. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). A:Amplificación del gen HdAlex (822 bp) de alginato liasa B: Promotor PGK1p (757 bp), 2: Terminador CYC1t (302 bp). C: Reacción fallida Oly (3731 bp) y Modulo Aly (1881 bp).	28
Figura 7. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). Amplificación preliminar de las fuentes genéticas correspondientes. (1: quTD 1705 bp de A. nidulans, 2: DehR 1068 bp de A. tumefaciens C58, 3: KDGK 930 bp de E. coli TOP 10, 4: KDGK 930 bp de E. coli DH5-alfa, 5: KDGPA, 591 bp).....	28
Figura 8. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). Amplificación de genes DehR (1068bp) , quTD (1705 bp) , KDGK (930 bp).....	29
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación de gen Oligoalginato liasa (2331 bp) a partir del DNAg de Agrobacterium tumefaciens C58.	30
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa. Amplificación y posterior purificación de los fragmentos. M: 1 kb Ladder plus, Modulo parcial: ADH1p + Hdalex (1579 bp), 2: Modulo completo ADH1p + HdAlex + CYC1t (1881 bp).....	30
Figura 11. Promotores y terminadores para la construction de módulos de la ruta del alginato. 1: PGK1p (757 bp), 2: ADH2t (400 bp), 3: TEF1p (412 bp), 4: PDC1p (800 bp) , 5:HXT7p (395 bp), 6: TPI1t (400 bp), 7: PGI1t (400 bp), 8: FBA1t (400 bp).	31
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Ensamble de Modulo Oly (3731 bp). B: Re-amplificación fragmento completo. 1: modulo completo PYK1p + Oly + ADH2t (3731 bp), 2: módulo parcial PYK1p + Oly (3331 bp).	31
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Construccion parcial del módulo DehR + TPI1t (1468 bp) y parcial quTD + ENO2t (2105 bp). B: Modulo completo DehR (1880 bp). C: Modulo completo quTD (2905 bp).....	32
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Construcción Modulo completo ΔHXTp + KDGK + PGI1t (1725 bp).	33
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Construcción Modulo parcial KDGPA + FBA1t (991 bp), FBA1t: Sólo terminador (400 bp) B: Modulo KDGPA: FBA1p + KDGPA + FBA1t (1811 bp).....	33
Figura 19. Mapa de los vectores de clonamiento contruidos con los módulos de expresión.	36

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Analisis comparativo de especificidad de Gibson Assembly v/s DNA Assembly (OE-PCR). 1: Gen DehR (1068 bp), ensamble TEF1p+ DehR (1480 bp) para OE-PCR (2) y Gibson Assembly (3-4).	38
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reacción de Gibson Assembly Modulo de resistencia HPH (2426 bp): PYK1p (1000 bp) + HPH (1024 bp) + ADH2t (400 bp).	38
Figura 18. Electroforesis en el agarosa 1%. Ensamble de Cluster de integración genómica A: I (3024 bp), B: II (5612 bp) y C: III (5416 bp)	39
Figura 20. Resultados de transformación de <i>S. cerevisiae</i> con la ruta metabólica degradativa del alginato, siembra en antibiótico en diferentes condiciones después de recuperar toda la noche. A: Siembra de 50 uL de cultivo en 200 ug/mL de Higromicina B. B: 50 uL de cultivo y siembra en 150 ug/mL Higromicina B. C: 100 uL de cultivo y siembra en 150 ug/mL de antibiótico. D: precipitado concentrado del cultivo y siembra en 150 ug/mL de antibiótico. Todos observados a los 4 días de incubación.....	43
Figura 21. Micrografía al 100X de <i>S. cerevisiae</i> . A: Cepa nativa S288c (extraído ed UC-DAVIS) B: Clon <i>S. cerevisiae</i> S288-c47.	44
Figura 22. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> transformante Clon 47 con otras cepas de levadura en alginato:glucosa 1:1 (2 g/L). 1: Cepa <i>Saccharomyces bayanus</i> EC1118; 2: Cepa vínica <i>S. cerevisiae</i> LW055 3: Cepa vínica Lalvik K1 ICV; 4: Cepa vínica UVA Ferm WAM; 5: Cepa para fabricación de pan <i>S. cerevisiae</i> Redstar; 6: <i>S. cerevisiae</i> S288c; 7: <i>S. cerevisiae</i> S288c.	45
Figura 23. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> S288c Clon47-pSV-HPH-GAT1. Glucosa 5 g/L y alginato 10 g/L.....	46
Figura 24. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> S288c47 utilizando proporciones de azúcares 1:10 glucosa:alginato (1:10 g/L). Crecimiento en OD600 de cepa nativa (verde) y transformada (amarillo), degradación de alginato de cepa nativa (café) y transformada (naranja).....	47
Figura 25. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> S288c47 utilizando proporciones de azucares glucosa:alginato 1:2 (5:10 g/L). Crecimiento en OD600 de cepa nativa (café) y transformada (amarillo), degradación de alginato de cepa nativa (verde) y transformada (naranja).....	48
Figura 26. Modelo estructural 3D del templado 4GBY, correspondiente a un transportador de D-xilosa en <i>E. coli</i>	55
Figura 27. Modelo estructural 3D del transportador de ácido D-Galacturónico, Peso aproximado 50 kDa.	56
Figura 28. Estructura del templado 4PYP correspondiente al transportador de glucosa en <i>Homo sapiens</i>	56
Figura 29. Molecular Docking entre la estructura 4GBY (verde) y DEHU (rojo). Proyección: OUT. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular...	58
Figura 30. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y DEHU. Proyección: INSIDE. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	59
Figura 31. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y DEHU. Proyección: IN. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	59

Figura 32. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: OUT. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	60
Figura 33. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: INSIDE. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	60
Figura 34. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: IN. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	61
Figura 35. Molecular Docking entre la estructura GAT y DEHU. Proyección: OUT. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	61
Figura 36. Molecular Docking entre la estructura GAT y DEHU. Proyección: IN. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	62
Figura 37. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: IN. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	62
Figura 38. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: INSIDE. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	63
Figura 39. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: OUT. A: vista latera del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.	63
Figura 40. Comportamiento de la espontaneidad en la interacción ligando-transportador de las proteínas MFS 4GBY (templado del transportador xilosa) , 4PYP (templado del transportador glucosa), GAT (estructura del transportador ácido D-galacturónico) y quTD (estructura del transportador ácido D-quínico). 64	64
Figura 41. Análisis de enzima alginato liasa (Aly) recombinante (31 kDa) en <i>S. cerevisiae</i> S288c transformada con pSV-HPH-Oly. M: Pierce prestained protein MW marker (ThermoFischer cat:26612), P1-4: pellet celular, S1-4: sobrenadante.	70
Figura 42. Análisis de enzima Oligoalginato liasa (Oly) recombinante (87 kDa) en <i>S. cerevisiae</i> S288c transformado con pSV-HPH-Oly, purificada por Ni-NTA gravity-flow. M: Pierce prestained proteín MW marker (ThermoFischer cat:26612), L1-3: repeticiones del lisado celular, W1-5: buffer lavado a través de columna, E1-3: buffer elución a través de columna.....	71
Figura 43. Preparacion de enzima ceto-deoxiguconato kinasa (KDGK) recombinante (34 kDa). M: Pierce prestained proteín MW marker (ThermoFischer cat:26612), L1: lisado celular, W1-2: buffer lavado a través de columna, E1-2: buffer elución a través de columna.....	72
Figura 44. Preparacion de enzima ceto-deoxiguconato fosfato aldolasa (KDGPA) recombinante (11 kDa). M: Pierce prestained proteín MW marker (ThermoFischer cat:26612), TC: Lisado celular total L1: proteínas en lisis buffer, W1-4: buffer lavado a través de columna, E1-4: buffer elución a través de columna.	73

Figura 45. Actividad específica de enzimas Aly y Oly producidas en <i>S. cerevisiae</i> S288c con vectore pSV-HPH-Aly y pSV-HPH-Oly en las eluciones de purificación por Ni-NTA gravity Flow.	74
Figura 46. Actividad enzimática de las enzimas KDGK y KDGPA obtenidas desde los transformantes de <i>S. cerevisiae</i> S288c con los vectores pSV-HPH-KDGK y pSV-HPH-KDGPA en eluciones de purificación mediante Ni-NTA gravity Flow.	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los carbohidratos de algas.	5
Tabla 2. Principales empresas y su rol en el procesamiento y valorización de las macroalgas (Roesijadi et al., 2010).	11
Tabla 3. Construcción de módulos de expresión para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , indicando los promotores y terminadores correspondientes para cada gen de la ruta heteróloga degradativa de alginato.	23
Tabla 4. Resumen de fragmentos de ADN generados para integración genómica.	37
Tabla 5. Resultados de colonias transformadas identificados mediante PCR de colonia. .	44
Tabla 6. Energía libre de Gibbs estimada en las posiciones IN, INSIDE y OUT de Molecular Docking. Se muestra el detalle de las tablas de mayor valor presente.	64
Tabla 7. Construcción de vectores episomales obtenidos mediante SureVector y Gibson Assembly	69
Tabla 8. Preparación de cocktail PCR para DNA Polimerasa KOD Hotstart	ANEXO B
Tabla 9. Preparación de cocktail PCR Overlap Extension PCR.	ANEXO B
Tabla 10. Preparación del cocktail PCR para DNA Phusion Polymerase (50 uL).	ANEXO B
Tabla 11. Cocktail PCR para una reacción de PCR Colonia.	ANEXO B

Capítulo I: Producción de combustibles a partir de algas

1. Marco General

El incremento de la demanda en el sector energético ha establecido la necesidad de diversificar la matriz energética mundial, en las cuales las energías renovables como la solar, eólica, geotérmica, biomasa hidrogénica y energía oceánica se encuentran en constante desarrollo y han aumentado hasta alcanzar un 3% del consumo de energía primaria mundial. Por otro lado, el petróleo, el carbón y la energía nuclear conforman el 32.9% de la producción mundial y no han sido capaces de abastecer la demanda total (BP, 2017). Se estima que las economías industrializadas, que contienen el 25% de la población mundial consumen el 75% del abastecimiento de energía global (Dinçer et al., 2014). Se espera que para el año 2050 la demanda de energía primaria aumentará hasta 3 veces (OECD, 2012). Otras consideraciones ambientales como la contaminación, el calentamiento global, precipitaciones ácidas, destrucción forestal y emisiones de sustancias radioactivas también están siendo consideradas al momento de implementar nuevas tecnologías de generación de energía (Dinçer et al., 2014). Las energías renovables han continuado aumentando durante el año 2015 alcanzando un 2,8% de la demanda actual, mientras que la generación de energía a partir de biomasa ha aumentado un 15,2%.

Los biocombustibles son una de las alternativas más importantes para la generación de compuestos de valor energético a partir de diferentes fuentes de biomasa, siendo los más destacables el biodiesel, bioetanol, biobutanol, biometanol, biogás, gas biosintético o Syngas, biocarbón y biohidrógeno (Ndimba et al., 2013). La diversidad de las propiedades y aplicaciones de los diferentes biocombustibles, depende de su origen y fuente de biomasa. El bioetanol por su naturaleza química, proviene de procesos fermentativos que implican la sacarificación de biomasa como la caña de azúcar, sorgo, papa dulce y remolacha (Sudhakar Johnson et al., 2013), como alternativa secundaria residuos lignocelulósicos pretratados como el rastrojo de maíz, álamo y cultivos forrajeros (Blanch et al., 2011; Schmer et al., 2008) los que poseen un rendimiento potencial anual estimado

en $60 \text{ GJ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, además de obtener una reducción de las emisiones de gases de invernadero de un 94% en comparación con los combustibles fósiles (Schmer et al., 2008). Otro combustible en desarrollo es el biodiesel, el cual se genera a través de la transesterificación de lípidos a partir de algas (Malcata, 2011; Parmar et al., 2011) y como segunda alternativa fuentes vegetales como cultivos de *Jatropha*, *Pongamia*, ricino, maravilla, aceite de palma (Johnson et al., 2011), sin embargo aún existen limitantes para aumentar su productividad con enfoque a escalamiento como la falta de información sobre las rutas metabólicas responsables que limitan la implementación de técnicas de ingeniería metabólica, además de otros fenómenos de transferencia de masa que deben ser optimizados como el transporte de CO_2 (Malcata, 2011). Adicionalmente, otros procesos de síntesis química como el SynGas obtenidos a partir de la gasificación también se encuentran en desarrollo (Divakara et al., 2010). Todos estos combustibles se pueden clasificar en primera, segunda y tercera generación según su fuente de biomasa y sus tecnologías implementadas (Lee and Lavoie, 2013). Los primeros provienen principalmente de carbohidratos simples y ramificados provenientes de cosechas como la caña de azúcar, maíz, semillas, cereales, soya y leguminosas, los cuales por su naturaleza tienden a competir con la industria alimentaria, tanto por la materia prima como por la utilización de los suelos, generando diferencias de percepción pública en la sociedad. Por consiguiente, con el fin de mitigar estos conflictos éticos y morales, se establecieron los combustibles de segunda generación a base de residuos lignocelulósicos como residuos de la industria forestal, vitivinícola, y cosecha de especies arbustivas en general (Goh and Lee, 2010), pero estas tecnologías poseen limitaciones en los procesos de pre-tratamiento para la liberación de los carbohidratos disponibles y la generación de subproductos dañinos para el medio ambiente (Pereira, 2003).

Los combustibles de tercera generación proponen el potencial uso de organismos protozoarios y cianobacterias, los cuales se han utilizado desde los años 80's, sin embargo con los inconvenientes de otros combustibles han proliferado nuevos proyectos con el fin de aumentar su rendimiento (Stevenson et al., 1996). El desarrollo de tecnologías para cultivos de microalgas ha propuesto una potencial nueva fuente de biomasa para la producción de biodiesel, la cual no posee los problemas de primer y segunda generación, ya que no requiere tierra para su cultivo, utilización de fertilizantes, ni tampoco requiere el uso mayor de recursos hídricos y no poseen los problemas de conflictos con la industria alimentaria. Sin embargo alguna de las limitaciones se presentan al momento de la implementación, debido a la complejidad de los diseños de fotobioreactores y sus costos

asociados (Brennan and Owende, 2010). Las condiciones estrictas de cultivo, procesos de esterilización, uso de reactores herméticos, sistemas de bombeo y flujo de mayor costo limitan su producción (Barbosa et al., 2003). Otra fuente de biomasa para combustibles de tercera generación son las macroalgas, las que poseen beneficios operacionales en relación a las microalgas, debido a bajas exigencias operacionales para sus cultivos ya que crecen incluso en forma silvestre en terrenos submarinos arenosos, arrecifes de coral y rocosos, no precisan de recursos hídricos y su potencial escalamiento es muy alto considerando que el 70% de la superficie terrestre se encuentra cubierto por agua.

2. Descripción de las macroalgas

Las macroalgas son organismos macroscópicos multicelulares del reino protista, poseen una composición variable de monosacáridos y polisacáridos que constituyen alrededor de un 40 a un 55% de carbohidratos hidrolizables (Dawes et al., 1973). Actualmente se conocen alrededor de 221 especies de uso comercial, de las cuales 145 son utilizadas para la industria alimentaria y 101 para la producción de compuestos aglutinantes (Zemke-white and Ohno, 1999). El mercado alimentario de las macroalgas ha mostrado un incremento de un 10% en los últimos 10 años (McHugh, 2003), esto es principalmente debido a la industria de los hidrocoloides a base de polisacáridos como el agar, alginatos y carragenanos, que marcaron una venta de 86.100 toneladas el año 2009 equivalentes a USD \$1000 millones (Bixler and Porse, 2011). Si se considera la última década, la producción total global es de un valor de 15,7 millones de toneladas métricas, del cual alrededor del 90% del total es producido mediante acuicultura cercano a las costas. Debido a la relevancia de esta industria, se han desarrollado tecnologías desde el mejoramiento de las especies mediante herramientas biotecnológicas, técnicas de procesamiento, e innovaciones de nuevos productos derivados mediante el concepto de biorefinería. Los principales países productores a nivel de acuicultura son China, Filipinas, Indonesia, República de Corea y Japón, mientras que otros importantes productores a partir de cosecha silvestre son Chile, Noruega y la Federación Rusa (Roesijadi et al., 2010). Las especies mayoritariamente cultivadas por acuicultura son *Laminaria Japónica* (4,5 millones de toneladas), *Plantae aquatica* (2,6 millones de toneladas), *Undaria pinnatifida* (2,5 millones de toneladas), *Porphyra tenera* (1,3 millones de toneladas), *Euchema* sp. (1,2 millones de toneladas), y *Gracilaria* spp. (0,9 millones de toneladas), las que representan el 93% de las especies

cultivadas a nivel mundial. Los productos extraídos de las macroalgas siguen siendo el mayor valor de la biomasa, siendo éstos principalmente polisacáridos, agar y carragenanos, y otros compuestos de naturaleza fertilizante (Roesijadi et al., 2008). El valor estimado global de los productos derivados de macroalgas por año reportados al 2003 asciende a \$6 MMUSD.

2.1. Componentes de las macroalgas

Los componentes de las macroalgas pueden variar considerablemente dependiendo de la clase, familia y especie. Por consiguiente, éstas fueron clasificadas por convención según sus características fenotípicas en algas verdes, pardas, y rojas. Las algas verdes y rojas presentan una menor cantidad de glucosa libre (Macartain et al., 2007) y también poseen una menor cantidad de polisacáridos libres (Martone et al., 2009). Las algas verdes, pueden llegar a un contenido de proteínas total de hasta 12,5 – 17% , un 2,8% de lípidos totales y con una gran cantidad de vitaminas A, C y D (Briand and Morand, 1997). Las algas rojas poseen un menor contenido proteico (11,9%), sin embargo poseen otros compuestos de interés como ficobilínicos que les confieren el color rojizo como la ficoeritrina y ficocianina (Contreras-Martel et al., 2007; Paull and Chen, 2008).

La tabla 1 muestra la información sobre los principales tipos de carbohidratos presentes dependiendo de la clasificación de macroalga, donde las algas pardas tienen la mayor cantidad de carbohidratos libres disponibles para ser sacarificados, son de crecimiento rápido y pueden alcanzar tamaños considerablemente mayores (hasta 200 m de largo), y su coloración característica suele ser variable dependiendo de las xantofilas como la fucoxantina y la flavoxantina (Ortiz, 2011).

En Chile la mayor proporción de alga disponible corresponde al tipo de algas pardas, donde predominan las especies *Lessonia trabeculata* y *Macrocystis* spp. Entre Iquique y Coquimbo, *Sacrothalia crispata* y *Gracilaria chilensis* entre Coquimbo y Lebu, y *Mazzaella laminaroides* y *Durvillea antarctica* desde Chiloé hacia el sur. La población más abundante es *Macrocystis*, la cual posee un alto contenido de carbohidratos, donde el principal es el alginato (15-25%), seguido por el manitol (9-30%) y el polímero glicano (5%) (Mckee et al., 1992). Las proporciones de sus carbohidratos variarán dependiendo de las condiciones estacionales y características de terreno submarino.

Tabla 1. Composición de los carbohidratos de algas.

Aspecto	Monosacáridos	Polisacáridos	Referencia
Algas Verdes clorófitas	Ácido gulurónico Ácidos urónicos Glucosa Arabinosa Xilosa Manosa Ramnosa Galactosa	Ulvano Almidón Celulosa	(Abdel-Fattah and Edress, 1972) (Briand and Morand, 1997)
Algas rojas	Agarosa Galactosa Glucosa Acidos urónicos	Carragenina Agar Celulosa Lignina Galactanos	(Msuya and Neori, 2002) (Martone et al., 2009) (Marck, 1984)
Algas pardas	Manitol Galactosa Fucosa Glucosa Xilosa Uronato Manuronato Guluronato Glucuronato	Alginato Fucoídano Glucano Laminarina	(Jang et al., 2012) (Chakraborty and Santra, 2008) (Silva and Kumar, 1988)

3. Carbohidratos hidrolizables de las algas pardas

Los principales carbohidratos hidrolizables presentes en las algas pardas son el alginato y el manitol, cuyas cantidades varían según las condiciones de cultivo, además de las características fisicoquímicas del agua (Gutierrez et al., 2006).

El manitol es un poliol encontrado en la naturaleza disponible altamente en plantas y en algas se postula que posee un rol regulador del potencial osmótico e hídrico de su fisiología (Germany et al., 1985). Todas sus propiedades antioxidantes e hídricas, se utiliza como alimento y en la producción de cosméticos (Zubia et al., 2008). Además, gracias a la capacidad de formación de enlaces en su conformación zig-zag plana posee propiedades quelantes y edulcorantes (Linder and Lichtenthaler, 1981).

El alginato es un polisacárido aniónico lineal que se encuentra formado por ácido β -D-Manurónico (M) y α -D-gulurónico (G), ambos epímeros en el carbono 5 de la estructura química. Por lo tanto éstos difieren en la orientación del grupo carboxilo que se encuentra orientado hacia afuera y hacia adentro del plano en M y G correspondientemente (Gacesa, 1988). El polímero de alginato puede estar organizado en 3 formas diferentes, como bloques homopoliméricos G-G (figura 1. B), bloques homopoliméricos M-M (figura 1.A) y bloques heteropoliméricos G/M arreglados en una secuencia aleatoria. A pesar que algunos alginatos poseen prioritariamente alguno de éstos bloques, todos están presentes en una macromolécula de alginato (Wong et al., 2000).

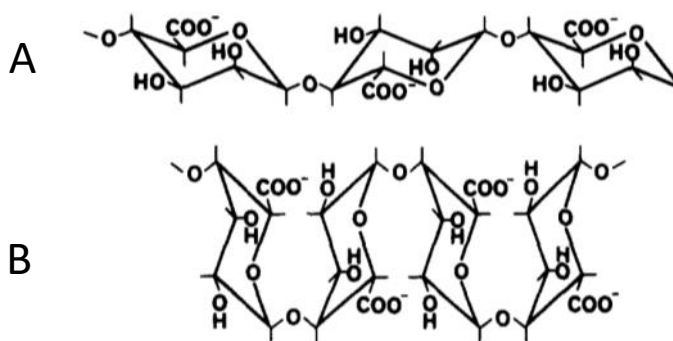


Figura 1. Conformaciones de los bloques de M-M (A) y G-G (B).

Los enlaces glicosídicos del tipo β -1-O-4 se forman aleatoriamente entre cada monómero para formar diversos dímeros de ácidos urónicos, que al formar el polímero puede dar diversas estructuras moleculares tridimensionales. El tamaño de la molécula y el contenido G/M del polímero se atribuyen propiedades gelficantes y de viscosidad, dado que los dímeros G-G pueden interaccionar con iones de calcio para formar bucles en la cadenas algínica como se muestra en la figura 2. Esto se conoce como el modelo de caja de huevos de las estructuras de alginato, y está relacionada la interacción con iones bivalentes de Ca^{+2} que se unen a la electronegatividad de los grupos carbonilo. Los polímeros M-M también le dan propiedades a la molécula formando una conformación extendida lineal de “cinta” y G-M le da un conformación de “loop” a el polisacárido Figura 2. Además (Wong et al., 2000) establece que la viscosidad de una solución de alginato depende del tamaño molecular de las cadenas presentes.

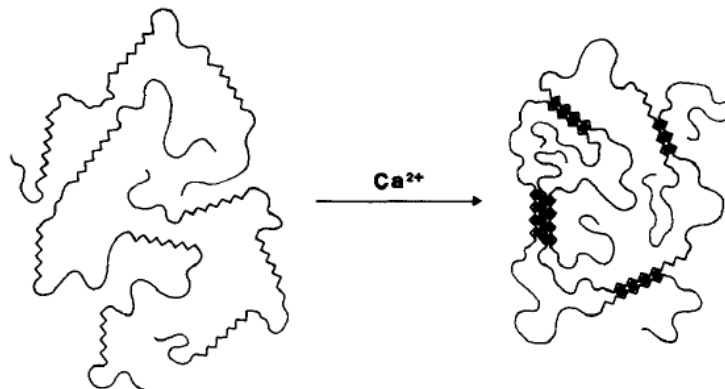


Figura 2 Bloques de poli-guluronato en interacción con iones de calcio (Gacesa, 1988).

4. El polímero de alginato y sus enzimas degradadoras

Dada la complejidad de éste polímero, existen muchos tipos de enzimas degradativas de alginato de diversas fuentes biológicas incluyendo algas marinas (*Pelvetia canaliculata* y *Undaria pinnatifida*), moluscos (*Littorina spp.*, *Haliotis spp.* Y *Tubo cornutus*) y microorganismos marinos (*Alcaligenes agualitis*, *P. aeruginosa*, *Pseudoalteromonas*, *Sphingomonas sp.*, *Asteromyces cruciatus*) (Miyake et al., 2003; Schaumann and Weide, 1990; Wong et al., 2000). Cabe mencionar que dependiente de la naturaleza de la enzima

y las condiciones de pH, temperatura, concentración de sales e iones de calcio a la que se encuentran las enzimas poseen diversos grados de actividad catalítica y selectividad por los dímeros de G- G, M-M y G/M como sustrato (Kim et al., 2011). Existen enzimas que degradan inicialmente el polímero de alginato de manera endolítica, rompiendo enlaces β -1,4 entre M y G, las que son denominadas alginato liasas (Huang et al., 2013). La siguiente enzima permite la degradación de los pequeños oligómeros de ácidos urónicos, desde dímeros hasta hexámeros de alginato, denominadas oligoalginato liasa (Ryu and Lee, 2011). La Figura 3 muestra la forma en que las enzimas alginato y oligoalginato liasa degradan progresivamente las cadenas de ácidos urónicos, de forma que las diferentes enzimas cortan endolíticamente el polímero para dejar oligómeros que serán degradados por las enzimas oligoalginato liasa. Posteriormente los monómeros insaturados cambian espontáneamente su conformación a ácido 4-deoxi-L-eritro-5-hexoseulosa urónico (DEHU). Debido a una gran variedad de enzimas degradadora de alginato, éstas han sido clasificadas en 7 familias dentro de las polisacárido liasas (PLs, EC 4.2.2.-). PL-5, -6, -7, -14, -15, -17 y -18 se encuentran en la base de datos Carbohydrate Active enZYme disponible en www.cazy.org (Garron and Cygler, 2010).

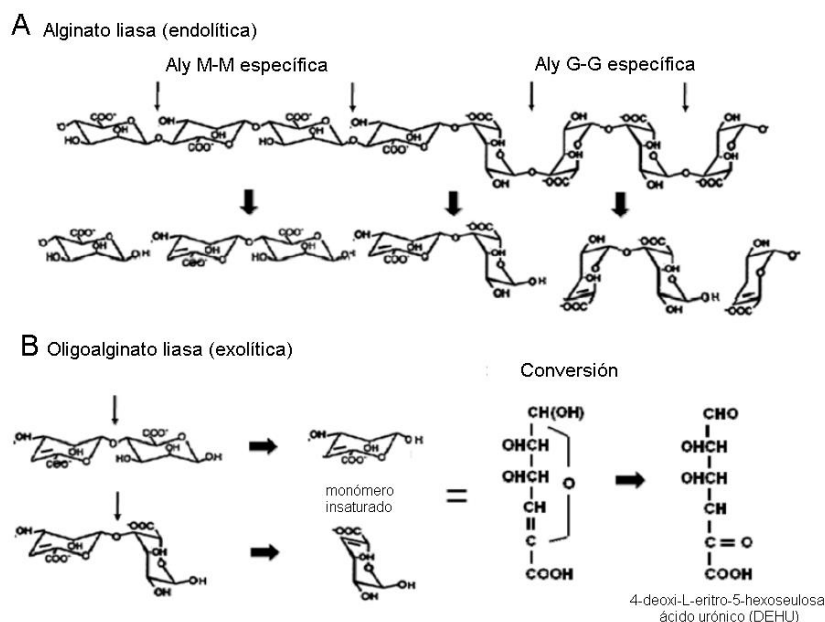


Figura 3 Mecanismo general de degradación de enzimas alginato liasa (endolítica) y oligoalginato liasa (exolítica) (Kim et al., 2011).

5. Producción de combustibles a partir de macroalgas

La producción de biocombustibles a partir de algas ha comenzado a generar mayor interés en los países que son los principales productores de macroalgas, como China, Chile, Indonesia, República de Korea y Taiwan (USDA, 2012; USDA, 2017). En el sector energético, el mayor interés se centra en la utilización de los carbohidratos hidrolizables en algas los cuales mediante procesos de fermentación permiten obtener alcoholes de uso industrial. Esta fuente de biomasa aún se encuentra en desarrollo, de formas que se están implementando nuevas técnicas para aumentar el rendimiento y productividad, considerando sus aspectos positivos de no requerir terrenos fértiles, recursos hídricos ni agroquímicos para el control de malezas. El potencial de generación de etanol a partir de biomasa macroalgal se ha evaluado a pequeña escala, desde el cultivo de algas costeras para la producción de gas y etanol (Goh and Lee, 2010).

La Tabla N°2 muestra las principales empresas desarrolladoras de tecnologías tanto en la generación de nuevos métodos de cultivo intensivo de macroalgas, como también en procesos de hidrólisis, sacarificación y fermentación para la generación de productos, principalmente etanol (Roesijadi et al., 2008; Roesijadi et al., 2010). Las principales empresas enfocadas en la generación de biocombustibles se dedican principalmente al bioetanol, biobutanol, y sus derivados. Dentro de las empresas más destacables, empresas como BioArchitecture Labs (BAL) Chile, se han dedicado a buscar alternativas para la sacarificación y fermentación de los carbohidratos disponibles de las algas pardas, principalmente alginato y manitol. Alternativamente se han evaluado diversas estrategias para la valorización de esta fuente de biomasa, dentro de las cuales destacan las empresas Lab-Statoil y BAL que han estudiado por su parte el cultivo de algas en las costas para su posterior cosecha y fermentación en biorreactores.

Actualmente la generación de combustibles a partir de algas posee dos aristas principales en las que se deben desarrollar nuevas tecnologías; i) la necesidad de optimizar la producción de algas pardas en las costas de Chile mediante técnicas de cultivo controlado, ii) estudiar las alternativas de sacarificación y fermentación disponibles para obtener alcoholes y otros derivados a partir de las algas. En el primer punto, se han desarrollado técnicas de cultivo de macroalgas utilizando lazos inoculados con semillas, que son suspendidos de forma horizontal con el objetivo de aumentar la superficie de contacto y la capacidad de fotosíntesis cercano a la superficie. Con estas técnicas han logrado tener una

producción de 14,4 kg por metro de cuerda instalada, del cual un 70% puede ser utilizado como materia prima para la industria alimentaria, mientras que el otro 30% alimentación para cultivos de abalón y también para industria de los fertilizantes orgánicos (Gutierrez et al., 2006). Respecto al segundo punto se están evaluando alternativas para hidrólisis de los carbohidratos presentes en algas mediante pre-tratamientos de la biomasa.

Los primeros desarrollos tecnológicos surgen desde los tiempos de la primera guerra mundial, en la cual se enfocaban en la generación de butanol a partir del hidrolizado de alga en grandes tanques de fermentación, donde un ejemplo es la planta Hercules Powder Co.'s que con sus tanques digestivos de un total de 400,000 galones de capacidad se enfocaban en la producción de carbonato de sodio, y procesos de fermentación aerobia de 40 días se obtenía ácidos orgánicos como acético, butírico, propiónico y posterior cristalización de sales. Este proceso se extendió a lo largo de otros países para incrementar la producción de acetona y butanol para su uso como combustible y materias primas para la fabricación de explosivos (Neushul, 1989). Posterior a la primera guerra mundial, el cese de las restricciones en recursos fósiles detuvo la producción de las plantas a partir de algas pardas. Sólo algunos países continuaron con la producción para propósitos de investigación y generación de metano, dado que su potencial de generación registra rendimientos superiores a otro tipos. Se han estudiado los procesos de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis en consorcios microbianos y se han evaluado según el componente nutricional de las algas pardas (Chynoweth, 2002). Las limitantes planteadas del uso de la biomasa macroalgal para la generación de biometano radican en la falta de información respecto a la composición nutricional para cada uno de los procesos biológicos involucrados, además que para la biomasa proyectada para escalamiento no se han realizado estudios preliminares de abastecimiento y efectos ambientales en cultivo intensivo de macroalgas, lo cual aún se encuentra en estudio. Adicionalmente, no se han probado a mayor escala las tecnologías de extracción y purificación (upgrading) de biometano a partir de este fuente de biomasa (Roesijadi et al., 2008).

Tabla 2. Principales empresas y su rol en el procesamiento y valorización de las macroalgas (Roesijadi et al., 2010).

Empresa	Actividad	Referencia
Seaweed Energy Solutions	Cultivo de algas costeras, producción de gas y etanol	Bakken, 2016
Green Gold Algae and Seaweed Sciences, Inc.	Cultivo de algas en piscinas, producción de etanol	Letcher and Scott, 2015
Dupont: Butamax Advance Fuels; Bioarchitecture Labs (BAL)	Cultivo en costas, producción de etanol y butanol	Schuert et al, 2017
Lab-Statoil	Producción Butanol	Dahlborn et al 2011
Seamiotic Ltd.	Cultivo de algas en piscinas y fijación y consumo de CO ₂	Phelan, 2008
Oil Fox	Biodiesel de algas	Martin et al, 2008
Blue Sun Energy	Producción de combustibles de alta potencia (jet fuel) a partir de etanol y butanol	BSE, 2013
Holmfjord AS	Biocombustibles a partir de algas	Meland & Rebours, 2012

6. El género *Saccharomyces*

El género *Saccharomyces* se ha caracterizado por ser un microorganismo altamente estudiado, y existe una gran cantidad de información en relación a su genoma, transcriptoma y proteoma (Goffeau et al., 1996; Griffin, 2002; Nagalakshmi et al., 2008; Sickmann et al., 2003). Se utiliza en la industria para muchos procesos fermentativos como la producción de pan, vino y cerveza y se encuentra reconocido como un organismo seguro por la FDA, mediante el protocolo GRAS (www.fda.gov). *Saccharomyces* posee propiedades sobresalientes de adaptabilidad a condiciones dinámicas, y por esto es muy utilizada en muchos procesos industriales. La naturaleza de esto radica en su gran capacidad de cambiar su ploidía, donde frecuentes eventos mutacionales cromosómicos pueden ocurrir en su genoma bajo condiciones de estrés, promoviendo una adaptación a condiciones dinámicas (Mayer and Aguilera, 1990; Spalding and Tuite, 1989). Es por esto que se han realizado muchos estudios para profundizar el entendimiento de su adaptación, con lo cual se han identificado los genes más relevantes para la adaptación de genes como shock térmico, shock de frío, radiación UV, esporulación, segregación cromosomal meiótica, distribución y tráfico de las vacuolas, almacenamiento de glicógeno, privación de nitrógeno, entre otros, los cuales se han utilizado para la obtención de cepas con nuevas características de interés (Scherens and Goffeau, 2004).

Respecto a las cepas productoras de alcoholes, la mayoría de ellas se encuentran adaptadas para la producción de etanol en altas concentraciones, entre las que podemos encontrar las cepas CAT1 (Basso et al., 2010), PE-2 (Argueso et al., 2009), JP1 (Reis et al., 2012), CEN.PK1137D (Paciello et al., 2014), UVNR56 (Thammasittirong et al., 2013), entre otras que poseen adaptaciones mediante diversas técnicas de ingeniería genética como recombinación heteróloga, mutagénesis UV, selección asistida por marcadores y evolución adaptativa (ver anexo D). Aun no es posible comprender completamente el mecanismo de tolerancia a alcoholes, pero algunas aproximaciones han señalado que está relacionado con la estructura y contenido de los ácidos grasos como el ácido oleico y palmitoleico (You et al., 2003), la regulación del potencial electroquímico aumentando la concentración de protones $[H^+]$ y K en cepas de *Saccharomyces* transformadas, que pueden llegar hasta 90 g/L de etanol en medios de hasta 300 g/L de glucosa (Felix et al., 2014).

Respecto a estudios de ingeniería metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* para la implementación de diferentes fuentes de biomasa, se ha construido una ruta heteróloga para la degradación de celulosa utilizando enzimas del tipo endoglucanasa obtenidas de hongos filamentosos, alcanzando una producción de 180 g/L, alcanzando concentraciones muy superiores a las cepas vínicas tolerantes como EC-1118 (Lallemand®). Sin embargo, el inconveniente de este método de fermentación es la necesidad obligatoria de realizar agresivos pretratamientos para liberar la celulosa presente en la biomasa lignocelulósica, lo cual puede ser una limitante para estas alternativas.

7. Establecimiento de una ruta metabólica degradativa de alginato

Para el establecimiento de una ruta metabólica es necesario comprender las etapas requeridas para transformar el polisacárido en moléculas orgánicas que puedan ser integradas al metabolismo. Las etapas son: i) depolimerización del alginato, ii) transporte de los ácidos urónicos, y iii) integración al metabolismo basal mediante la bioconversión a ácido pirúvico. De esta forma, la Figura 4 muestra cómo es posible plantear una ruta degradativa de alginato tanto en organismo eucarionte como procarionte. Luego de la degradación del polímero detallada en capítulos anteriores, los ácidos urónicos deben ser transportados mediante una proteína de membrana que idealmente no genere un gasto de energía. El DEHU es metabolizado en el medio intracelular, lo que involucra una reducción para formar cetodeoxigluconato (KDG), y luego una fosforilación para formar cetodeoxigluconato fosfato. Finalmente, una enzima del tipo aldolasa genera una ruptura del grupo aldol para formar un gliceraldehído y piruvato, los cuales sin integrados a metabolismo. Por lo tanto es necesario considerar el gasto de ATP y la generación de poder reductor, ya que puede afectar el balance redox celular y el rendimiento (Contador et al., 2015; Enquist-Newman et al., 2014).

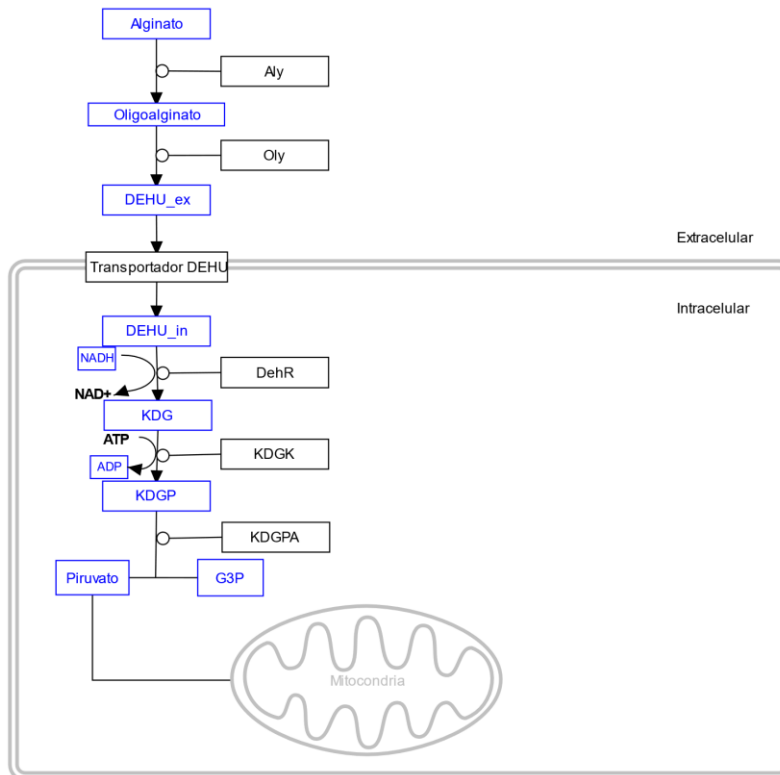


Figura 4. Ruta degradativa de alginato. Las enzimas que participan en la ruta son alginato liasa (Aly), oligoalginato liasa (Oly), DEHU reductasa (DehR), KDG quinasa (KDGK), KDGP aldolasa (KDGPA).

Los primeros hallazgos para la una ruta degradativa de alginato en una cepa de *E. coli*, en la cual estudiaron la forma de expresar los genes presentes en el metabolismo de *Vibrio splendidus* 12B01, donde se identificó un cluster que mediante ensayos con mutantes los genes responsables de la degradación de alginato. Una vez identificada la ruta se implementaron los genes mínimos para construir una cepa con las enzimas alginato liasa, oligoalginato liasa y un transportador putativo simporte de sodio/soluto. El resto de los genes necesarios para la bioconversión de alginato a piruvato ya se encuentran presentes en *E. coli*, correspondientes a la ruta de Entner-Doudoroff para la formación de ceto-deoxi fosfogluconato (Wargacki et al., 2012). Para la eficiente degradación del polímero es necesario establecer un mecanismo de excreción de las enzimas alginato liasas y/o oligoalginato liasas, por lo que se estableció la expresión mediante los péptidos señal de translocación Ag43 α y Ag43 β , evidenciando actividad de 1000 U/L de enzima en el medio extracelular, permitiendo obtener un rendimiento de un consumo de hasta 20 g/L de alginato de sodio.

Estudios posteriores para establecer una ruta degradativa de alginato se enfocaron en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su capacidad de mayor tolerancia a alcoholes. Para esto, el principal desafío establecer un mecanismo de transporte de ácidos urónicos en levadura, para lo cual se identificaron transportadores purativos en el hongo marino *Asteromyces cruciatus*, lo cuales se expresaron en *Saccharomyces* revelando crecimiento en ácidos urónicos. Para esto fue necesario realizar otras modificaciones al metabolismo de levadura, que consistió en integrar la ruta de Entner-Doudoroff a través de la generación de un constructo que contiene módulo de expresión usando promotores constitutivos de levadura y los marcos de lectura optimizados ésta, provenientes de *Oceanicola granulosus* HTCC2516 (Oligoalginato liasas), *Sphingomonas sp.* (DEHU reductasa), *E. coli* (KDG quinasa) *Vibrio splendidus* (KDGP aldolasa) (Enquist-Newman et al., 2014). Estos módulos de expresión fueron generados en vectores episomales para la posterior obtención de cepas recombinantes, tanto para la expresión de los diferentes marcos de lectura correspondientes a presuntos transportadores de ácidos urónicos, como también los módulos de la ruta de asimilación. Esta estrategia puede tener inconvenientes al momento de realizar estudios posteriores de rendimiento de producción de escababilidad, debido a los fenómenos de pérdida de plásmido y de división asimétrica, que podrían afectar la estabilidad de la producción (Gupta and Mukherjee, 2001). Por lo tanto, los rendimiento obtenidos mediante la inserción de esta ruta poseen los siguientes factores limitantes: i) el mecanismo de transformación no es estable en el tiempo, lo cual requeriría el uso constante de un marcador de selección para mantener la población, ii) el crecimiento del microorganismo se encuentra limitado a la disponibilidad de alginato degradado en solución, ya que ésta no dispone de la capacidad de degradar el polímero, iii) las enzimas para el establecimiento de la ruta de Entner-Doudoroff no se han estudiado en detalle para la expresión en *Saccharomyces*.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo de tesis es establecer una ruta degradadora de alginato de sodio en *S. cerevisiae*, con lo cual el trabajo se ha dividido en los siguientes objetivos específicos; i) Construir módulos de expresión para *S. cerevisiae* en S288c, ii) Construir un cluster de genes heterólogos con la ruta degradadora completa, iii) Obtener una cepa recombinante e iv) identificar la presencia de las enzimas expresadas en *S. cerevisiae*.

Capítulo II: Ingeniería metabólica en *S. cerevisiae*

1. Diseño de una ruta heteróloga degradativa de alginato de sodio

Para el diseño de una ruta heteróloga de alginato es necesario considerar todas las reacciones requeridas para la ruta metabólica, comprendiendo la estequiometría de ésta. El principal componente a considerar es la selección de las enzimas del tipo alginato liasa y oligoalginato liasa. Posteriormente es necesario disponer de un mecanismo de transporte eficiente hacia el interior de la célula de los monómeros de ácidos urónicos para finalmente ser convertido en un compuesto que pueda ser integrado al metabolismo basal.

Las enzimas del tipo alginato liasas se encuentran en una gran variedad de organismos y poseen diversas propiedades, según lo especificado en el capítulo anterior. En esta sección es necesario considerar que las enzimas seleccionadas deben cumplir en lo preferente con los siguientes criterios: i) deben tener actividad degradativa aceptable, ii) deben funcionar correctamente a las condiciones de cultivo de *Saccharomyces*, iii) deben poseer en lo ideal la capacidad para romper ambos tipos de enlaces correspondientes a homopolímero MM, GG y G/M. Para esto es necesario realizar una búsqueda de las diversas enzimas y sus propiedades cinéticas. De las enzimas disponibles en la literatura se han evaluado los diferentes tipos de fuentes biológicas, dentro de las cuales destacan las enzimas provenientes de los moluscos, en especial las presentes en el abalón (*Haliotis rufescens* y *Haliotis discus hannai*). La mayoría de las enzimas identificadas están presentes naturalmente en las glándulas digestivas heptopancreas. Estas enzimas son endo y exolíticas y poseen un pH óptimo de 5.6 a 9.6, pero también existen algunas adaptaciones puntuales a pH 4. Por otro lado las enzimas deben adaptarse a las condiciones del ambiente natural de las algas, ya que deben ser liberadas al medio extracelular para poder depolimerizar el alginato. Las condiciones en el medio natural con altas concentraciones de sales, en algunos casos altas concentraciones de calcio en las zonas ricas en homopolímeros de guluronato, y tolerar amplios rangos de pH.

Algunas de las enzimas que poseen estas características se han identificado como Aly-SP1 y Aly-SP2 desde *Tubo cornutus* tolerantes a altas concentraciones de sodio y de calcio, Alg-L desde *Littorina sp.* Tolerante a altas concentraciones de metales como cobalto, Bario y magnesio, alginasa I y II aislado de *Haliotis rufescens* y *Haliotis tuberculata*

correspondientemente, tolerantes a altas concentraciones de sodio, manganeso y potasio. Otro aspecto importante es su amplia selectividad sin afectar significativamente su actividad enzimática, de tal manera que posee una actividad liasa superior al promedio y que además pueda cortar enlaces de tipo M-M, G-G y G/M (Wong et al., 2000). Dentro de éste aspecto las enzimas provenientes del género *Haliotis* son atractivas por su versatilidad degradativa ante los diferentes enlaces del polímero, dentro de las cuales se destacan las enzimas HdAlex y Hdaly, que poseen una capacidad de degradar homopolímeros como heteropolímeros de guluronato y manuronato (Suzuki et al., 2006).

Para la construcción de la ruta de Entner Doudoroff se requieren las enzimas cetodeoxiglucuronato quinasa (KDGK) cetodeoxiglucuronato fosfato aldolasa (KDGPA), mediante las cuales es posible generar piruvato a partir de los ácidos urónicos provenientes el alginato. La actividad de éstas enzimas puede variar dependiendo de la capacidad de expresión, ensamble, y adición de grupos prostéticos correspondientes a las enzimas. Bajo este contexto es necesario mencionar que las enzimas KDGPA poseen una estructura en la cual forma complejos tetraédricos de hierro sulfuro [Fe-S] que son necesarios para la generación de enzimas activas. Se han probado anteriormente enzimas del tipo KDGPA provenientes de *E. coli*, que han demostrado tener inconvenientes en su activación de correcto acoplamiento con sus grupos prostéticos, de tal medida que es necesario buscar otras enzimas que puedan mitigar esta desventaja que se transforma en un cuello de botella en la ruta metabólica (Benisch and Boles, 2014). La enzima KDGPA de *B. subtilis*, es de especial interés debido a que ha reportado una mayor actividad y selectividad con los sustratos cetodeoxiglucuronato fosfato (KDGP) y fructosa 1,5 bifosfato (FBP), de los cuales se desprende que siendo una de las enzimas clave en las ruta de EDP podría aumentar la capacidad de bioconversión (Fonvielle et al., 2004; Ujita and Kimura, 1982).

2. Búsqueda de transportadores de ácidos urónicos

2.1. La familia de los transportadores Mayor Facilitator Superfamily (MFS)

Para la identificación de transportadores de ácidos urónicos se realizó una búsqueda bibliográfica de los organismos que naturalmente degradan alginato, y que pudiesen ser cercanos filogenéticamente a levadura. En *Saccharomyces cerevisiae* existen transportadores de membrana que juegan un rol crucial en las funciones de asimilación de nutrientes, bombas de eflujo para detoxificación de componentes, y detección de sustancias extracelulares con propiedades nutricionales. Dentro de las familias mas

importantes de transportadores que se han caracterizado en levadura corresponden a los facilitadores mayores de la superfamilia (Transportadores MFS), los cuales la mayoría están relacionados con la multiresistencia a diversas drogas. En esta familia existen muchos transportares que pueden ser inespecíficos para diversas moléculas, además se tener umbrales de activación según las concentraciones extracelulares.

2.2. Transportadores de la familia hexoquinasa (HXT's)

Los tranportadores HXT correspondientes a variantes de transportadores de glucosa son controlados por la presencia sustrato en el medio extracelular, de tal manera que a medida que incrementa la concentración algunos se van regulando negativamente y otros de forma positiva. Sobre altas concentraciones de glucosa se expresa el transportador HXT1 (200 mM), mientras que a bajas concentraciones se expresan principalmente HXT2, HXT3 y HXT4 los que complementan la actividad de transporte de azúcares (Ozcan et al., 1998; Ozcan and Johnston, 1995). Muchos de los transportadores poseen distinta especificidad por los sustratos, lo que se ha demostrado en experimentos con diferentes concentraciones de glucosa un *S. cerevisiae* puede expresar genes codificantes para transportadores HXT que poseen afinidad a diferentes concentraciones. Otra consideración relevante de referente a los transportadores del tipo permeasa es que los de baja especificidad, que son comúnmente llamados transportadores promiscuos, pueden tener afinidad por otros azúcares, no han sido registrados. Este es el caso de los transportadores de maltosa Mal61p, que también son capaces de transportar glucosa en condiciones de carencia de nutrientes.

Además, estudios en *Saccharomyces cerevisiae* han evidenciado cambios en la carga cromosómica en condiciones de estrés, lo que permite aumentar la adaptabilidad mediante un aumento del número de copias de los genes fundamentales para la sobrevivencia, como también otros estímulos han evidenciado la disminución de la expresión transcripcional de tranportadores de la familia HXT de asimilación de glucosa, la cual se ha recuperado luego de unas generaciones debido a la capacidad de los sensores de glucosa quienes influyen en procesos de duplicaciones y aumento de la dosis génica de transportadores (Wieczorke et al., 1999).

2.3. Transporte de DEHU en *S. cerevisiae*

En el caso del transporte de ácidos urónicos en *Saccharomyces*, se han identificado transportadores inespecíficos que permiten la entrada de ácido galacturónico y otros ácidos de naturaleza parecida (Benz et al., 2014). Estos compuestos no pueden ser metabolizados por levadura, pero sí otros hongos filamentosos por la presencia de transportadores que permiten la entrada de ácidos urónicos. Estudios previos han demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* posee la capacidad para asimilar ácido D-galacturónico hasta una concentración intracelular de 45 mM, la cual es dependiente de pH (Souffriau et al., 2012). Por otro lado, muchos de los azúcares que pueden entrar al medio intracelular de forma inespecífica, y si es que no son metabolizados pueden provocar incrementos de concentración de hasta alcanzar niveles de toxicidad, los que según su naturaleza pueden afectar el pH intracelular e inhibir la asimilación de otros nutrientes, por competición por la entrada (Leandro et al., 2009). Algunos experimentos de fermentación de galactosa, xilosa, y arabinosa en levaduras mutantes han mostrado inhibición en la asimilación de glucosa en presencia de ácido D-galacturónico mediante la regulación de Galp2, generando un incremento de los recursos energéticos para mantener la homeostasis. De esta forma la acumulación de el ácido galacturónico-1-fosfato puede producir inhibición del transportador por retroalimentación (Huisjes et al., 2012).

Los transportadores inespecíficos presentes en levadura podrían permitir la entrada de ácidos urónicos en forma inespecífica, pero de todas formas no serían asimilados, dado que levadura no posee la capacidad para transformarlos en compuestos que puedan ser convertidos por el metabolismo para generar energía. De esta forma la capacidad de asimilar carbohidratos no depende sólo la presencia de algún transportador que permita la entrada al medio intracelular, sino también enzimas que permitan convertir éstos metabolitos e integrarlos como fuente de carbono para la generación de ATP.

De la familia de los transportadores del tipo hexoquinasas (HXT), autores han reportado que HXT6 y HXT7 tienen importantes actividades con fuentes de carbono no fermentables por la levadura, como glicerol y etanol, maltosa y galactosa (Leandro et al., 2009). Por otro lado, estudios en otros hongos levaduriformes han demostrado transporte de algunos gluconatos, ya que si bien no se ha evidenciado transporte de ácidos urónicos, es posible que el metabolito siguiente en la ruta degradativa pueda entrar al medio intracelular por transportadores del tipo *Ght3*, *Ght5-6*, los cuales mediante el sistema antiporte $[H^+]$ han reportado ser de apoyo en el caso de los microorganismos que se encuentran en bajas

concentraciones de glucosa (Leandro et al., 2009). Estudios en *S. pombe* han mostrado que el transporte de D-gluconato ocurre a través de éste tipo de transportadores, y complementan el crecimiento en glucosa y fructosa en mutantes de *S. cerevisiae* deficientes de transporte para hexosas (Heiland et al., 2000). Esto muestra que algunas especies de levaduras asimilan gluconatos, utilizando al menos una mezcla de gluconato con una cantidad mínima de glucosa o fructosa como fuente de carbono.

2.4. Transporte de compuestos similares a DEHU en *S. cerevisiae*

En caso particular del alginato, es necesario considerar que el deoxi-gluconato podría ser metabolizado por mecanismos similares, pero para esto será necesario interconvertir los ácidos urónicos en el medio intracelular. Por esto es imperativo buscar algún transportador eficiente de ácidos urónicos. En trabajos previos se ha identificado el transporte de DEHU en el hongo *Asteromyces cruciatus*, en el cual han reportado una eficiente degradación de alginato y asimilación de sus monómeros, en el cual se han propuesto mecanismos especializados de transporte que no han sido detallados (Schaumann and Weide, 1990; Schaumann and Weide, 1995). Estudios posteriores han analizado mediante genómica funcional la capacidad asimilatoria de *A. cruciatus* con ensayos de crecimiento en alginato y análisis de expresión mediante RNAseq, de los cuales han identificado algunos marcos de lectura putativos que sugieren ser transportadores de ácidos urónicos. Muchos de ellos poseen similitudes con transportadores conocidos de otros hongos para moléculas que poseen similitud química y estructural con los ácidos urónicos como ácido quínico y monómeros derivados de las pectinas. De esto se probó la capacidad de expresión de algunos de estos marcos de lectura en *S. cerevisiae* en recombinantes, identificando la capacidad asimilatoria para al menos dos transportadores putativos (Enquist-Newman et al., 2014). Una de las limitaciones de este trabajo, es que no se evaluó la capacidad asimilatoria del transporte y el mecanismo específico de transporte del marco de lectura, estructura del transportador y procesamiento post-traduccionales que pudiese ocurrir dentro del sistema de expresión heterólogo.

Otros estudios análogos se han enfocado en la búsqueda de transportadores de ácido galacturónico, el monómero más abundante en la biomasa rica en pectinas, como los residuos de la industria de los cítricos (Benz et al., 2014). En este estudio se analizó la

capacidad natural del hongo filamentoso esporulador *Neurospora crassa* para degradar sustancias pécticas, en el cual se han identificado dos marcos de lectura principales que sugieren la capacidad de asimilación por parte del hongo. Estos ORF deletados en el hongo, demostrando la pérdida de la capacidad de asimilación de ácido D-galacturónico, y posteriormente expresados en vectores episomales en *S. cerevisiae*, con lo cual se ha habilitado la capacidad de asimilación de galacturonato. Estos estudios no sólo demuestran que el transportador es específico y fundamental para la asimilación, sino que también es posible expresarlo de forma funcional en el organismo modelo *S. cerevisiae*. Estos antecedentes han contribuido a la búsqueda de algún transportador de la familia MFS para uronatos, y que pueda ser eficientemente expresado en *S. cerevisiae*, y abrió una oportunidad para la búsqueda de transportadores en otros organismos que pudiesen tener ortología o bien analogía funcional.

Otro elemento de interés que se ha caracterizado en los últimos años es la porina KdgM, la cual potencia la capacidad de transporte de oligómeros de ácidos urónicos, la cual es selectiva por aniones y por tener inhibición por retroalimentación de trímeros de uronatos. Estudios posteriores la han caracterizado como fundamental para mantener la patogenicidad de *E. chrysanthemi*, y otras especies que poseen transportadores análogos como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas syringae*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium* y *paratyphimurium*. Esto sugiere que dichos mecanismos de transporte se encuentran fuertemente ligados al desarrollo de crecimiento y a la capacidad generadora de patogenicidad según la densidad poblacional de los microorganismos.

Todos estos hallazgos anteriormente mencionados no sugieren necesariamente que pudiese existir una forma de transporte de ácidos urónicos en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que sí se ha establecido es que no es metabolizable, y no se han realizado pruebas de asimilación en cepas nativas. Un estudio reciente ha sugerido la presencia de transportadores inespecíficos de baja afinidad presentes en levadura, que permiten la asimilación dependiendo del pH de ácido D-galacturónico hacia el medio intracelular (Huisjes et al., 2012). Sin embargo, debido a la incapacidad de metabolizarlo el transporte es reversible alcanzando el equilibrio de concentraciones intra y extracelular hasta 1,5 M (Souffriau et al., 2012). Este fenómeno observado indica que es necesario establecer un mecanismo eficiente de transporte de ácidos urónicos en *S. cerevisiae*, considerando un sistema de transporte específico y que la transformación de éstos a nivel intracelular pueda ser eficiente a mayores concentraciones de sustrato. En orden de demostrar la capacidad

fermentativa de ácidos urónicos en *Saccharomyces*, estudios en cepas recombinantes corroboran la capacidad para poder metabolizar el ácido D-galacturónico en fermentaciones de hidrolizados de pectina (Benz et al., 2014).

Todos estos antecedentes indican que es necesario la búsqueda de nuevos transportadores ácidos urónicos que permitan de forma eficiente establecer de ruta degradadora de alginato, además de requerir la construcción de la ruta de Enter-Doudoroff.

3. Metodología

3.1. Construcción de Módulos de expresión mediante DNA Assembly OE-PCR

Para la construcción de los módulos se realizó la generación de unidades transcripcionales de expresión constitutivas, mediante la implementación de promotores y terminadores previamente utilizados para la expresión de enzimas heterólogas en *S. cerevisiae* y que han demostrado tener altos niveles de expresión de proteína recombinante en (Shao et al., 2009). De esta forma, la Tabla 3 muestra el diseño de la construcción de los módulos de expresión para la ruta heteróloga. Se considera el promotor constitutivo del gen de la enzima fosfogluconato kinasa (PGK1p), y el terminador del gen alcohol dehidrogenasa 1 (ADH1t), para una enzima alginato liasa anteriormente descrita de *H. rufescens* con optimización de codones. Posteriormente el módulo para expresar la enzima oligoalginato liasa se construye con los promotores del gen piruvato quinasa (PYK1p) y terminador correspondiente a citocromo oxidasa (CYC1t). Respecto al transportador, se ha seleccionado el gen qUTD que codifica para un transportador de ácido quínico que se transcriba con el promotor de piruvato quinasa (PYK1p) y terminador de alcohol dehidrogenasa 2 (ADH2t).

Para la construcción módulos de la ruta de Entner Doudoroff en *S. cerevisiae* se utilizaron los genes de las enzimas DEHU reductasa (DehR) de *Agrobacterium tumefaciens* C58, ceto-deoxigluconato quinasa (KDGK) de *E. coli* y ceto-deoxigluconato fosfato aldolasa de *B. subtilis* (KDGPA). Para esto se realizaron ensambles considerando el promotor constitutivo de piruvato decarboxilasa (PDC1p) y terminador fuerte fosfopiruvato hidratasa (ENO2t) para DehR, promotor truncado del gen hexoquinasa 7 (Δ HXT7) y terminador fuerte

del gen triosa fosfato isomerasa 1 (TPI1t) para KDGK, el promotor de fructosa 1,6-bi-fosfato aldolasa (FBA1p) y también su terminador fuerte (FBA1t).

Tabla 3. Construcción de módulos de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*, indicando los promotores y terminadores correspondientes para cada gen de la ruta heteróloga degradativa de alginato.

Enzima	Promotor	Tamaño		Fuente biológica	Terminador	Tamaño	
		Promotor (bp)	Gen			Terminador (bp)	Módulo (kb)
Alginato liasa							
(Hd-Alex)	PGK1p	757	Hd-Alex	<i>Haliotis rufescens*</i>	CYC1t	302	1,8
Oligoalginato liasa (At-C58)							
	PYK1p	1000	Ato3025	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	ADH2t	400	3,7
Transportador							
DEHU	PDC1p	800	quTD	<i>Aspergillus nidulans</i>	ENO2t	400	2,9
DEHU reductasa							
	TEF1p	412	DehR	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	TPI1t	400	1,8
KDG quinasa	Δ HXT7p	395	KDGK	<i>E. coli</i>	PGI1t	400	1,7
KDGP aldolasa	FBA1p	820	KDGPA	<i>Bacillus subtilis</i>	FBA1t	400	1,8
Aminoglicósido fosfotransferasa							
	PYK1p	1000	HPH	Vector pCDNA 3,1 /Hygro (+)	ADH2t	400	2,4

*Gen modificado por optimización de codones para *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando tabla de codones (Nakamura et al., 2000)

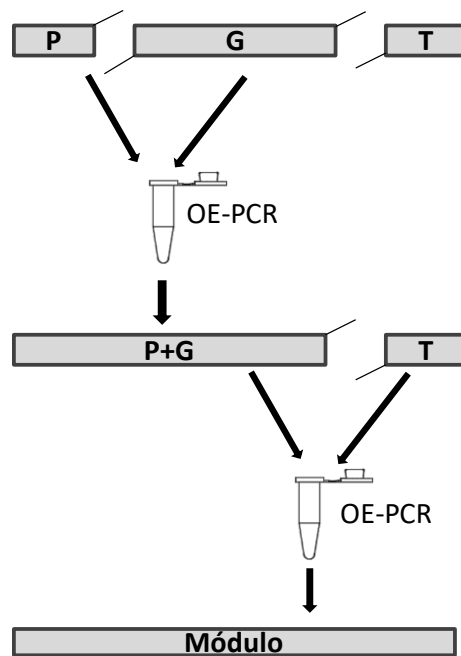
3.1.1. Amplificación de genes heterólogos y elementos reguladores de *S. cerevisiae* S288c

Los fragmentos a ensamblar fueron amplificados utilizando el kit KOD Hotstart DNA polymerase Cat. No 71086 (Novagen®), utilizando los partidores disponibles en la tabla de anexos B.3. Las construcciones del módulo 3 fueron realizadas mediante la técnica de DNA Assembler/OE-PCR, la cual se realizó en dos etapas consecutivas en una reacción en el termociclador. La primera etapa de ensamble y elongación se realiza utilizando un volumen de 30 µL e incluye 80 ng del fragmento de DNA de mayor tamaño y 40 ng del fragmento de menor tamaño, 0,6 U del enzima KOD Hotstart Polymease®, buffer de reacción 10X KOD Hot Start®, 1 mM de MgSO₄ y 0,2 mM de cada dNTP. La primera etapa no incluye partidores ya que la extensión ocurre desde los extremos de DNA unidos durante la etapa de hibridación. El programa utilizado fue: denaturación inicial a 94°C por 1 mi, 15 ciclos de denaturación 94°C por 15 s, hibridación a 43°C por 30 s y extensión a 72°C durante 20 s.

La segunda etapa consiste en el enriquecimiento de las hebras de DNA ensambladas y se realiza agregando a la misma reacción un cantidad adicional de los reactivos hasta llegar a 50 µL, para esto se le adicionan 2 µL de buffer KOD, 5 µL de dNTP's, 3 µL de cada partidores forward y reverse (5 µM), 0,8 µL de MgSO₄, 0,4 µL de enzima. Posteriormente se implementó el programa PCR de segunda etapa, correspondiente a 94°C de denaturación por 15 seg, hibridación a una temperatura ajustada para cada partidor según corresponda para cada partidor, extensión a 72°C por 20 seg/kb, ajustado para cada ensamble particular.

3.1.2. Construcción Módulos de expresión

Para la construcción de los módulos de expresión se realizó la construcción de un módulo parcial en una reacción de dos etapas OE-PCR (ya sea Promotor + Gen ó Gen + Terminador), y posteriormente el módulo parcial se purificó mediante Gene Gel Extraction Kit® (Invitrogen), cuantificado mediante Maestro Nano Pro Micro-volume Spectrophotometer (Noki Technologies PVT. LTD). El módulo parcial aislado se utilizó como templado para la siguiente reacción de ensamble con el fragmento restante, según lo descrito por la Figura 5.



Una vez obtenidos los fragmentos, éstos fueron ligados en un vector de clonamiento pBluescript SK II (+), mediante digestión con EcoRV, y ligación con T4 ligasa, en proporción 1:5 vector:inserto.

Figura 5. Metodo de ensamble para construcción de Módulos mediante DNA Assembly (OE-PCR)

Posteriormente las mezclas ligación se utilizaron para transformar *E. coli* (Top 10), según los protocolos Anexo (2.6). Posteriormente fueron sembradas e identificadas por Blue/White selection según las instrucciones del fabricante (Stratagene, Agilent).

Las colonias positivas fueron identificadas mediante la técnicas de PCR de colonia, según el protocolo disponible en el anexo B.9. Se realizó un PCR explorativo para unas 20 colonias de cada experimento. Las colonias positivas fueron analizadas mediante un ensayo de doble digestión diseñado para cada uno de los fragmentos de interés, con el objetivo de validar la presencia del fragmento ya sea en sentido o en antisentido en la ligación con extremos romos en pBluescript digerido con EcoRV.

Luego las colonias validadas por doble digestión fueron secuenciadas mediante los servicios de Standard-Seq (Sanger) a la empresa Macrogen Inc. Los resultados fueron analizados mediante alineamientos locales utilizando las secuencias de los mapas de vectores con sus inserciones correspondientes según el módulo ensamblado.

3.2. Construcción de Cluster mediante Gibson Assembly.

Los ensamblados obtenidos por OE-PCR fueron purificados mediante el kit GeneJet Gel Extraction (Invitrogen®), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se estandarizó un protocolo de Gibson Assembly, en base al protocolo disponible en Nature (Gibson et al., 2009). Se preparó un master mix al 2X, con 10 uL de 5X isothermal buffer, 0,2 uL T5 exonuclease (1 U/uL), 0,6 uL Phusion Polymerase, 5 uL DNA Taq ligase, 9,2 uL agua libre de nucleasas, comprende un total de 25 uL para 5 alícuotas de 5 uL. Posteriormente se incubaron a 50°C por 1 hr.

La preparación de los fragmentos a ensamblar se realiza mediante un cálculo de equimolaridad en un volumen total de 5 uL. Donde x corresponde a la concentración en ng/μL cuantificada por Maestro Nano y z el tamaño en pares de bases.

$$x \left(\frac{pmol}{uL} \right) = \frac{y(ng / uL) \cdot 1000}{z(bp) \cdot 650(kDa)}$$

Los fragmentos a ensamblar corresponden a los módulos completos de la ruta metabólica degradativa de alginato diseñada, Aly, Oly, quTD, DehR, KDGK y KDGPA. Dado que todos los fragmentos poseen solapamiento compatible con las condiciones de Gibson Assembly se plantearon diversas estrategias para ensamblar los módulos, de tal forma de al menos disponer del menor número de fragmento y de mayor tamaño, con el fin de aumentar la eficiencia de integración genómica posterior (Shao et al., 2009). Para esto se realizó una re-amplificación de los distintos fragmentos a partir de los fragmentos clonados en pBluescript, validados por secuenciación, y se utilizaron como fragmentos para ensamblar en reacciones de 10 uL de volumen total. Posteriormente fueron cargados en un gel de electroforesis de agarosa al 0.7% durante 40-45 min a aproximadamente 85 V. Las bandas identificadas fueron escindidas del gel y purificadas por Gene Jet Gel Extraction kit®. Posteriormente fueron cuantificadas por maestro nano para calcular concentración y pureza, y eventualmente concentradas.

4. Resultados y Discusión

4.1. Módulos de Expresión

Para la construcción es necesario purificar al menos 500 ng de cada fragmento, por lo cual se reporta la correcta amplificación de los genes para alginato liasa (Aly), oligoalginato liasa (Oly), DEHU reductasa (DehR), Transportador DEHU (quTD), ceto-deoxigluconato kinasa (KDGK), ceto-deoxigluconato fosfato aldolasa (KDGPA). Adicionalmente se amplificaron los promotores y terminadores correspondientes para los módulos de expresión a partir del DNA genómico (DNAg) de *S. cerevisiae* S288c.

La figura 6 muestra el resultado de la amplificación de los marcos de lectura correspondientes a los genes, donde se observa que Aly presenta algunas amplificaciones inespecíficas a los 1500 bp aproximadamente, sus promotor y terminador correspondiente muestran los tamaños adecuados de 757 y 302 bp. Los resultados de DNA assembly mediante OE-PCR en la Figura 6C revela los efectos que produce la amplificación inespecífica al momento unir los fragmentos sobrelapantes. Para la recuperación del fragmento correspondiente al modulo completo se aisló el tamaño correspondiente a 1881 bp.

Posteriormente se validaron las fuentes genéticas de los genes quTD, DehR, KDGK y KDGPA donde se han obtenido los tamaños correspondientes (Figura 7), como también se realizaron purificaciones de mayores cantidades de los amplicones (Figura 8). Posteriormente se realizaron PCR para reamplificar los fragmento obtenidos, lo cual fue necesario para tener una mayor cantidad de ADN para realizar los ensamblajes. Se observan amplificaciones inespecíficas en las reacciones del transportador quTD, DehR y KDGK a los tamaños de 500, 400 y 300 bp aprox.

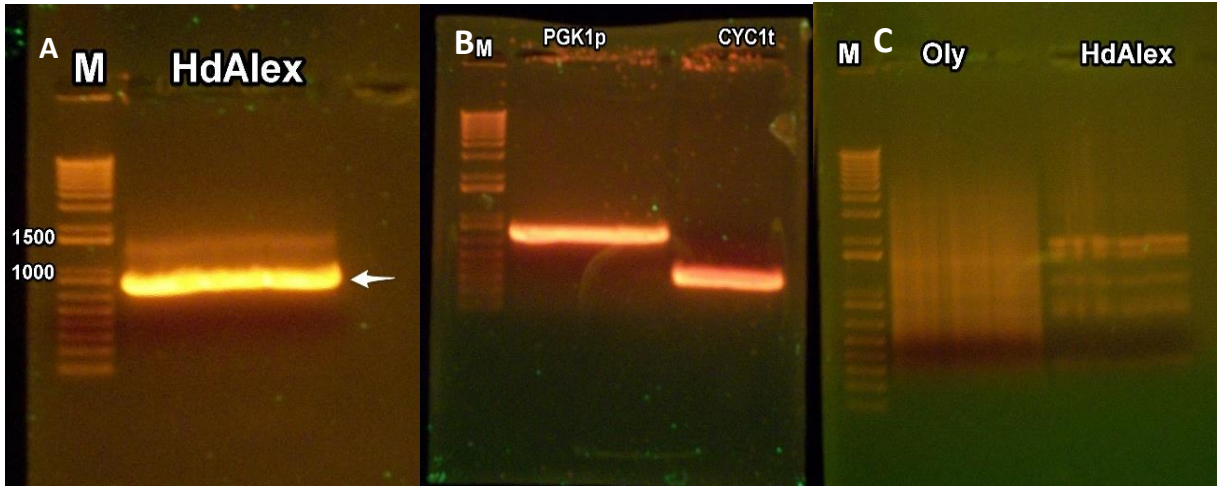


Figura 6. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). A: Amplificación del gen HdAlex (822 bp) de alginato liasa B: Promotor PGK1p (757 bp), 2: Terminador CYC1t (302 bp). C: Reacción fallida Oly (3731 bp) y Modulo Aly (1881 bp).



Figura 7. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). Amplificación preliminar de las fuentes genéticas correspondientes. (1: quTD 1705 bp de *A. nidulans*, 2: DehR 1068 bp de *A. tumefaciens* C58, 3: KDGK 930 bp de *E. coli* TOP 10, 4: KDGK 930 bp de *E. coli* DH5-alfa, 5: KDGPA, 591 bp). Marcador 1 kb plus

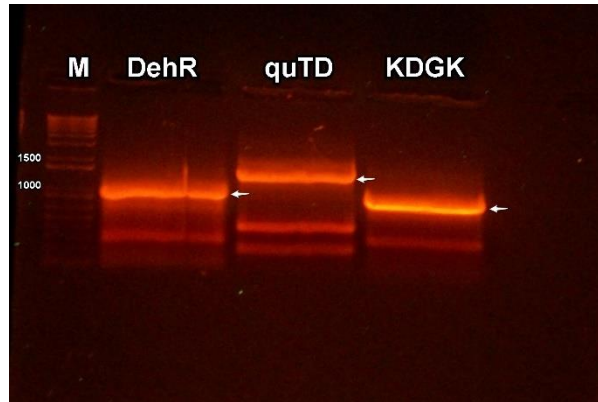


Figura 8. Resultados de PCR en electroforesis (agarosa 1%). Amplificación de genes DehR (1068bp) , quTD (1705 bp) , KDGK (930 bp).

Se obtuvo el módulo de Aly mediante OE-PCR (figura 10), con el promotor ADH1p y el terminador CYC1t (1881 bp), y se comparó por diferencias de tamaño con el módulo parcial. Para continuar con la construcción de la ruta metabólica se amplificaron todos los otros promotores y terminadores necesarios para la obtención de los módulos de expresión, de éstos el único que presenta problemas de amplificaciones inespecíficas es PDC1p (figura 11).

Posteriormente el gen de Oly es amplificado desde el DNAg de *A. tumefaciens* C58, se obtuvo el tamaño correspondiente de 2331 bp del marco de lectura. Para la construcción del módulo de expresión de oligo alginato liasa se amplificó desde DNAg de *Saccharomyces cerevisiae* S288c, el promotor de Fosfogluconato kinasa (PYK1p) y el terminador de alcohol dehidrogenasa 2 (ADH2t) presentes en figura 9. Se obtiene mediante DNA assembly un fragmento de 3731 bp correspondiente al módulo de expresión de alginato liasa en dos pasos, construyendo el fragmento parcial PYK1p + Oly (3331 bp) en una reacción por OE-PCR, el cual es purificado desde gel, reamplificado y cuantificado para ensamblar con el terminador ADH2t.

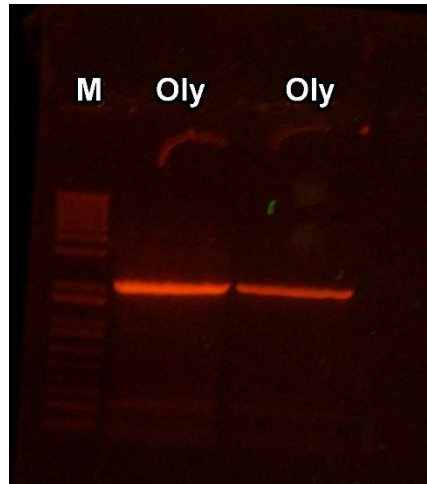


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación de gen Oligoalginato liasa (2331 bp) a partir del DNAg de *Agrobacterium tumefaciens* C58.

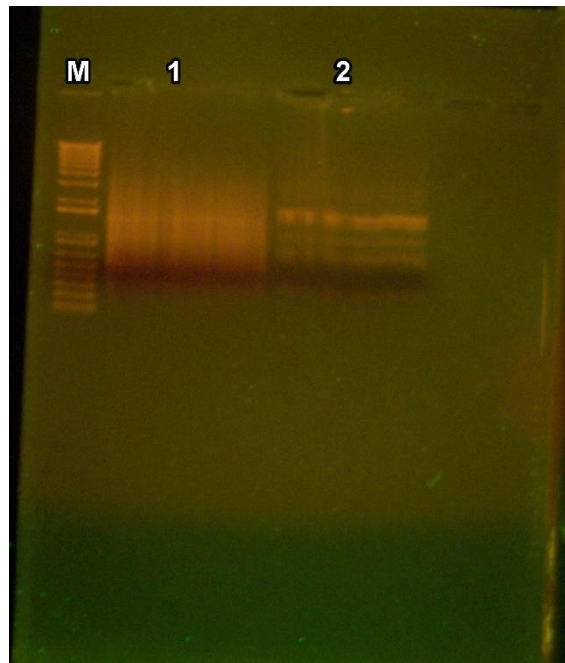


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa. Amplificación y posterior purificación de los fragmentos. M: 1 kb Ladder plus, Modulo parcial: ADH1p + Hdalex (1579 bp), 2: Modulo completo ADH1p + HdAlex + CYC1t (1881 bp).

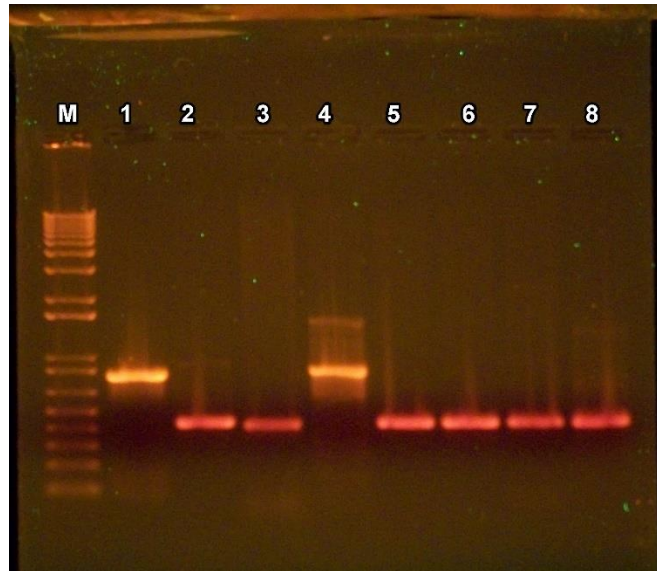


Figura 11. Promotores y terminadores para la construcción de módulos de la ruta del alginato. 1: PGK1p (757 bp), 2: ADH2t (400 bp), 3: TEF1p (412 bp), 4: PDC1p (800 bp) , 5:HXT7p (395 bp), 6: TPI1t (400 bp), 7: PGI1t (400 bp), 8: FBA1t (400 bp).

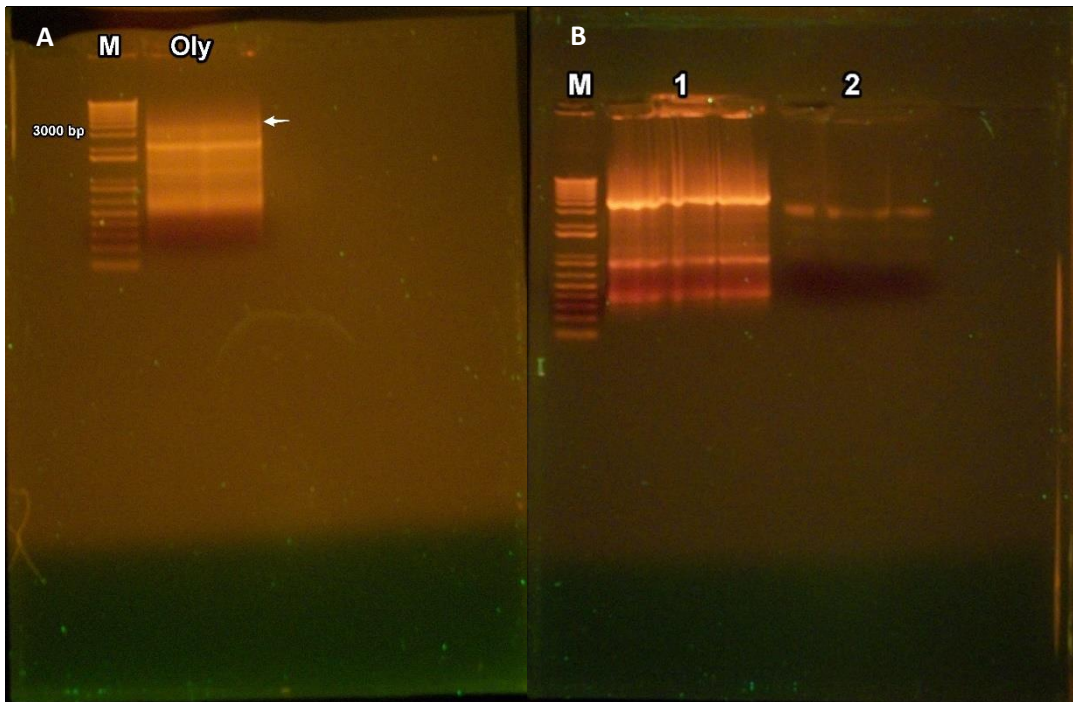


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Ensamble de Modulo Oly (3731 bp). B: Re-amplificación fragmento completo. 1: modulo completo PYK1p + Oly + ADH2t (3731 bp), 2: módulo parcial PYK1p + Oly (3331 bp).

Los módulos de expresión para DehR y el transportador quTD se obtuvieron mediante de los módulos parciales DehR+TPI1t (1468 bp) y quTD + ENO2t (2105 bp) de la figura 13A y 13B. Finalmente se obtuvieron los módulos completos mediante una segunda reacción de OE-PCR los módulos de expresión DehR (1880 bp) y quTD (2905 bp). La inespecificidad de la amplificación de los módulos parciales como los módulos totales dificultó la obtención de los mismos, de tal forma que luego de varios intentos se pudieron clonar en para posteriores estudios.

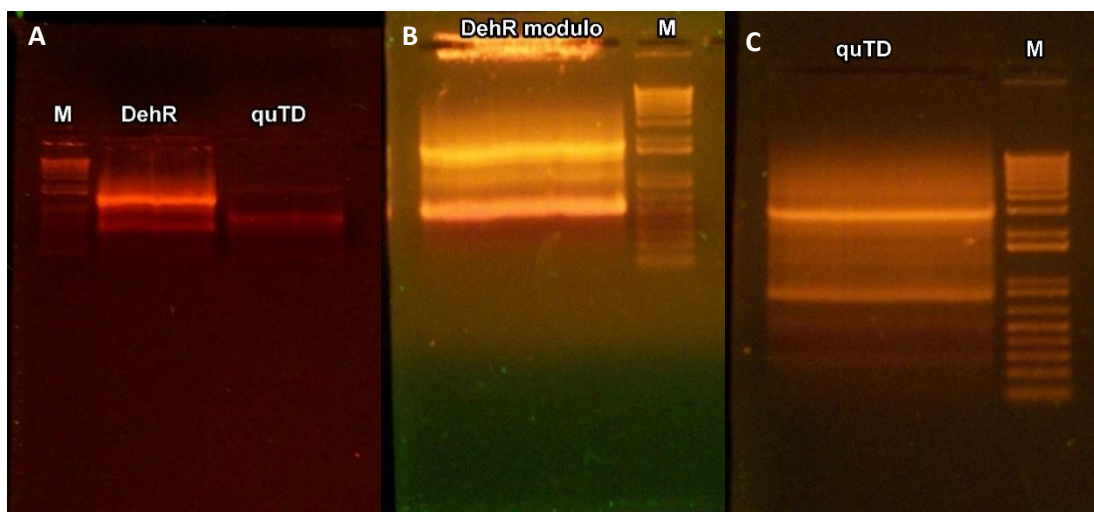


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Construcción parcial del módulo DehR + TPI1t (1468 bp) y parcial quTD + ENO2t (2105 bp). B: Modulo completo DehR (1880 bp). C: Modulo completo quTD (2905 bp).

La obtención del módulo KDGK se alcanzó mediante la generación de un módulo parcial Δ HXT7p + KDGK de 1325 bp (no disponible), el cual fue purificado por su banda específica y finalmente se logró construir el módulo completo de KDGK con el terminador PG11t (1725 bp). Respecto a la construcción del modulo de KDGPA, se observa que la construcción del modulo parcial KDGPA + FBA1t pose amplificaciones inespecíficas, así como también la amplificación del terminador FBA1t. Esto genera como inconveniente dificultades para obtener el fragmento de interés en el OE-PCR completo, pero de todas maneras fue posible obtener un fragmento de 1811 bp que posteriormente podrá ser amplificado.

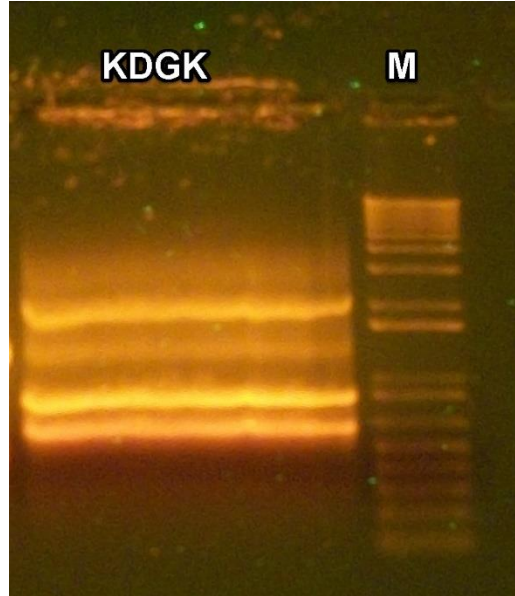


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Construcción Modulo completo Δ HXTp + KDGK + PGI1t (1725 bp).

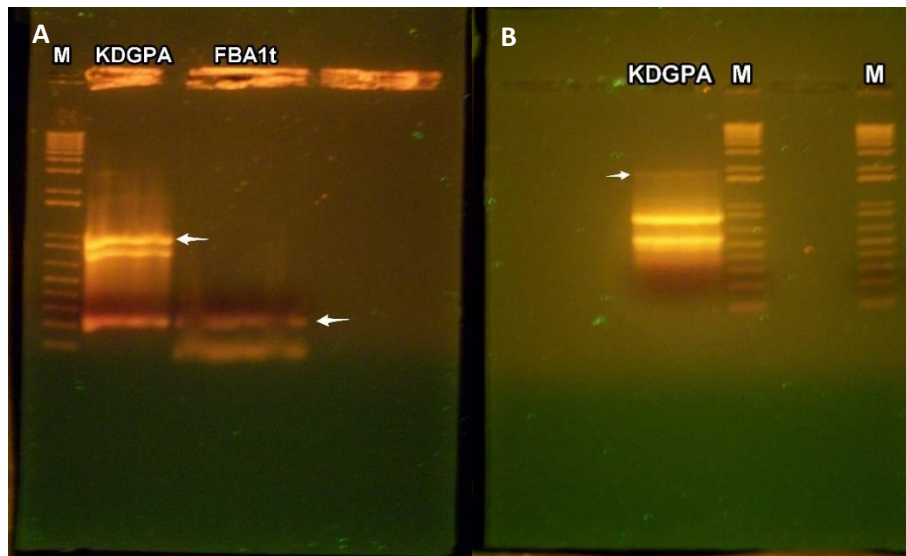


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Construcción Modulo parcial KDGPA + FBA1t (991 bp), FBA1t: Sólo terminador (400 bp) B: Modulo KDGPA: FBA1p + KDGPA + FBA1t (1811 bp).

Los resultados de ensambles completos revelan ciertas dificultades en las amplificaciones de fragmentos inespecíficos, que son comunes en la técnica de OE-PCR, y por lo tanto es una práctica habitual realizar la separación de los fragmentos de interés por electroforesis y purificación. El diseño de partidores es clave para poder predecir de forma pertinente cuáles son los fragmentos que podrían tener inconvenientes en las amplificaciones. Los principales problemas se producen cuando los partidores forman estructuras secundarias, ya que éstas tienden a generar amplificaciones en otros lugares del templado y al tener colas de sobrelape con las regiones a unir se unen fragmentos de variados tamaños de forma inespecífica, y generalmente en la reacción se ve favorecida la amplificación de menos tamaño de fragmentos a ensamblar. En el caso del gen sintético HdAlex, correspondiente a la enzima alginato liasa, se observan amplificaciones inespecíficas que debieron ser removidas (figura 6A), de lo contrario puede ser muy difícil de obtener un fragmento puro en la segunda etapa de un ensamble completo, que es lo que ocurrió con el ensamble final HdAlex (1881 bp), ya que se pudo apreciar una gran cantidad de bandas inespecíficas que corresponden algunos a los fragmentos del terminador (302bp), promotor (757 bp), gen (822 bp) que se pueden observar en la figura 6-C, mientras que también hay tamaños no esperados entre 1000 y 1500 bp que no corresponden a los fragmentos enteros si no más bien a fragmentos de módulos parcial y/o incorrectamente ensamblados, estos fragmentos generar interferencia en mayor medida visible al momento de obtener los ensambles parciales presentes en la figura 11 (carril 1), dificultando la obtención de un fragmento único de tamaño definido. Este inconveniente se presentó en mayor medida en los procesos de ensamble del gen Oly, lo cual podría deberse a que al momento de amplificar el gen At3025 desde el DNAg de *A. tumefaciens* C58 se presentaron unas pequeñas bandas de tamaño menor (figura 9), las que pueden repercutir en los resultados de ensamble del módulo final observado en la figura 12-A. Por esta razón fue imperativo realizar una serie de reamplificaciones y purificaciones consecutivas para poder obtener el fragmento de interés de 3731 bp (carril 1) y ser comparado con el módulo parcial (carril 2).

Los siguientes ensambles correspondientes a los detallados en DehR y quTD presentan la dificultad que en el ensamble de los módulos finales se pueden observar fragmentos de menores tamaños y de carácter interferente, que provienen de los ensambles parciales. Tanto la amplificación del gen DehR como también qUTD presentan amplificaciones inespecíficas a partir de las fuentes genéticas (figura 8), las cuales pueden ser removidas mediante largos períodos de electroforesis. Sin embargo, este patrón de formación de fragmentos se repite a medida que observamos los resultados de la reacción OE-PCR, ya

que en los módulos parciales hay una mayor formación de los fragmentos no deseados desde los 1000 bp hacia abajo, generando dificultades para tomar un templado lo más íntegro posible para continuar con la siguiente reacción OE-PCR y disponer del módulo completo. En algunos casos fue necesario para posteriores ensayos de Clonamiento de los módulos en vectores de clonación la reamplificación de los módulos completos debido a la inespecificidad revelada en las reacciones.

En el caso de los módulos correspondientes a KDGK a KDGPA, el problema de amplificaciones inespecíficas se acentúa aún más, siendo necesario realizar amplificaciones sucesivas para poder obtener el fragmento limpio. La figura 14 muestra que en el resultado de OE-PCR incluso en las reamplificaciones aparecen fragmentos de menor tamaño como entre 500 y 1000 bp, y otros fragmentos intermedios para llegar a un tamaño de 1725 bp. En el caso de KDGPA, es similar, en el cual la generación de amplificaciones inespecíficas a partir de los módulos parciales genera dificultades para poder amplificar el módulo final entre 800 y 900 bp, que indican la baja especificidad de las colas de los fragmentos y se obtiene una menor cantidad del fragmento (1811 bp).

La técnica de DNA Assembly (OE-PCR) implica un proceso de ligación en la primera etapa en el cual las temperaturas de annealing son considerablemente bajas a una ligación convencional, lo que causa que se obtenga una baja especificidad en las ligaciones posteriores. A pesar de tener un aumento de la temperatura de annealing en la segunda etapa de OE-PCR, si los partidores forman algunas estructuras secundarias éstos pueden fácilmente generar amplificaciones no deseadas que pueden interferir en los procesos de purificación y posterior ligación.

El ensamble mediante ésta técnica permite un rápido diseño de los partidores, como también un proceso de ensamble entre dos fragmentos que sólo pueden ligarse de una forma que puede ser identificada por el tamaño, para continuar ensamblando un módulo o cluster. Esto permite un proceso que puede ser utilizado para todo tipo de secuencia, y que tiene puntos de control entre cada uno de los tamaños a obtener. Sin embargo, la necesidad de ensamblar parte por parte lo hace un proceso más tedioso, que quiere más tiempo y ensayos preliminares de estandarización, pero los costos son inferiores a los kits comerciales. Una vez ensamblados los fragmentos, éstos fueron ligados a un vector pBluescript SK II (+) para construir los vectores especificados en la Figura 19, y posteriormente secuenciadas para validar los módulos.

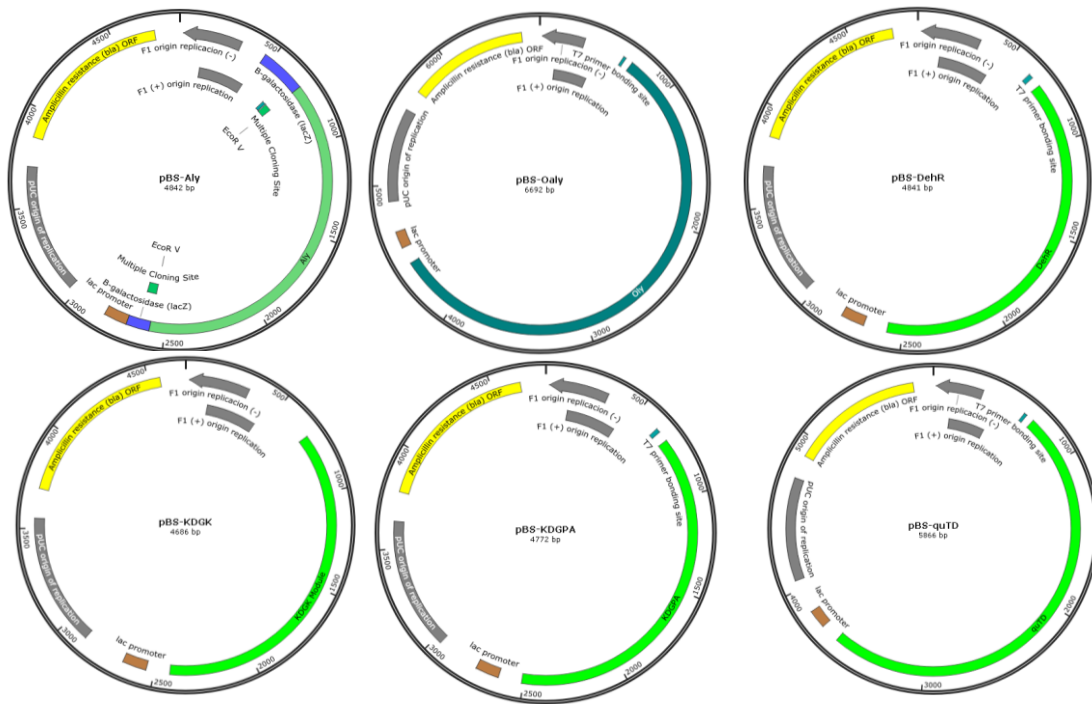


Figura 16. Mapa de los vectores de clonamiento contruidos con los módulos de expresión.

4.2. Cluster de transformación

Los módulos obtenidos por OE-PCR fueron reamplificados y utilizados para realizar los ensamblajes para el cluster correspondiente a la ruta metabólica mediante Gibson Assembly. Con el objetivo de comparar las técnicas de DNA Assembly y Gibson Assembly, se realizó un ensayo para estudiar la capacidad de ensamblar correctamente ambas técnicas. La figura 16 muestra las diferencias de amplificación entre OE-PCR (carril 2) y la técnica de Gibson (3 y 4), donde se puede observar una mayor cantidad de DNA final en el primero, pero también una mayor formación de fragmentos inespecíficos. La técnica de Gibson es mas preciso, pero es imperativo separar los fragmentos no ensamblados por gel.

Posteriormente a los módulos ya contruidos por OE-PCR, la construcción pendiente del módulo de resistencia HPH no fue posible de realizarla en el capítulo anterior, por lo cual se generó mediante Gibson Assembly obteniendo un fragmento de 2426 bp. Se pueden

apreciar los fragmentos intermediarios HPH + ADH2t (1424 bp), PYK1p + HPH (2024 bp), HPH (1024 bp), PYK1p (1000 bp), ADH2t (400 bp) en la figura 17. Todos los fragmentos parciales fueron separados con el fin de obtener el módulo puro, el cual fue clonado en *E. coli* según la metodología del punto 6.1.

Los resultados de ensamble del cluster identifican que fue posible ensamblar y reamplificar los siguientes fragmentos de la figura 18: cluster de integración I (3024 bp), cluster de integración II (5612 bp), cluster de integración III (5416 bp). El primer cluster contiene la información que codifica el módulo de resistencia HPH anclado al fragmento UP, donde se puede observar fragmentos no ensamblados bajo los 1000 bp, correspondientes al fragmento UP (698 bp), un espectro de amplificaciones irregulares hasta llegar al tamaño deseado. El segundo cluster contiene los módulos de los genes de la etapa de depolimerización Aly y Oly, donde se pueden observar uniones inespecíficas hacia arriba y abajo del tamaño esperado, como también los módulos independientes (1,8 y 3,3 kb) no ensamblados. El tercer cluster de ensambles debe contener los módulos DehR, KDGK y KDGPA en un tamaño de (5416 bp) el cual se puede apreciar en la figura 18C. Sin embargo una gran cantidad de fragmentos no específicos se pueden observar en distintos tamaños desde 1000 bp, y también algunos ensamble superiores a 12 kb. Estas amplificaciones secundarias vuelven a aparecer al momento de realizar reamplificaciones de los fragmentos, causando dificultades para la purificación.

Una vez obtenidos los fragmentos de los cluster parciales se plantearon 5 fragmentos de interés para realizar la inserción genómica en *S. cerevisiae* S288c, mediante electroporación de levaduras electrocompetentes.

Tabla 4. Resumen de fragmentos de ADN generados para integración genómica.

Ensamble Modulo o Cluster	Tamaño (bp)	Origen
UP + HPH	3024	Gibson Assembly
Aly + Oly	5612	Gibson Assembly
quTD	2905	DNA Assembly
DehR + KDGK + KDGPA	5416	Gibson Assembly
DOWN	638	PCR
TOTAL	17595	-

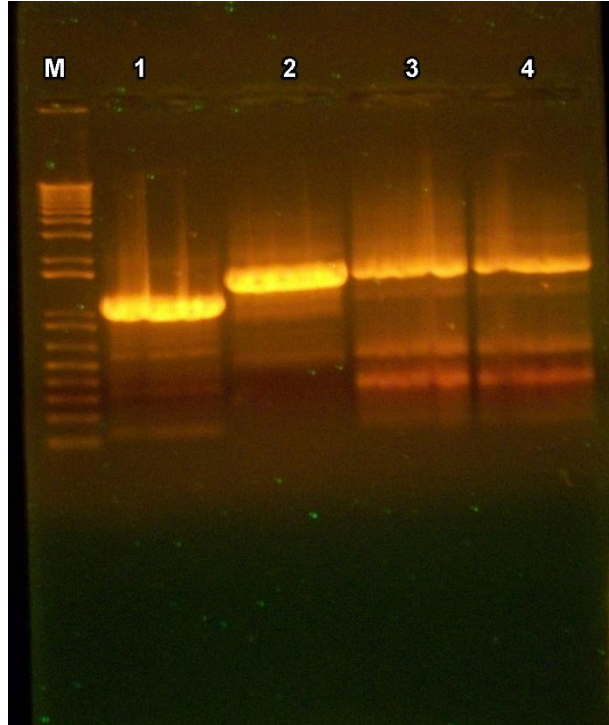


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Analisis comparativo de especificidad de Gibson Assembly v/s DNA Assembly (OE-PCR). 1: Gen DehR (1068 bp), ensamble TEF1p+ DehR (1480 bp) para OE-PCR (2) y Gibson Assembly (3-4).

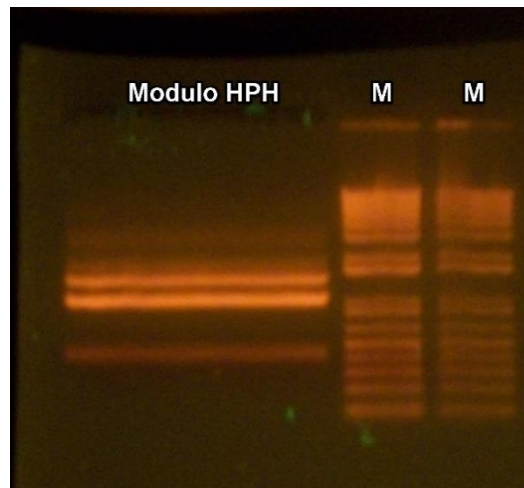


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reacción de Gibson Assembly Modulo de resistencia HPH (2426 bp): PYK1p (1000 bp) + HPH (1024 bp) + ADH2t (400 bp).

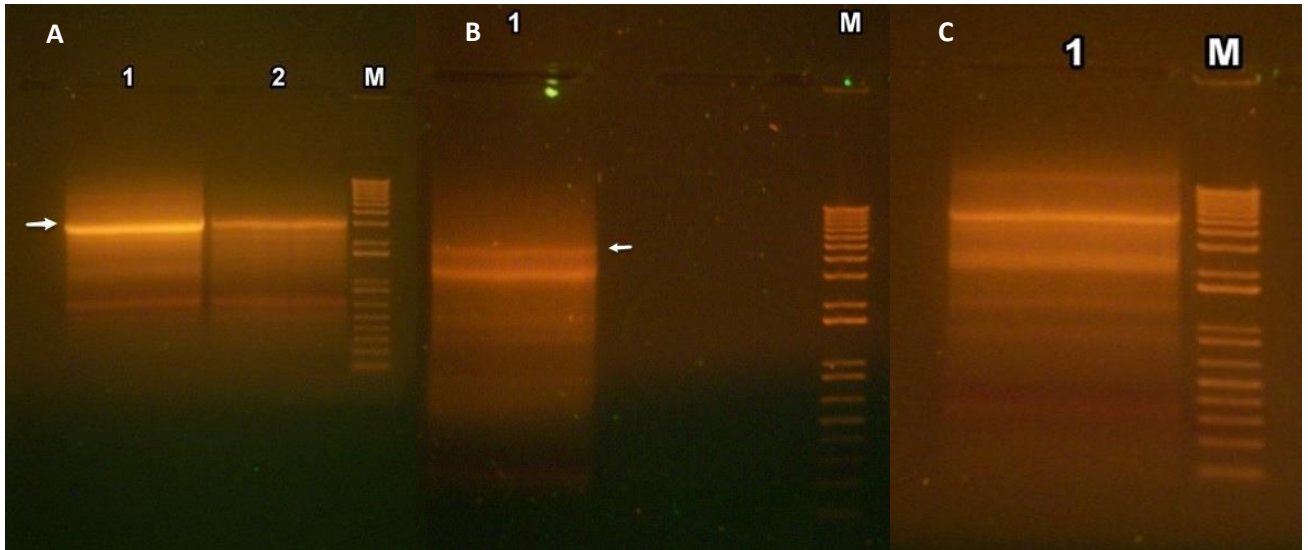


Figura 19. Electroforesis en el agarosa 1%. Ensamble de Cluster de integración genómica A: I (3024 bp), B: II (5612 bp) y C: III (5416 bp)

La obtención de los cluster es un proceso clave que influye en la posterior eficiencia de transformación de levaduras electrocompetentes, de forma que tanto el tamaño como el número de fragmentos para realizar la recombinación homóloga *in vivo* pueden influir en la obtención de la ruta metabólica heteróloga en el organismo. En estudios previos de construcciones de rutas metabólicas en *Saccharomyces cerevisiae* se plantea que la eficiencia disminuye dramáticamente desde 5 genes hacia arriba, pero este se puede aumentar incrementando la extensión de las zonas sobrelapantes entre cada fragmento o disminuyendo el número de éstos a un 1 sólo cluster total (Shao et al., 2009). El diseño experimental de la ruta metabólica consistía en el ensamble de 1 cluster más los fragmentos UP y DOWN para la recombinación, sin embargo no fue posible obtener los módulos ensamblados en 1 sólo cluster debido a que el largo de la ruta metabólica dificulta la implementación del Gibson Assembly. A medida que aumento el tamaño de los fragmentos a ensamblar, aumenta la concentración de fragmentos que se requiere para el ensamble.

Si bien ambas técnicas de ensamble, tanto Gibson Assembly como DNA assembly pudieron ser estandarizadas, es necesario mencionar que poseen diferencias importantes. Los ensambles por OE-PCR son diseñados con una cola de sobrelape de unos 12-14 bp, dependiendo de la naturaleza del fragmento, que posteriormente permite un ensamble en una primera etapa a una baja temperatura (41- 43 °C). Esto genera un alto porcentaje de inespecificidad, lo que implica que es necesario realizar sucesivas electroforesis para purificar los fragmentos de interés, sin embargo, cuando se obtienen amplificaciones de

tamaños relativamente parecidos al de interés es muy difícil obtener el fragmento puro y en algunos casos no es posible generar el módulo, que es lo que ocurrió con el módulo HPH. Otro aspecto importante es el porcentaje GC(%) de las colas en las que se ensamblan, ya que cuando hay diferencias significativas entre éstas no es posible realizar ensambles de forma simultánea, y esto condiciona a realizar el ensamble en dos etapas de forma jerárquica.

Por otro lado, los ensambles realizados por Gibson assembly permiten la obtención del fragmento de interés rápidamente en tan sólo una reacción, en la cual se cargan todos los fragmento a ensamblar y se ha logrado estandarizar reacciones de hasta 5 fragmentos (Gibson et al., 2009). Esta técnica permite realizar un ensamble más específico, debido a que las colas de extensión son más largas, permitiendo realizar una reacción de ligación a mayor temperatura y por ende con mayor estrictez, que adicionalmente es asistida por enzimas del tipo exonucleasa y ligasas. Esta fue una de las razones por las cuales fue posible ensamblar exclusivamente el módulo HPH mediante Gibson Assembly, dada la formación de amplificaciones inespecíficas determinadas por los PCR de pre-amplificación, lo Esto permite que se obtengan con mayor fidelidad los fragmentos ensamblados de interés, utiliza una menor cantidad de fragmento amplificado. La técnica de ensamble por Gibson assembly se diferencia por no tener la naturaleza de una reacción de amplificación, por lo que la misma cantidad equimolar de cada fragmento es ligada y luego visualizada por electroforesis, esto produce la limitante que es necesario agregar un paso adicional de reamplificación y posterior purificación para incrementar la cantidad de fragmento y continuar con los ensambles sucesivos. A pesar de que Gibson permite realizar hasta 5 ligaciones de fragmentos en una sola reacción isotérmica, muchas veces los ensambles no se lograron obtener, lo cual se verificó por el análisis de secuenciación de los fragmentos ligados al vector. Por consiguiente la estrategia para ensambles de mayor tamaño tuvo que hacerse de forma jerárquica, es decir ensambles de a pares, con su consecuente purificación y reamplificación entre cada etapa de ligación. Esto genera un mayor tiempo en la obtención de los ensambles, pero permite ligar fragmentos cuyo tamaño final es superior a los 4 Kb, lo cual sería muy difícil de alcanzar mediante DNA-Assembly.

En consecuencia, para la obtención del cluster de integración genómica fue necesario implementar técnicas de ensamble jerárquicos por Gibson assembly, de forma de disponer de puntos de control para comprobar el orden y la secuencia de los ensambles parciales para la construcción de la ruta metabólica heteróloga.

Capítulo III: Obtención y análisis funcional de la cepa recombinante

1. Metodología

1.1. Transformación genética

La transformación genética se realizó mediante la obtención del cluster de la ruta metabólica mediante el método de recombinación homóloga *in vivo*. Para esto, los fragmentos a ensamblar fueron amplificados, purificados por gel de agarosa y concentrados para obtener al menos 350 ng de cada uno de ellos, mediante un protocolo de concentración, que consistió en juntar todos los fragmentos, 350 ng de los fragmentos intermedios y 250 ng de los fragmentos UP y DOWN homólogos al sitio de recombinación. El volumen total del mix se resuspendió en 6 volúmenes de etanol absoluto (aproximadamente 600 μ L) y se incubó por 16 hrs a -20°C . Al día siguiente el mix se centrifugó por 10 min a 14.000 RPM y se eliminó el etanol remanente por inmersión. Posteriormente el DNA se secó a la estufa a 37°C por 5 minutos, y una vez seco se resuspendió en 4 μ L de agua libre de nucleasas.

Para la transformación se utilizaron levaduras electrocompetentes *S. cerevisiae* S288c, agregando el mix de 4 μ L a una alícuota de 100 μ L de cultivo y se incubó por 5 minutos antes de efectuar un pulso eléctrico de 1,5 kV, 2 μ F y 4 Ω en el electroporador Cell-Porator® Electroporation System. Luego fueron centrifugadas a 4000 RPM y lavadas en sorbitol 1M a temperatura ambiente. Finalmente se volvieron a centrifugar y el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M. Se sembraron en fracciones de 100 μ L en placas con medio mínimo SD con higromicina B al 80, 90, 100 y 150 μ g/mL y se incubaron por 2-4 días hasta la aparición de colonias visiblemente superiores al control negativo.

Posteriormente los estudios de identificación de las colonias positivas para los genes se realizaron por PCR colonia, dentro de los cuales se realizó una extracción de ADNg con el protocolo Promega® (Disponible en anexo B.1), y posteriormente se realizó una amplificación utilizando el kit de enzima Go Green® Taq Polymerase. Los resultados se cargaron en un gel de electroforesis en gel de agarosa 1% por 50 minutos a 90 V.

Para la selección de transformantes con la ruta metabólica degradadora de alginato, se utilizó un marcador de resistencia antibiótico, para lo cual se evaluó la construcción de un módulo de expresión para el mecanismo de selección mediante la resistencia al antibiótico higromicina. Para esto se desea construir un método de transformación que incluya el gen de resistencia de higromicina B, el cual se obtuvo a partir del vector pcDNA3.1/Hygro(+) (ThermoFischer®) y se ensambló mediante la técnicas de OE-PCR para obtener un módulo de expresión. El modulo de expresión consistió en la construcción de un marco de lectura correspondiente a la enzima higromicina O-fosfotransferasa (HPH), ensamblado con el promotor de la enzima piruvato kinasa 1 (PYK1p) que se caracteriza por ser un promotor fuerte, y el terminador del gen alcohol dehidrogenasa (ADH2t), se realizo la técnica de OE-PCR y Gibson Assembly según lo detallado en las metodologías de las secciones 5.1 y 6.1.

Posteriormente se estableció un parámetro de rango de concentraciones de higrocimina B para determinar la sensibilidad de la levadura silvestre, realizando un antibiograma desde 30 – 200 µg/mL. Se identificó el número de colonias de cada una de las placas, las cuales se realizaron por triplicado.

1.2. Cultivo de la cepa recombinante

Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en distintas concentraciones de azúcares. Para determinar la curva de degradación de alginato de realizo un preinóculo del clon transformante 47 sin antibiótico overnight. Posteriormente se inocularon matraces de 250 mL con 100 mL de medio YPD suplmentado con concentraciones variables de glucosa como concentración mínima 5 y 10 g/L y alginato de sodio 10g/L, que contiene 100 y 150 µg/mL de higromicina B. Posteriormente de tomaron 100 µL de medio de cultivo y se resuspendieron en 900 µ de medio YPD estéril y fue medido en el espectrofotómetro a una OD de 600 nm. Posteriormente se analizó la capacidad degradativa de alginato midiendo alginato total HPLC (disponible en anexos).

2. Resultados y Discusión

2.1. Transformación genética

La Figura 19 muestra los primeros aislamientos efectivos en los cuales se han realizado estudios por PCR para la identificación de las cepas presentes. Se aislaron alrededor de 50 colonias de diversos replicados biológicos con el fin de poder tener probabilidades de aislar una colonia que tenga todos los genes correctamente ensamblados. Estos se presentan en la tabla 5, donde se indica el genotipo normal de la nativa, y los genes presentes identificados para presencia de la ruta en las colonias aisladas. Los resultados de PCR indican que existen colonias que poseen parcialmente los genes mientras que solo 2 colonias poseen la mayoría de los genes de la ruta metabólica completa, ya que no se observa la presencia del transportador quTD en la ruta metabólica de las transformantes. De 50 colonias evaluadas sólo 19 resultaron tener efectivamente la resistencia correspondiente al marcador de selección, de los cuales el resto resultaron ser falsos positivos.

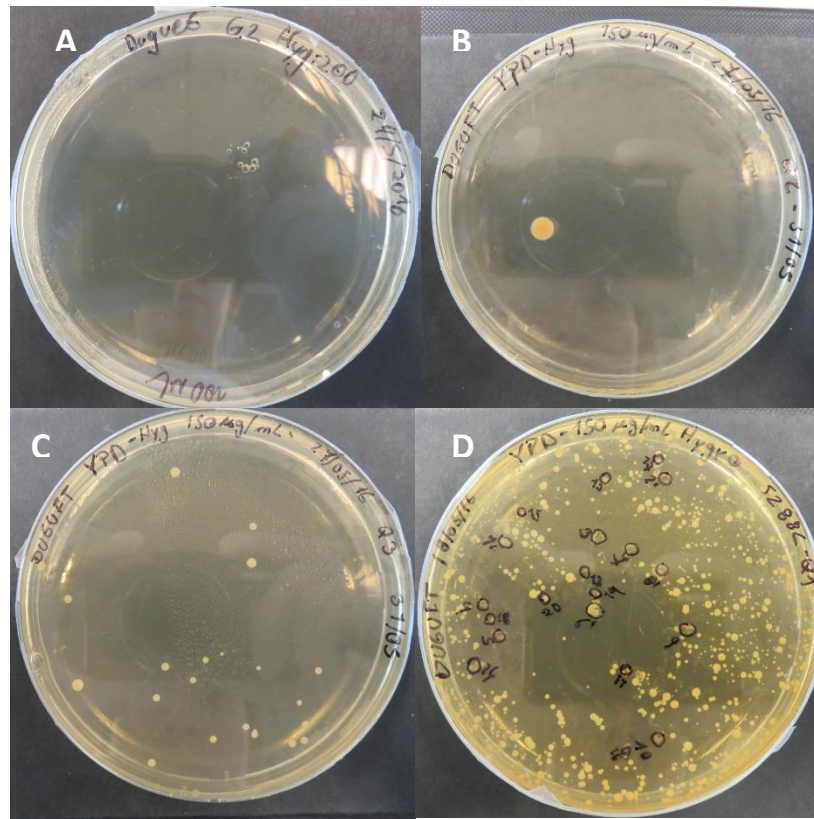


Figura 20. Resultados de transformación de *S. cerevisiae* con la ruta metabólica degradativa del alginato, siembra en antibiótico en diferentes condiciones después de recuperar toda la noche. A:

Siembra de 50 uL de cultivo en 200 ug/mL de Higromicina B. B: 50 uL de cultivo y siembra en 150 ug/mL Higromicina B. C: 100 uL de cultivo y siembra en 150 ug/mL de antibiótico. D: precipitado concentrado del cultivo y siembra en 150 ug/mL de antibiótico. Todos observados a los 4 días de incubación.

Tabla 5. Resultados de colonias transformadas identificados mediante PCR de colonia.

Clon	Genes identificados
Colonia1	Sc-HPH
Colonia2	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia3	Sc-HPH
Colonia5	Sc-HPH-Aly
Colonia6	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR
Colonia7	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia12	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia17	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia20	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia25	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia31	Sc-HPH-DehR-KDGK-KDGPA
Colonia34	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia36	Sc-HPH-KDGK-KDGPA
Colonia37	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia40	Sc-HPH-Aly-Oly
Colonia46	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR
Colonia47	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR-KDGK-KDGPA
Colonia50	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR-KDGK-KDGPA

Con el fin de verificar la integridad de los transformantes se realizó una observación al microscopio del clon que se utilizará en estudios posteriores. Se observa que en relación a la cepa nativa no se encuentran diferencia importantes en su estructura y morfología general.

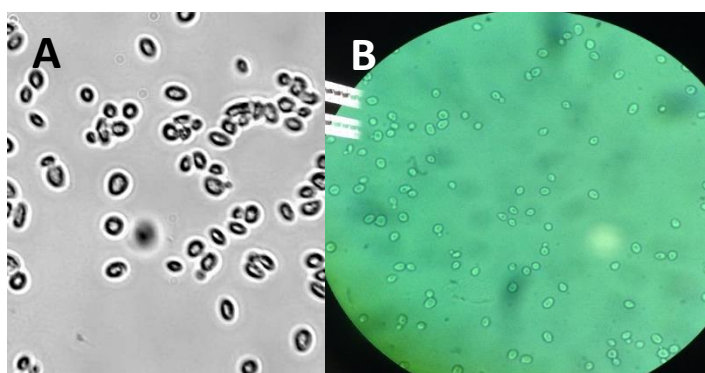


Figura 21. Micrografía al 100X de *S. cerevisiae*. A: Cepa nativa S288c (extraído ed UC-DAVIS) B: Clon *S. cerevisiae* S288-c47.

2.2. Cultivo de la cepa recombinante

En la figura 21 se muestra un crecimiento con fuente de carbono limitada en proporción 1:1 de glucosa y alginato de sodio. Las cepas vínicas de levaduras por ser capaces de crecer en concentraciones limitadas de azúcares y por su capacidad fermentativa y de tolerancia a etanol. Se observa un bajo crecimiento durante 12 hrs tanto en el caso de las cepas vínicas y *S. cerevisiae* S288c utilizada como un control negativo. El crecimiento se observa muy leve entre las 2-4 hrs, luego se mantiene de forma constante y finalmente decae. Cabe destacar que la cepa de levadura S288c – Clon47 permanece con un crecimiento constante en fase estacionaria luego de las 8 hrs, en donde aparentemente se acaba la glucosa. De esto se desprende que el polímero de alginato podría estar siendo utilizado mediante algún mecanismo degradativo posiblemente el heterólogo.

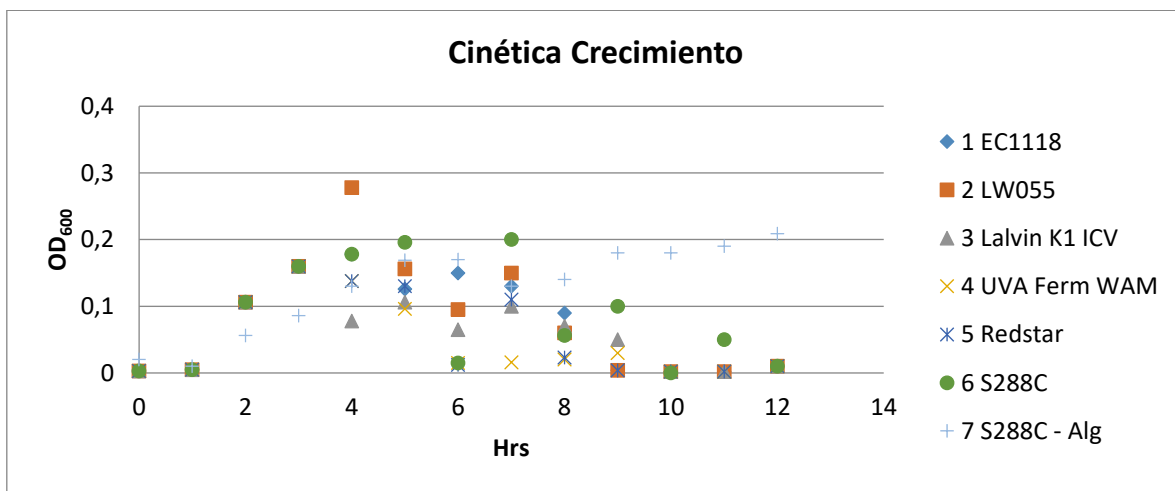


Figura 22. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* transformante Clon 47 con otras cepas de levadura en alginato:glucosa 1:1 (2 g/L). 1: Cepa *Saccharomyces bayanus* EC1118; 2: Cepa vínica *S. cerevisiae* LW055 3: Cepa vínica Lalvik K1 ICV; 4: Cepa vínica UVA Ferm WAM; 5: Cepa para fabricación de pan *S. cerevisiae* Redstar; 6: *S. cerevisiae* S288c; 7: *S. cerevisiae* S288c.

En la figura 22 se muestra el crecimiento de *S. cerevisiae* S288c47 transformado con el vector pSV-HPH-GAT-1, donde se puede apreciar un crecimiento a partir de las 10 hrs de crecimiento. Posteriormente se observa una disminución en la concentración de alginato total, y en la figura 23 muestra un leve incremento en la degradación de alginato de sodio a partir de las 20 hrs de crecimiento del cultivo. El crecimiento de la cepa nativa se mantiene similar en las dos condiciones en las que las concentraciones de alginato de sodio varían,

lo que indica la necesidad de comparar los resultados de crecimiento de la cepa utilizando controles de crecimiento correspondientes.

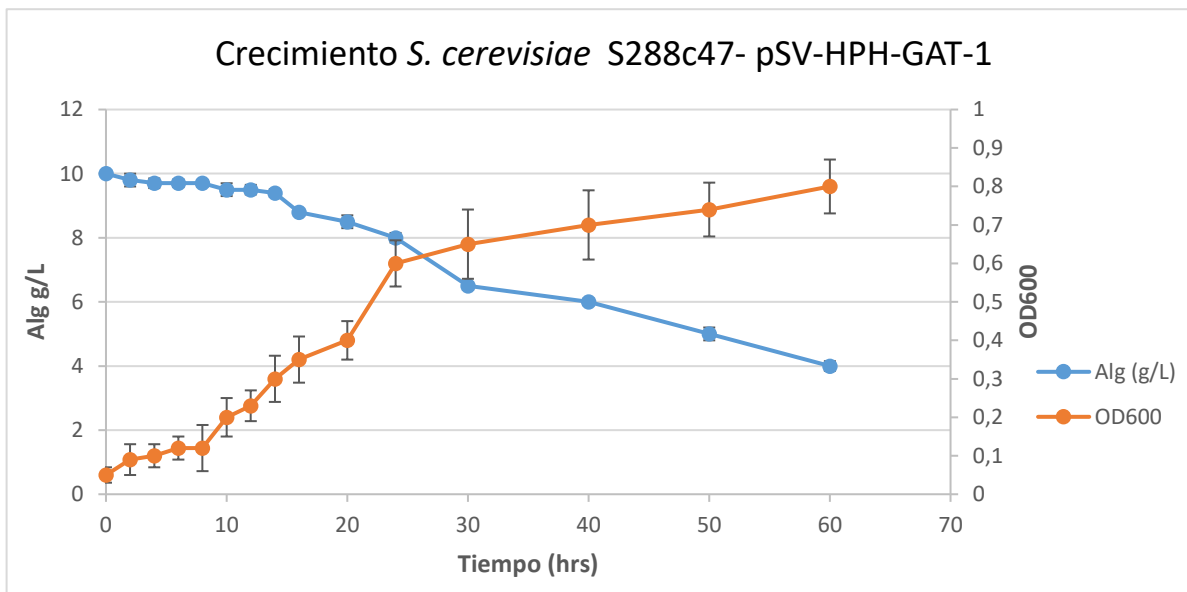


Figura 23. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* S288c Clon47-pSV-HPH-GAT1. Glucosa 5 g/L y alginato 10 g/L.

Se repitieron los ensayos de crecimiento de alginato de sodio utilizando como control negativo de crecimiento la cepa de *S. cerevisiae* sin transformar, con concentraciones limitantes de glucosa a 1 y 5 g/L y evaluando la depleción de alginato con una concentración inicial de 10 g/L. Se pudo observar en la Figura 24 que ambas cepas poseen un crecimiento limitado que alcanza una mayor densidad óptica a las 20 horas, y la cepa transformada alcanza mayor crecimiento a las 25-30 hrs aproximadamente llegando a una densidad óptica de 0,7. Respecto a la capacidad de la cepa modificada de degradar alginato se pudo observar una diferencia en que a las 60 hrs la cepa transformada puede llegar a una capacidad de degradación del alginato de hasta el 50%, mientras que en el cultivo de la cepa nativa la reducción de la concentración de alginato es sólo de un 10%. De esto se

desprende que al menos existe depolimerización del alginato que puede estar ligada a la actividad de las enzimas del tipo alginato liasas.

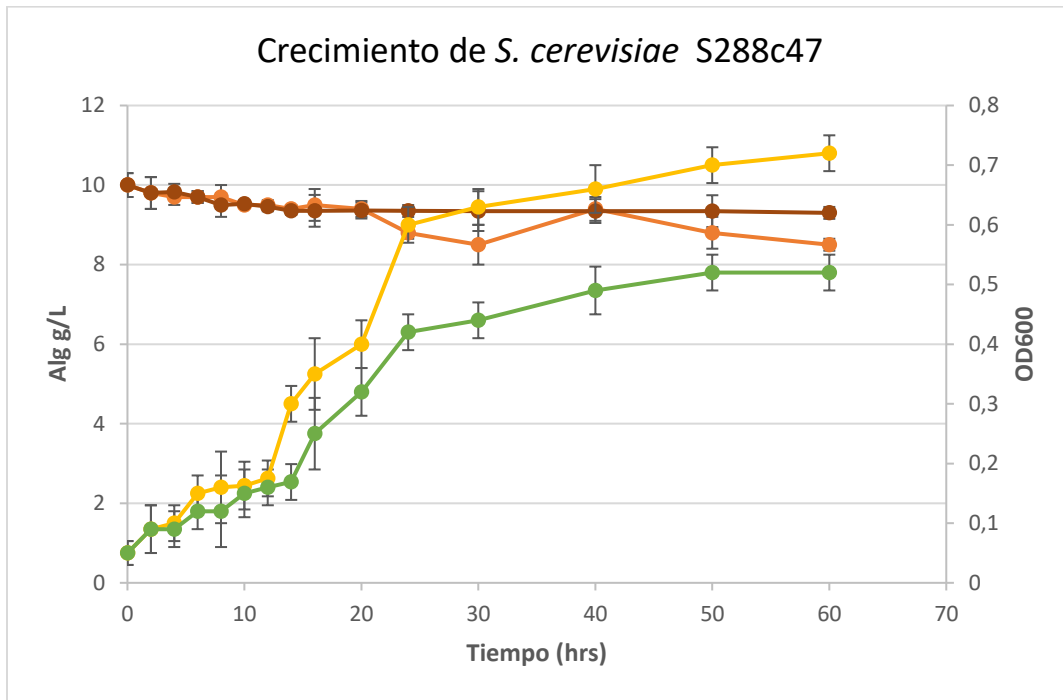


Figura 24. Crecimiento de *S. cerevisiae* S288c47 utilizando proporciones de azúcares 1:10 glucosa:alginato (1:10 g/L). Crecimiento en OD600 de cepa nativa (verde) y transformada (amarillo), degradación de alginato de cepa nativa (café) y transformada (naranja).

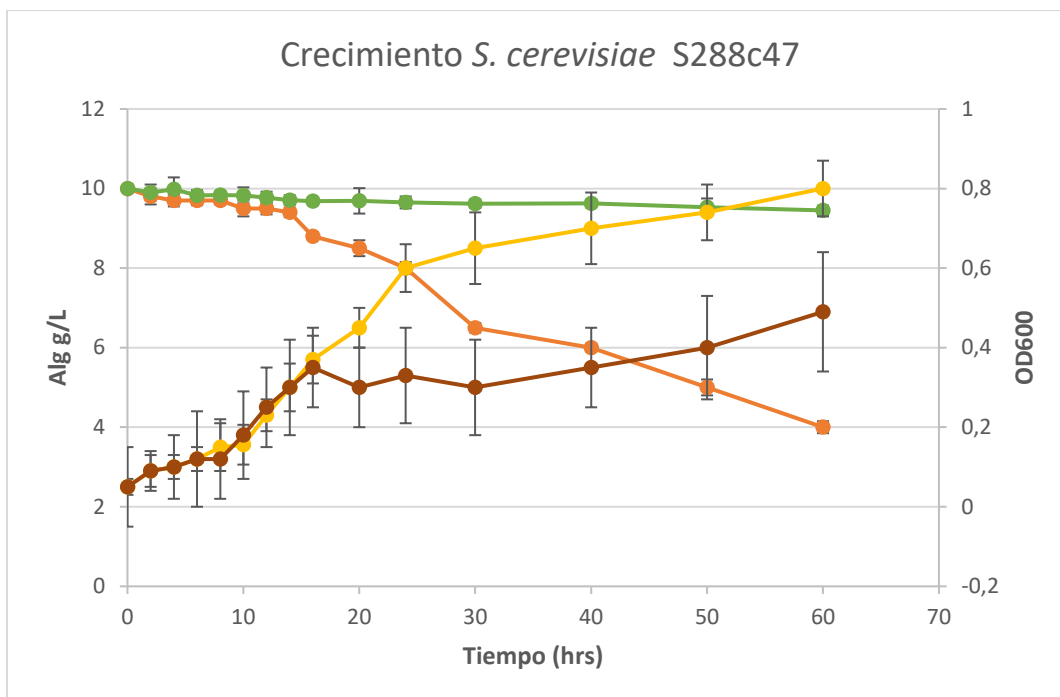


Figura 25. Crecimiento de *S. cerevisiae* S288c47 utilizando proporciones de azúcares glucosa:alginate 1:2 (5:10 g/L). Crecimiento en OD600 de cepa nativa (café) y transformada (amarillo), degradación de alginate de cepa nativa (verde) y transformada (naranja).

Los resultados de crecimiento sugieren que la cepa recombinante S288c-47 podría exhibir una capacidad significativa de degradación de alginate de sodio en cultivos batch. Cabe mencionar que puede ser necesario disponer de una fuente de carbono complementaria, necesaria para que la levadura pueda expresar la ruta heteróloga, y debido a que se encuentra comandada por promotores constitutivos, puede ser una carga metabólica considerable. De esta forma estudios previos cultivando la cepa transformada en alginate como única fuente de carbono no permitieron un crecimiento detectable. Esto indica que para establecer una ruta degradativa de alginate de sodio en un organismo recombinante en la mayoría de los casos será necesario suplementar con otras fuentes de carbono hidrolizables, lo cual ha sido reportado previamente en trabajos con *E. coli* (Wargacki et al., 2012). Por otro lado, la adición de glucosa permite que la cepa nativa pueda también crecer en estos medios de cultivo, luego de agotarse la glucosa en el medio se puede observar una diferencia en que la cepa recombinante crece un 20% más en las condiciones de glucosa:alginate de sodio 1:10 y 1:5, mostrando una degradación de alginate hasta 6 g/L a las 60 hrs, donde se calculan tasas de crecimiento de $\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$ para la cepa nativa y de

0,07 h⁻¹ para la cepa recombinante. Otro aspecto relevante a mencionar son las limitantes de la técnicas de medición del consumo de alginato de sodio en el medio de cultivo, ya que la técnica de HPLC sólo se midió concentración de alginato de sodio total presente en el cultivo y no los distintos oligómeros y monómeros de alginato. Para poder confirmar que la etapa de integración de la ruta metabólica se encuentra activa y es responsable de la asimilación de los ácidos urónicos, es necesario realizar estudios posteriores de caracterización y cuantificación de los monómeros de alginato de sodio remanente después de las fermentaciones, para validar que esta fuente de carbono está realmente siendo integrada al metabolismo de la levadura y determinar tasas de asimilación. Estos estudios futuros permitirán caracterizar de forma más completa la ruta metabólicas y las enzimas asociadas, como también disponer de parámetros cinéticos que contribuyan a la estimación de rendimientos.

Con el objetivo de poder precisar de mejor manera el rendimiento de la ruta metabólica en asociada al crecimiento de la cepa recombinante, se proyecta a futuro implementar mejores técnicas de cuantificación, como el conteo por cámara de Neubauer o Cel counter, que podría entregar información más precisa del crecimiento de *S. cerevisiae*. Esto ocurre porque los medios de cultivo preparados en alginato de sodio poseen cierta turbidez que podría agregar un error a la medición de crecimiento por densidad óptica.

Adicionalmente es necesario realizar otro tipo de validaciones que contribuyen a las inferencias de los resultados de crecimiento, como estudiar la forma en que se están expresando los genes y el correcto plegamiento y expresión de las proteínas, en especial uno de los responsables mas importantes de la etapa asimilatoria, el transportador heterólogos de ácidos urónicos, ya que es necesario recabar información experimental para discernir que los ácidos urónicos que están siendo integrados son responsables éstos o simplemente los muchos transportadores inespecíficos/promiscuos que posee *S. cerevisiae*, considerando su destacable capacidad adaptativa.

Capítulo IV: Molecular Docking de transportadores de ácidos urónicos

1. Introducción

1.1. Modelación de proteínas

De la información disponible en relación a los transportadores que podrían ser de utilidad para los ácidos urónicos en *S. cerevisiae*, existe información sobre las estructuras terciarias de proteínas transmembrana que se han caracterizado para moléculas similares en su estructura como ácido quínico y ácido galacturónico (Benz et al., 2014; Enquist-Newman et al., 2014). Una de los objetivos planteadas en este trabajo consiste en evaluar de forma preliminar con información de literatura y herramientas *in silico*, si existen transportadores que de forma análoga pudiesen ser utilizados para integrar los ácidos urónicos hacia el espacio citoplasmático. Para este propósito, existen herramientas que nos permiten disponer de una aproximación a las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, mediante técnicas de análisis estructurales por homología. Muchas de las metodologías para obtener la estructura de una proteína se basan en la obtención de un templatado que permite en base a una estructura determinada por metodologías experimentales, generar asociaciones con la estructura primaria, estructuras secundarias y terciarias con secuencias conservadas, dentro de éstas RaptorX es una aplicación que permite la obtención de templatados de proteínas de diversa naturaleza con el fin de estudiar la estructura terciaria y determinar sus zonas de interés, como el sitio activo y centro regulador (Bordoli et al., 2008).

1.2. Modelamiento de proteínas por homología

El modelamiento por homología puede entregar una mayor cantidad de información en el caso la existencia de proteínas con características similares, como es el caso de las familia MFS de transportadores, a diferencia de las técnicas *de novo*, que si bien entrega información más personalizada del templatado que se desea analizar pero las tecnologías actuales solo es posible modelar estructuras pequeñas y sencillas y aún carecen de cierta precisión (Kiefer et al., 2009). Dentro de los métodos para la obtención del templatado existen algunos servidores web como también algunos software, que además permiten evaluar de forma complementaria mediante herramientas la calidad el ensamblaje, realizando

comparaciones entre cada una de las estructuras citadas, con el fin de construir un templado nuevo que se adecue a la secuencia primaria ingresada. Muchos de los servidores web requeridos realizan los estudios por homología usando bases de datos genómicas, buscando probabilidades de encontrar un gen anotado que codifique para una proteína específica que permita un rango de identidad aceptable como Protein Data Bank, SCOP, DALI y CATH (disponible en anexo G). Otros métodos más desarrollados permiten realizar análisis más finos según las estructuras que se están estudiando mediante análisis de alineamientos múltiples que son apropiados para poder establecer relaciones estructurales cuando el templado y la proteínas de interés poseen una identidad menor al 25%. Estos métodos son más sensibles para poder detectar asociaciones remotas entre la secuencia y la estructura de una proteína.

Existen un tercer tipo de métodos que realizan un alineamiento en el cual se comparan secuencias de proteínas con otras de estructuras de proteínas conocidas mediante un mecanismo de corrección de los alineamientos según la función esperada de las proteínas. Es un método recomendado cuando no se tiene información sobre la estructura de interés.

1.3. Estrategia de modelación

De estas metodologías se desprenden estrategias de construcción de modelos dependiendo de las condiciones iniciales que se tengan producto del alineamiento por secuencias de DNA y funciones putativas de la proteínas a modelar, dentro de las cuales las más utilizadas son: i) ensamble de cuerpos rígidos (Bordoli et al., 2008), ii) Unión por reconstrucción coordinada (Marti-Renom et al., 2000), iii) satisfacción de restricciones espaciales (Sali, 1995), iv) modelamiento por loops y v) reconstrucción por cadenas laterales (Bower et al., 1997; Fischer and Eisenberg, 1996). La primera metodología se centra en realizar un análisis por homología centrado en las posiciones de los carbonos alfa de los aminoácidos más conservados en el espacio tridimensional, de forma que se superponen las estructuras más conservadas con el fin de establecer patrones de mayor similitud para construir los templados. Finalmente se establece una corrección de las cadenas laterales mediante un análisis por dinámica molecular o utilizando patrones observados por difracción de rayos X. La segunda metodología utiliza el principio de modelación de una proteína por un fragmentos de 6 péptidos que pueden ser de hasta 100 clases diferentes, de esta forma los carbonos alfa de la estructura pueden ser utilizados como una guía para construir diversas clases de hexapéptidos que van dilucidando las

zonas conservadas de las proteínas (Vriend et al., 1994). Todos los fragmentos ensamblados son comparados con hexapéptidos de estructuras conocidas y se van configurando las zonas más importantes que son características de su actividad o función, como el sitio activo de las enzimas hasta tener un templado coherente. La tercera estrategia de refinamiento de modelos consiste en observar las restricciones que se encuentran generalmente presentes en la posición y orientación de los residuos de la cadenas peptídica, las que son comparadas con un templado. Posteriormente se consideran restricciones estereoquímicas que permiten afinar las comparaciones entre las posiciones, ángulos y superficies de contacto (Brucoleri, 1993).

La cuarta estrategia para refinar modelos estructurales consiste en cálculos iterativos del plegamiento de una proteína, generalmente enfocados en la estructura secundaria. Dado que dentro de una familia de proteínas pueden existir distintas variabilidades estructurales causadas sustituciones, deleciones e inserciones que ocurren principalmente en los loops de las estructuras éstas pueden determinar la especificidad funcional de un marco de proteínas, contribuyendo a las características del sitio activo y sitios de unión. Por lo general es muy útil para poder describir y refinar zonas de la proteína que interaccionan con un ligando (Marti-Renom et al., 2000).

Posteriormente es necesario para poder establecer las diferencias específicas entre las proteínas que se desea modelar y las estructuras conocidas que se están utilizando como templado, y para esto se utiliza la quinta estrategia descrita, en la cual se utiliza la información disponible sobre las diferentes interacciones intermoleculares entre los residuos de los aminoácidos que le otorgan la estabilidad a la estructura terciaria. Dentro de esto los más útiles suelen ser los puentes disulfuro, donde se estudia el efecto de interacción entre la cadena principal y las cadenas laterales, como también la distribución de los ángulos a lo largo de la estructura de la proteína, los cuales son complementados con cálculos energéticos y de estabilidad de la estructura (Ver anexo G).

2. Metodología *in silico*

Todas las aproximaciones anteriormente mencionadas pueden ser complementarias bajo un modelo que pueda integrar, compatibilizar y automatizar éstas herramientas. Este trabajo se enfoca en el uso de estas herramientas para la construcción de las estructuras de los transportadores de ácido galacturónico (GAT-1) de *Neurospora Crassa* y ácido

quínico (quTD) de *Aspergillus nidulans*, con el objetivo de comprender más sobre su función y capacidad de transporte alternativo de ácidos urónicos.

Para la obtención de las estructuras de los transportadores, se realizó un modelamiento por homología identificando las proteínas con estructuras resueltas experimentalmente, que generalmente son por difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear, las cuales fueron utilizadas como un templado para modelar las estructuras de los transportadores. Posteriormente se analizan los residuos correspondientes a una secuencia objetivo y estructura del templado de interés mediante alineamientos con otras estructuras, construcción de un modelo 3D en base a los estudios de homología evaluando la calidad del modelo. Esta metodología se ha logrado automatizar mediante el uso de algoritmos que permiten rápidamente una estructura que puede ser evaluada con criterios de (Kopp and Schwede, 2004; Marti-Renom et al., 2000).

Para la obtención del templado de los transportadores se utilizó el servidor web RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>), que permite mediante la estructura primaria, realizar predicciones de las estructuras secundarias y terciarias de la proteína de interés realizando alineamientos con secuencias homólogas de la base de datos, en las cuales se proyectan algunas estructuras. Posteriormente el servidor posee una etapa de valorización para medir la calidad de construcción de la estructura modelada.

Una vez construidos los templados se realizó un estudio de Docking Molecular utilizando la herramienta SwissDock (<http://www.swissdock.ch>), con el objetivo de predecir las interacciones moleculares de los transportadores quTD y GAT-1 con los ligandos ácido D-Galacturónico, ácido D-Quínico y DEHU. Dado que la interacción es representada en espontaneidad por la energía libre de Gibbs, es necesario realizar un estudio de molecular docking diseccionado en tres partes, de forma tal que se estudia la interacción del ligando con la zona interna (IN), intermedia (INSIDE) y externa (OUT). Posteriormente se compararon los valores de G obtenidos para establecer comparativas en las interacciones, y determinar el movimiento del ligando dentro de la estructura tubular de la proteína transmembrana como también la dirección.

3. Resultados y Discusión

Las estructuras obtenidas para el transportador GAT-1, se basaron en el templado 4GBY, correspondiente a un transportador de D-xilosa de la familia MFS y de fuente biológica *E. coli* (Figura 26). Este posee una estructura de barril con 10 dominios transmembrana, y un tipo de transporte simporte. El transportador de ácido D-Galacturónico modelado posee una estructura de un tamaño de 50 kDa, con 10 dominios transmembrana predichos por el servidor web RaptorX (Figura 27). Se logra observar la formación de un canal de transporte en el interior que sugiere un transporte similar al de la familia MFS, en el cual los ligandos podrían pasar por difusión facilitada hacia el medio intracelular a través de una interacción con la estructura interna del barril. Otro templado que fue citado adicionalmente por la construcción del servidor es el transportador de simporte 4PYP, correspondiente al transportador de glucosa en *Homo sapiens*, en cual es considerado una proteína más distante a los transportadores de ácidos urónicos, y por lo cual posee un menor grado de homología.

Existen algunas dificultades para la construcción de la estructura dado a que la cercanía de los templados utilizados distan en parentesco filogenético a el transportador de interés. De todas maneras la estructura final reportada por el servidor coincide con los patrones de estructuras correspondientes a transportadores de azúcares, con al menos 12 dominios transmembrana que disponen de la capacidad para formar un canal cuyos aminoácidos que lo conforman y que poseen una orientación de sus residuos hacia el interior pueden interactuar de forma favorable para permitir el paso de los ligandos.

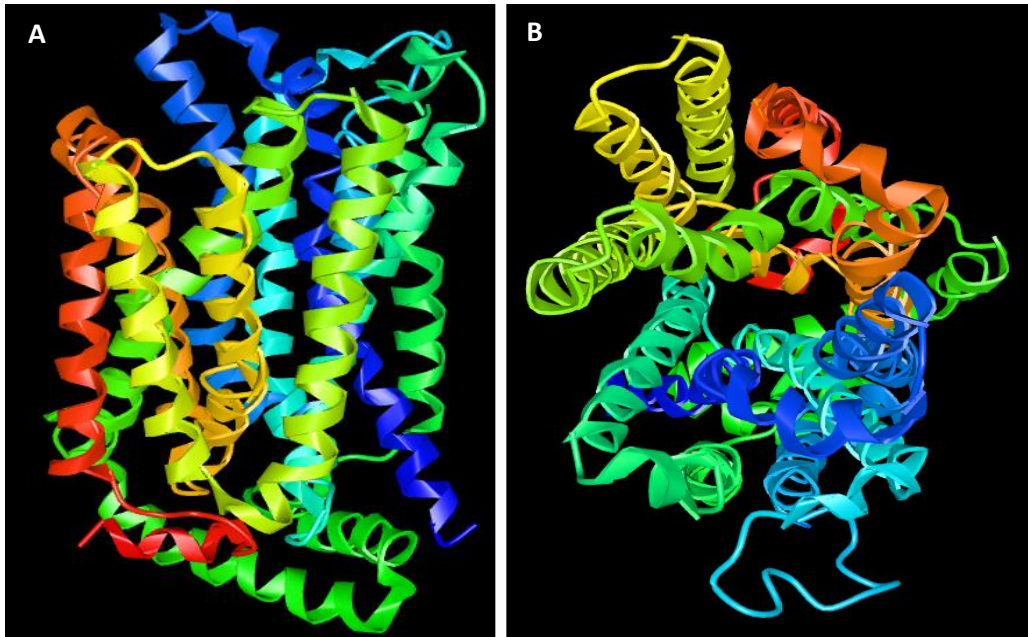


Figura 26. Modelo estructural 3D del templado 4GBY, correspondiente a un transportador de D-xilosa en *E. coli*.

Existen sutiles diferencias entre la estructura del transportador GAT-1 y quTD modelada, en comparación con los templados. Existen en GAT-1 ciertas secuencias peptídicas en los extremos N-terminal y C-Terminal que no pudieron ser modeladas en su estructura, lo cual puede estar dado por la presencia de péptidos señales presentes en la codificación de la proteína. Esto se pudo validar de forma preliminar utilizando el servidor Signal-P 4.1 (Petersen et al, 2011) que de forma complementaria permite especular sitios de cortes que revelen la presencia de péptidos señales, para expresión a nivel transmembrana. Se idéntifica un sitio de corte en la posición 37 del gen GAT-1 mientras que en la posición 29 de quTD. Además este programa identificó dominios no citoplasmáticos presentes en ambos genes. En la Figura 27A se logran observar las longitudes de las zoas no modeladas tanto en los extremos N como C terminal. Se desconoce la función de la zona que no fue correctamente modelada en las zonas C-Terminal de las proteínas transportadoras. Con el objetivo de aclarar esto, se realizó un análisis por homología BLAST-P contra la base de datos NCBI utilizando sólo los últimos 16 aminoácidos de la estructura (C-terminal). Los resultados indican que sólo están presentes como dominios exclusivos de los transportadores de quinato en los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, ya que no poseen identidad ni similitud con otros transportadores de azúcares conocidos. Se requieren mayores estudios para refinar partes del modelo que no han sido correctamente

modeladas, y que se desconocen estructuras conocidas que pudiesen indicar su función mediante modelamiento por homología.

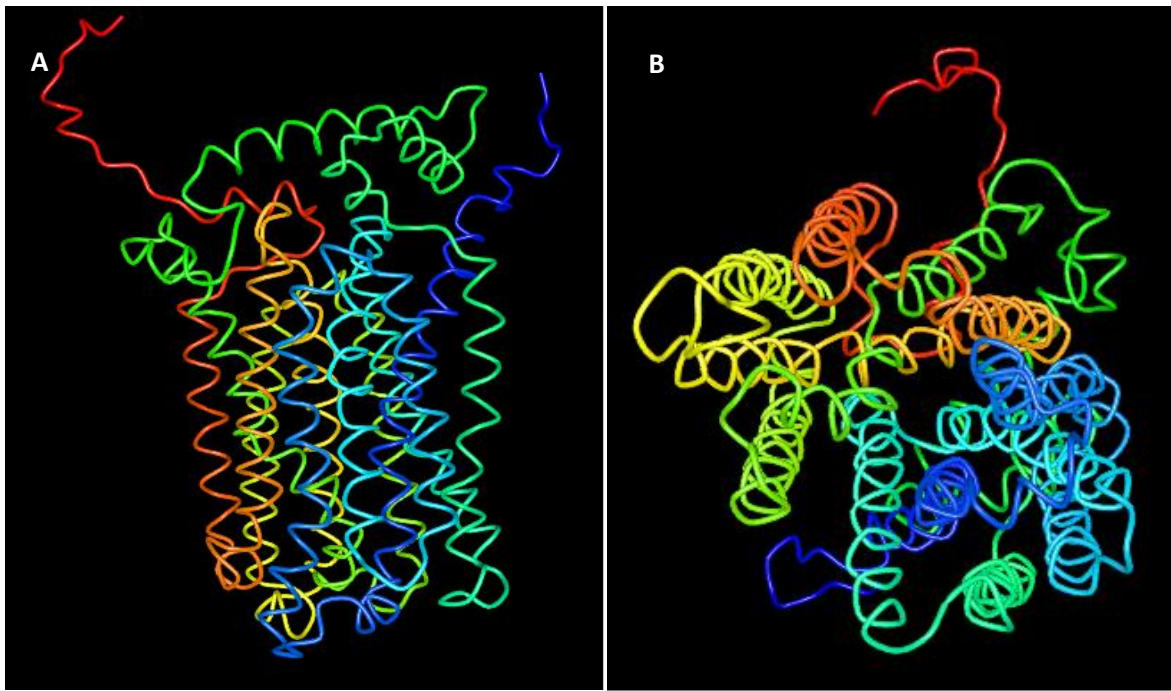


Figura 27. Modelo estructural 3D del transportador de ácido D-Galacturónico, Peso aproximado 50 kDa.

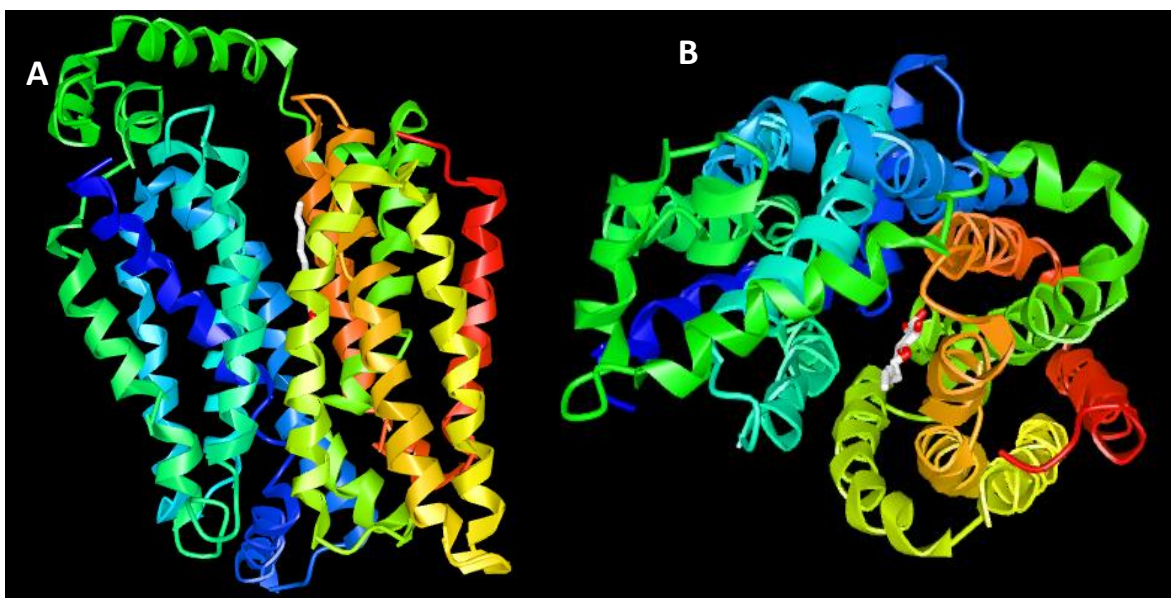


Figura 28. Estructura del templado 4PYP correspondiente al transportador de glucosa en *Homo sapiens*.

Respecto a los resultados de Molecular Docking se identifica una interacción de los transportadores modelados y los ligando en distintos grados. La espontaneidad con la cual es medida corresponde a las variaciones de la energía libre de Gibbs (ΔG), en casa una de las secciones de la estructura del transportador modelado. Para evaluar la pertinencia de el uso de los templados para la construcción del transportador GAT-1, es necesario evaluar la interacción de estos entre 4GBY (transportador de xilosa proveniente de *E. coli*), con los ácidos urónicos en su forma DEHU. Las proyecciones muestran una interacción con espontaneidad creciente desde la zona extracelular, como se rpresenta en la figura 29. Posteriormente la interacción a través de canal se puede observar en la figura 30, interaccionando con los polipéptidos los dominios transmembrana, en la visión lateral del barril (Figura 30A), y posteriormente se observa la interacción con el DEHU en la zona intracelular en la figura 31C. Si bien estas interacciones sólo describen la espontaneidad de la interacción de el ligando con las cadenas laterales orientadas hacia el interior del barril, se pueden observar pequeñas diferencias en la interacción si comparamos la espontaneidad en términos de enegía libre calculada por los modelos entre cada uno de los transportadores y los ligandos correspondientes. Tanto los templados 4GBY, 4PYP, como los transportadores quTD y GAT-1 pudieron interactuar en sus tres secciones IN, INSIDE y OUT (figuras 33 - 39), identificando niveles generalmente decreciente en su mayoría. En la tabla 6, se logra observar diferencias importantes en la interacción con los ligandos DEHU, ácido D-galacturónico (GA) y ácido quínico (QA), que corresponden a los ligandos nativos de estas estructuras modeladas. Con el fin de estudiar el efecto de docking con los ligandos se incluyeron en el análisis estudios de docking con los templados utilizados 4GBY y 4PYP, quienes demostraron también poseer cierta interacción con éstos. Se observa que existen diferencias en los valores ΔG de las estructuras modeladas y templados, que siguen un patrón de secuencia desde la zona de entrada del ligando (IN), pasando por la zona de comunidad interna del canal (INSIDE) y salida (OUT) (tabla 6), correspondiente al medio intracelular. De esta forma también es importante estudiar que existen variaciones importante de los cálculos de energía libre en la trayectoria del ligando desde la entrada hacia la salida del canal, que oscilan entre los valores de -3 y-7 kcal/mol aproximadamente, por lo que es necesario estudiar el promedio de los valores en todas las posiciones y ángulos de interacción de las tres secciones del canal, para esto se dispone de los valores Avg_IN, Avg_INSIDE y Avg_OUT, en los cuales observan valores alrededor de los -3y -4 kcal/mol. Una de comprender de mejor forma estas diferencia de valores de energía libre se presenta en la ilustración de la figura 40, que muestra la trayectoria del ligando en

términos de las variaciones de los valores más pequeños de energía libre y sus promedios en las posiciones de los canales. El valor IN muestra un valor promedio mayor de energía libre, y éste va disminuyendo a medida que pasa por el canal (INSIDE), para llevar a un menor valor que es el OUT, entrando al medio intracelular por difusión de forma facilitada. Este patrón revela por sí misma que el transportador GAT pudiese ser un candidato para transportar los ácidos urónicos, al cumplir por el patrón decreciente que favorece la espontaneidad de la interacción de ligando hacia el medio intracelular como se representa en la figura 40. Los templados 4GBY y 4 PYP muestran una alta interacción en la zona de entrada del ligando, pero ésta se pierde a medida que pasa por el canal en un caso y en el otro al momento de pasar por el extremo hacia el medio intracelular, indicando que no son propicios para poder transportar el ligando DEHU. El transportador quTD muestra un comportamiento diferente a los anteriores, en las cuales la espontaneidad disminuye a medida que pasa por el canal hacia el medio intracelular, lo que puede sugerir que no es un buen transportador de ácidos urónicos.

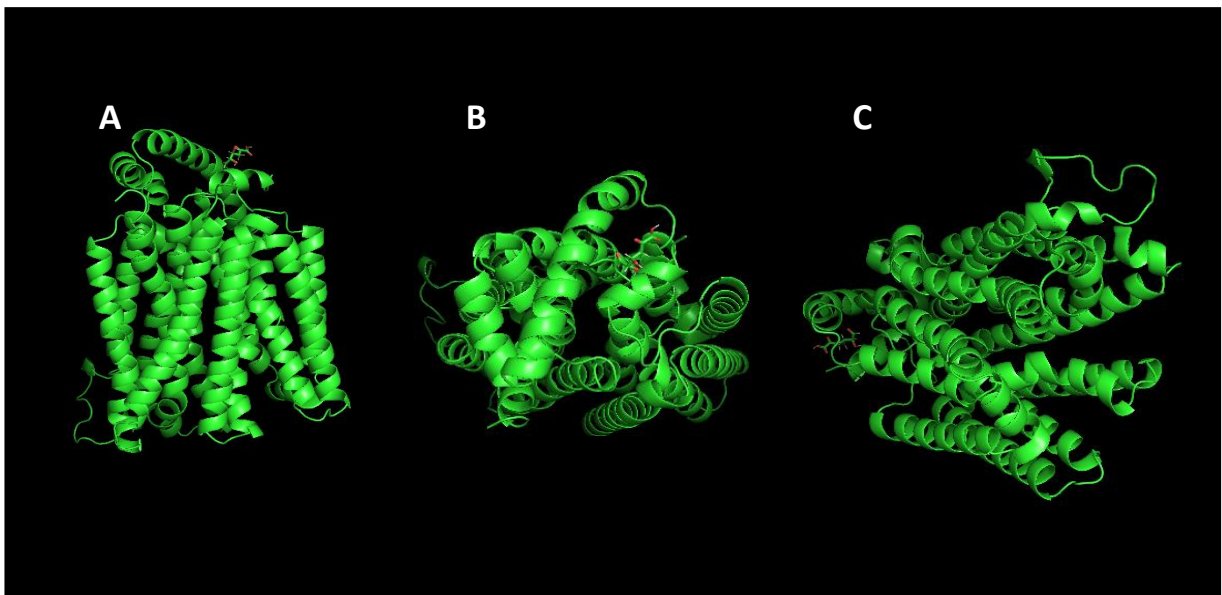


Figura 29. Molecular Docking entre la estructura 4GBY (verde) y DEHU (rojo). Proyección: OUT. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

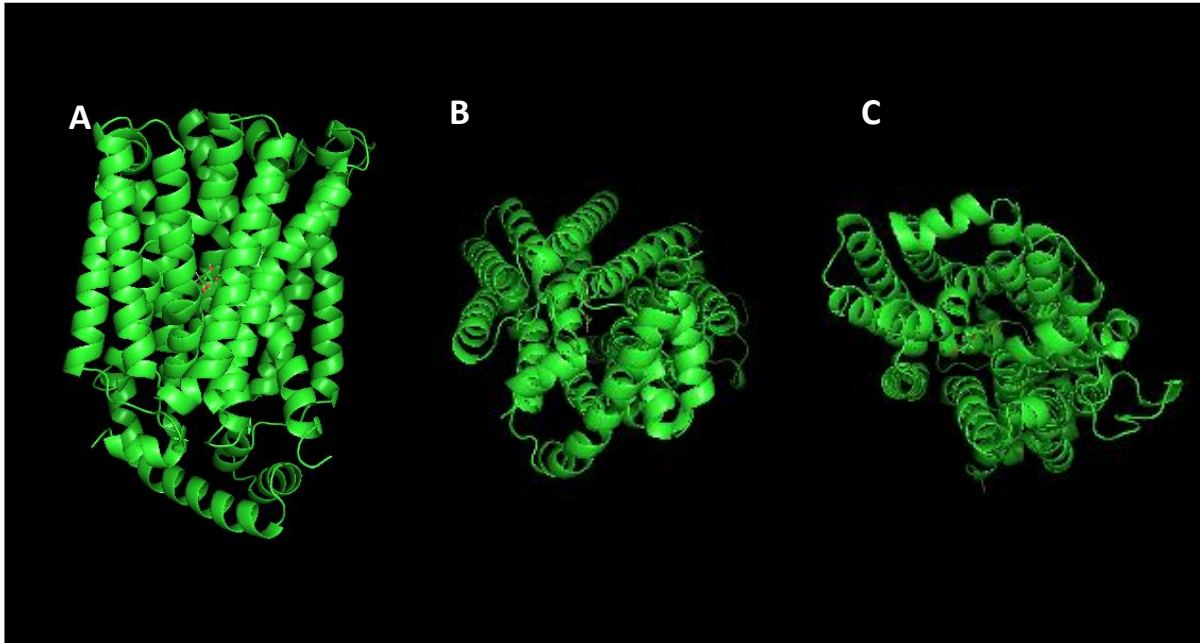


Figura 30. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y DEHU. Proyección: INSIDE. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

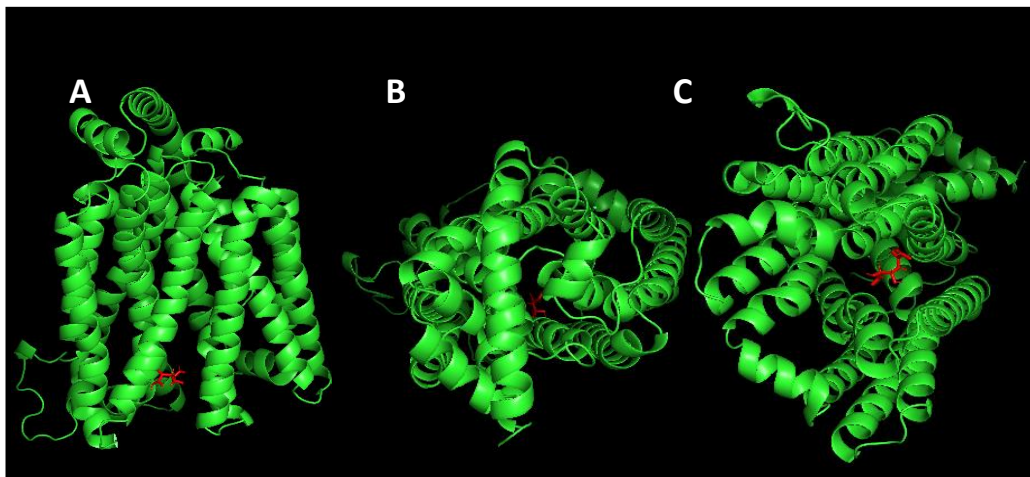


Figura 31. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y DEHU. Proyección: IN. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

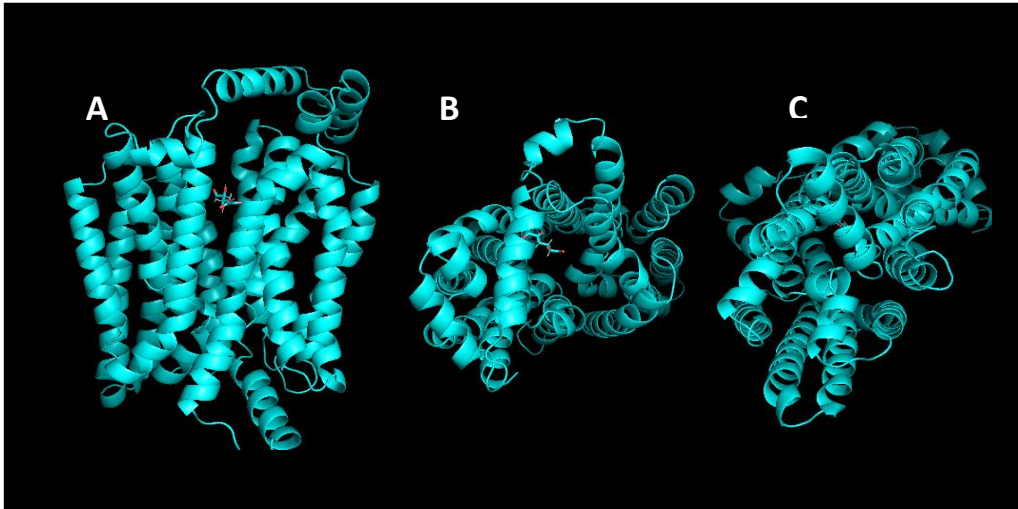


Figura 32. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: OUT. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

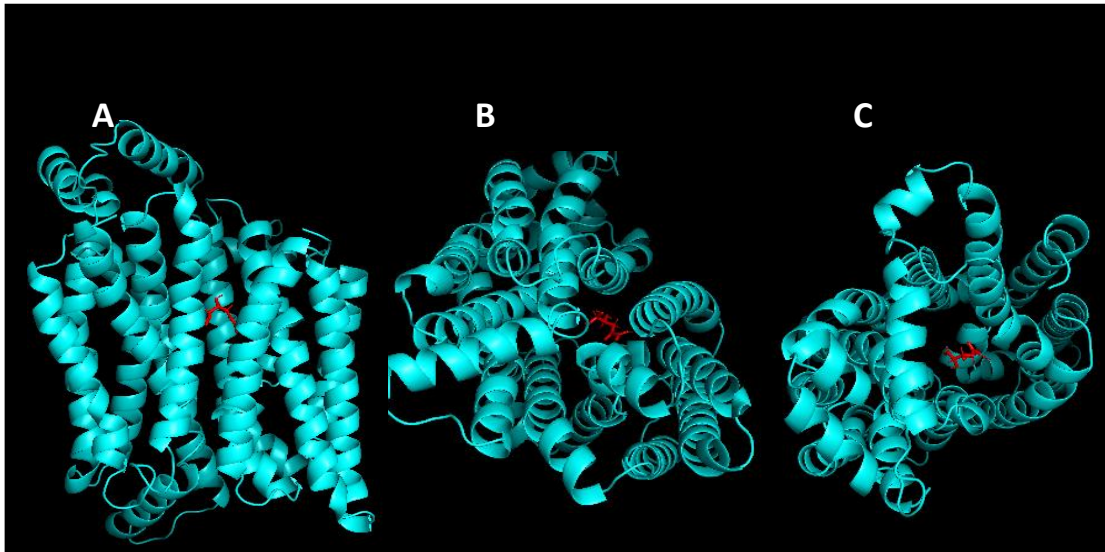


Figura 33. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: INSIDE. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

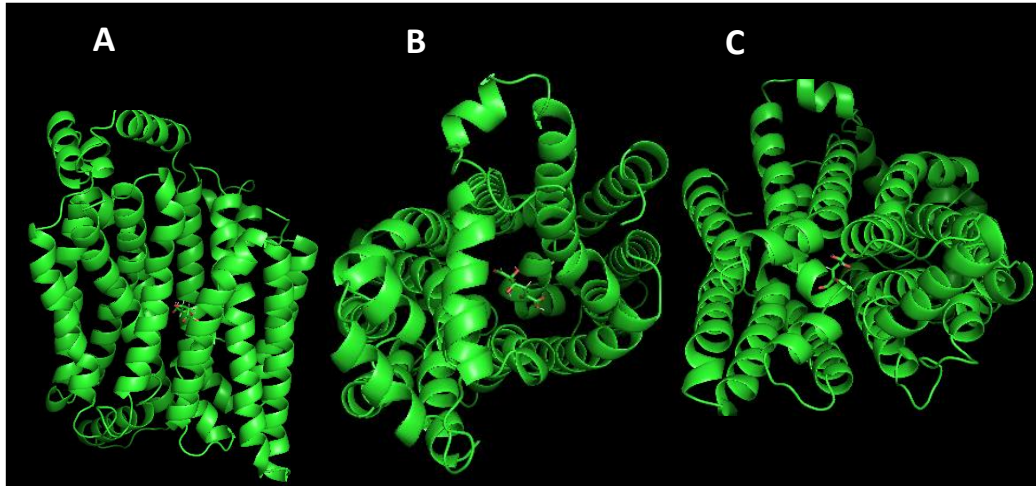


Figura 34. Molecular Docking entre la estructura 4GBY y ácido D-galacturónico. Proyección: IN. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

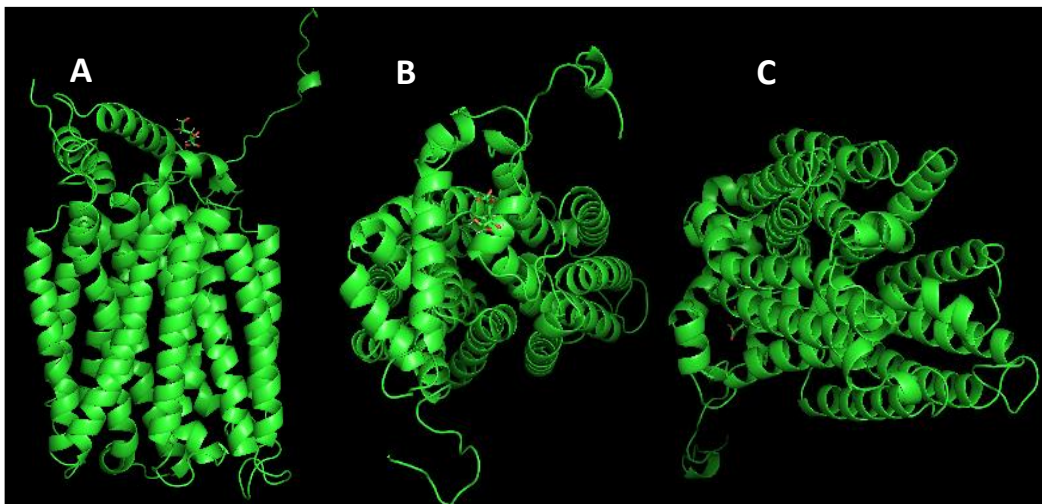


Figura 35. Molecular Docking entre la estructura GAT y DEHU. Proyección: OUT. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

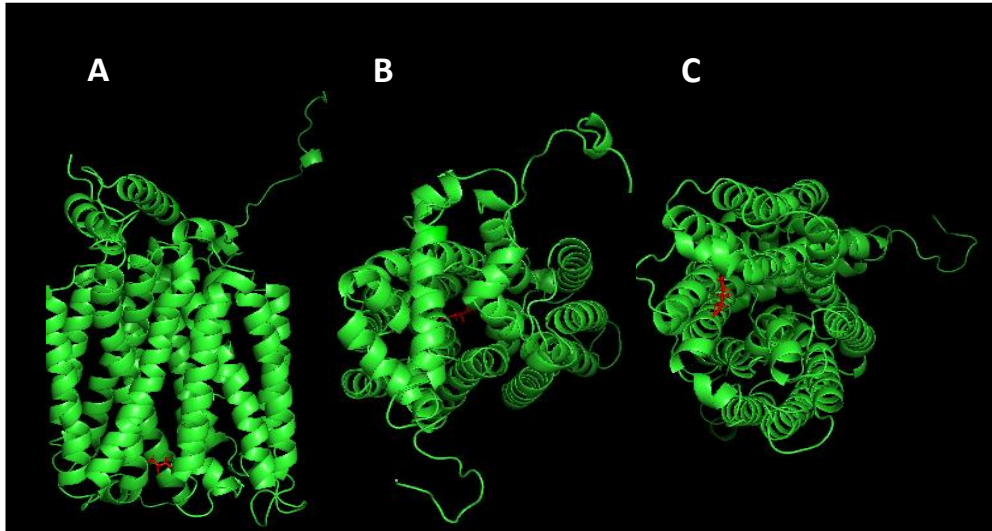


Figura 36. Molecular Docking entre la estructura GAT y DEHU. Proyección: IN. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

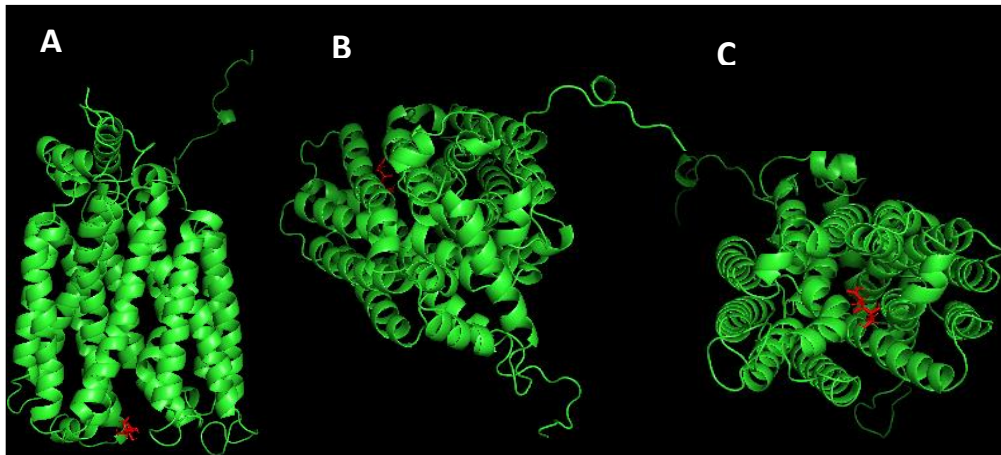


Figura 37. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: IN. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

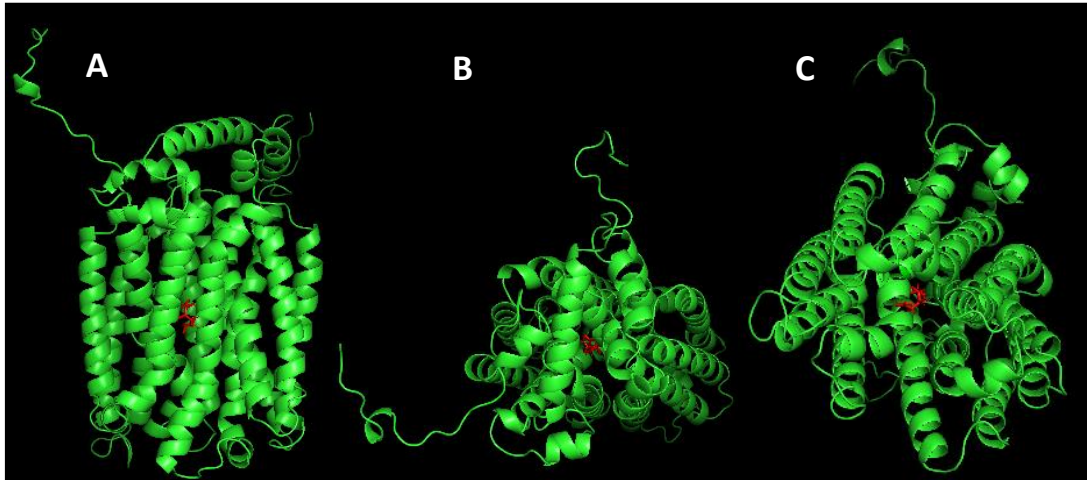


Figura 38. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: INSIDE. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

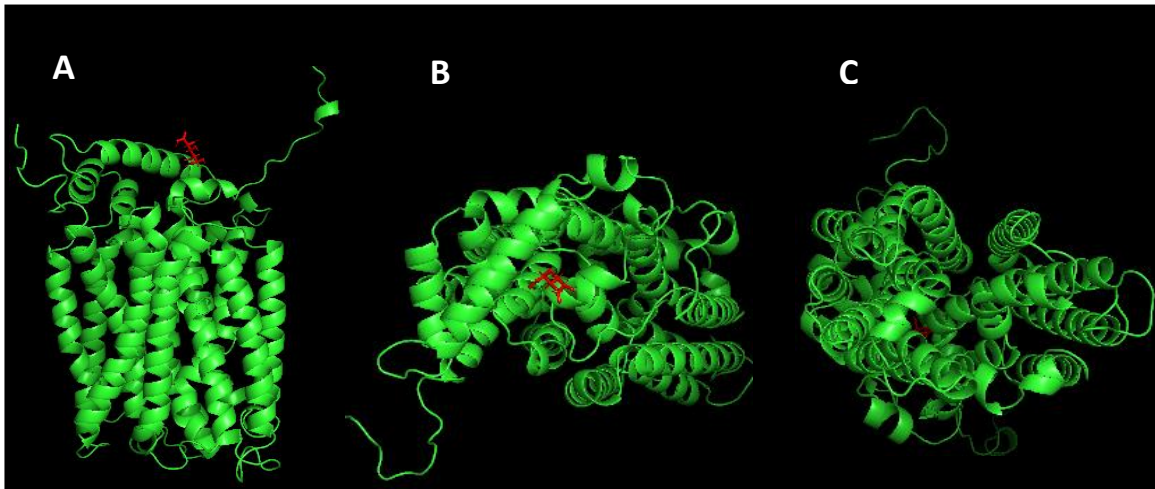


Figura 39. Molecular Docking entre la estructura GAT y ácido D-Galacturónico. Proyección: OUT. A: vista lateral del barril, B: vista barril cara extracelular, C: vista cara intracelular.

Tabla 6. Energía libre de Gibbs estimada en las posiciones IN, INSIDE y OUT de Molecular Docking. Se muestra el detalle de las tablas de mayor valor presente.

<i>Docking</i>		<i>ΔG [kcal/mol]</i>		
Proteína	ligando	OUT	INSIDE	IN
4GBY	DEHU	-6,53	-6,39	-6,47
4PYP	DEHU	-6,50	-6,35	-6,63
GAT	DEHU	-6,07	-5,52	-5,93
qUTD	DEHU	-6,28	-7,40	-7,16
4GBY	GA	-6,80	-6,74	-6,41
4PYP	GA	-6,63	-6,42	-6,74
GAT	GA	-6,15	-5,46	-6,07
qUTD	GA	-6,44	-7,43	-7,54
4GBY	QA	-6,47	-6,33	-6,33
4PYP	QA	-6,33	-6,33	-6,26
GAT	QA	-5,66	-5,46	-5,61
qUTD	QA	-6,94	-6,86	-6,83

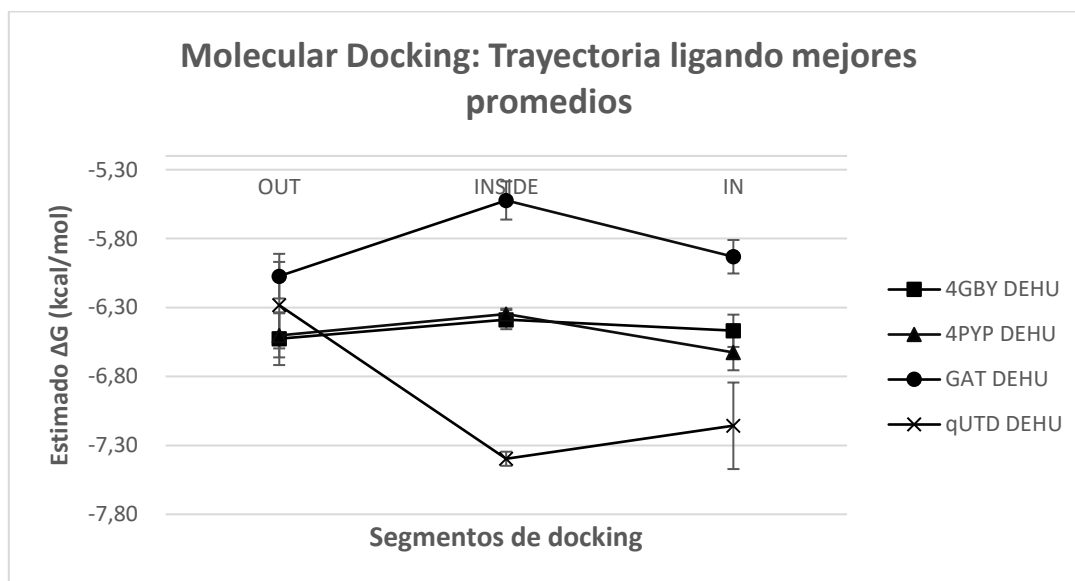


Figura 40. Comportamiento de la espontaneidad en la interacción ligando-transportador de las proteínas MFS 4GBY (templado del transportador xilosa) , 4PYP (templado del transportador glucosa), GAT (estructura del transportador ácido D-galacturónico) y qUTD (estructura del transportador ácido D-quinico).

Para validar la posible efectividad de los transportadores de estudiados para los monómeros de alginato, es necesario además de los estudios in silico realizar prueba de transporte ya sea mediante la purificación de la enzima o mediante análisis de crecimiento

utilizando alginato como única fuente de carbono. Las limitantes de este estudio radican en que el clon obtenido S288c-47 no posee los genes necesarios para la expresión de los transportadores de ácidos urónicos, sino que sólo todos los otros genes necesarios para establecer su ruta degradativa. Por consiguiente es necesario realizar estudios adicionales que permitan la integración de éste gen faltante en la ruta degradativa de *Saccharomyces cerevisiae* S288c, los cuales pueden ser realizado mediante la construcción de vectores episomales que posean únicamente le gen faltante de tranpostador putativo de ácidos urónicos en estudio, y transformar nuevamente el clon S288c-47 con vectores de expresión que contengan las enzimas faltantes.

Capítulo V: Construcción de vectores episomales y Análisis enzimáticos de la ruta

1. Metodología

1.1. Construcción de vectores de expresión en *S. cerevisiae*

Debido a que en los estudios previos la cepa transformada no contenía los genes codificantes para la proteína transportadora fue necesario considerar buscar otro método de transformación que permitiera ingresar el gen faltante de la ruta metabólica. Para esto se realizaron construcciones de vectores episomales utilizando el kit comercial Sure Vector® (Agilent Genomics, California), mediante modificaciones y ensamblajes utilizando Gibson Assembly.

Los genes fueron amplificados utilizando PCR phusion con partidores con cola para Gibson assembly para ligar en el vector episomal Surevector pSV-HPH. Se realizó una construcción según las indicaciones del fabricante (Sure Vector Cloning & Expression Kit, Agilent). Se utilizaron los módulos resistencia a ampicilina como selección bacteriana (*Bla*), origen de replicación pUC para la obtención de un alto número de copias en *E. coli*, sitio de replicación autónoma yARS para vector episomal en Slot XP1, resistencia a neomicina (NeoR) y promotor de expresión constitutiva (*Gal1*) para el gen de interés *Aly*. Posteriormente el vector construido fue perpetuado mediante transformación de células electrocompetentes *E. coli* TOP10, almacenado en glicerol stock y extraído mediante el kit GeneJet plasmid miniprep extraction (Invitrogen®). El vector construido fue integrado utilizando el protocolo y diseño de partidores de ligación del manufactador para obtener pSV-*Aly*, el cual fue posteriormente modificado en una segunda oportunidad para sustituir el marcador de selección, por el ya utilizado previamente gen resistencia a hygromicina (HPH). Para esto se diseñaron partidores que flanquearan el gen NeoR y lo sustituyeran por el módulo completo de expresión HPH construido en experimentos anteriores utilizando la técnica de Gibson Assembly. Con este vector pSV-HPH-*Aly*, se utilizó como base para la construcción de los otros vectores que disponen de los genes de la ruta degradativa de alginato; enzimas *Oly*, *DehR*, *KDGK* y *KDGPA* y transportadores *quTD* y *GAT-1*. Estos vectores se contruyeron mediante partidores para Gibson assembly, amplificando el molde del vector y sustituyendo el gen de interés.

1.2. Condiciones de crecimiento

Los vectores construidos fueron previamente perpetuados en *E. coli* TOP10 y concentrados para realizar transformaciones en *S. cerevisiae* S288c y clon S288c-47 para la obtención los transformantes con los vectores episomales detallados en la tabla 7, utilizando los protocolos de transformación descritos anteriormente en la metodología del capítulo III (1.1). Los transformantes fueron crecidos en matraces de 250 mL con 100 mL de medio YPD suplementados con Hygromicina B 100-250 µg/mL para selección y cultivo líquido, y crecidos durante 60 hrs, para posteriormente extraídas las proteínas totales según protocolos previamente descritos.

1.3. Análisis de las enzimas presentes en Sc47

Para evaluar la presencia de las proteínas de la ruta degradativa de alginato, fue necesario realizar purificaciones independientes de los transformantes, ya que éstos poseían una cola de histidina 6x HisTag para que pudiesen ser purificadas por cromatografía de afinidad. Esto con el fin de poder identificar la expresión a nivel extracelular de las enzimas del tipo liasas, como también a nivel intracelular las proteínas encargadas en la integración metabólica de los ácidos urónicos a piruvato.

Los cultivos crecidos se lavaron en medio PBS en tubos falcon de 50 mL tres veces con centrifugados por 10 minutos a 4500 RPM. Se guardó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0.1 volúmenes de PBS (10 mL) para ser posteriormente lisado en sonicador de pedestal. Posteriormente se realizó una concentración con sulfato de magnesio al 50% durante 16 hrs para concentrar las proteínas totales del pellet, y finalmente se llevó a una diálisis en el kit Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis 3.5K (ThermoFischer®, Inc.) Cassettes con 3 mL de capacidad. La diálisis se llevó a cabo en buffer PBS pH 7.2 durante 8 hrs para obtener el purificado total de las proteínas para posteriores estudios. Se preparó una purificación utilizando la resina Ni-NTA Gravity Flow (Qiagen®), para la purificación de los 3 mL dializados mediante un buffer de lisis, lavado y elución.

1.4. Electroforesis en SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en cámaras Biorad®. Para esto fue necesario la preparación de un gel de poliacrilamida en condiciones polimerizantes al 12%. Se cargaron muestras de sobrenadante (medio extracelular) y pellet (proteína intracelular), usando buffer de carga 6X SDS, para las muestras del lisado total, lisado por columnas, lavado y elución. La actividad específica de las enzimas se midió en las fracciones de elución en las cuales se observó su presencia en éstas por tamaño de cada una.

1.5. Ensayos enzimáticos

La actividad de la enzimas alginato liasa se midió por la formación de dobles enlaces que ocurre producto del mecanismo de β -eliminación de la misma, produciendo DEHU en los extremos no reductores. Esto se puede medir por espectrofotometría de absorción a 235 nm. Se cargaron 5 uL en placas de 96 pocillos y se agregó 180 uL de alginato de sodio al 0,2% y se agitó en el mismo espectrofotómetro de placa durante 5 segundos antes de cada medición. Se establece que 1 unidad de la actividad es definida como la cantidad de enzimas requerida para producir una OD de 1,0 ajustado a 232 nm por minuto.

La actividad de DEHU reductasa se realizó con el lisado celular que contenía en un ensayo espectrofotométrico midiendo la oxidación de NADPH cuando el DEHU es reducido a KDG. La reacción consistió en un buffer con 50 mM HEPES (pH 7,4) NaCl 100 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,005% de Tritón X-100, 4 mM de NADPH a un volumen final de 50 uL. La reacción comienza agregándole 5 uL del crudo lisado.

La actividad de KDGK se realizó midiendo el consumo de NADH asociado con KDGPA y la actividad de lactato dehidrogenasa (LDH). KDG se rompe a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, luego la enzimas LDH reduce el piruvato en lactato oxidando NADH. Se preparó un buffer con 50 mM HEPES (pH 7,4) NaCl 100 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,005% de Tritón X-100, NADPH 4 mM, 10 mM ATP, 5 mM de KDG, 2 μ g/mL de KDGPA purificada y 50 μ g/mL de LDH en un volumen final de 50 μ L. KDGPA se midió bajo las mismas condiciones considerando el consumo de NADH por la enzima LDH.

2. Resultados y Discusiones

2.1. Vectores Episomales

La tabla 7 muestra los tamaños aproximados de los constructos utilizados para realizar las posteriores transformaciones necesarias para purificar las enzimas y medir sus actividades.

Tabla 7. Construcción de vectores episomales obtenidos mediante SureVector y Gibson Assembly

Nombre	Gen contenido	Resistencia	Tamaño (bp)
pSV-Aly	Alginato liasa	Neomicina	6994
pSV-HPH-Aly	Alginato liasa	Higromicina B	7692
pSV-HPH-Oly	Oligoalginato liasa	Higromicina B	9201
pSV-HPH-DeHR	DEHU reductasa	Higromicina B	7938
pSV-HPH-KDGK	Ceto-deoxi-gluconato quinasa Ceto-deoxi-gluconato fosfato	Higromicina B	7800
pSV-HPH-KDGPA	aldolasa	Higromicina B	7461
pSV-HPH-QuTD	transportador de ácido quínico transportador de ácido	Higromicina B	8484
pSV-HPH-GAT-1	galacturónico	Higromicina B	8575

2.2. Electroforesis de proteínas

Se presentan los resultados de purificación de las enzimas por columna de afinidad en el protocolo gravity Flow Ni-NTA. Es posible identificar tanto en el sobrenadante como en el precipitado celular las enzimas alginato liasas de 31 kDa. La intensidad de las bandas sugieren que la mayor parte de la proteína heteróloga se está expresando a nivel intracelular en el citosol, mientras que en el sobrenadante la cantidad de proteína presente puede ser menor. La enzima alginato liasa no fue posible de obtener purificada, debido a que no pudo ser retenida en la columna de afinidad. Estudios previos han detectado que enzimas del tipo alginato liasa han presentado interrupciones en la adquisición de su estructura que se ha traducido en una alteración de su actividad (Huang et al., 2013). Sin embargo, es posible observar que la activación del péptido señal permite la excreción a nivel extracelular de la enzima, pero gran parte de ella se sigue encontrando en el citosol, y no es liberado al medio extracelular. Estudios previos de expresión heteróloga de enzimas han presentado diversos inconvenientes en la expresión de enzimas hidrolíticas, debido a los mecanismos naturales de defensa del organismo modelo, como ubiquitinación y

degradación, agregación vacuolar y proteólisis. En esta respuesta de la levadura pueden estar interaccionando muchos fenómenos como la estructura y las glicosilaciones que puede estar sufriendo la proteína, y como se han evidenciado previamente que las colas de histidinas pueden afectar la actividades, se especula que esto haya afectado el correcto plegamiento y que por lo tanto haya sido reconocida por patrones de glicosilaciones que señalicen vías degradativas, y que por lo tanto el péptido señal no haya sido reconocido correctamente por la maquinaria celular. Estudios posteriores son requeridos para poder comprender más en detalle un mecanismo de expresión y purificación de enzimas del tipo alginato liasas en *S. cerevisiae*, bajo promotores no necesariamente constitutivos que promuevan una expresión estable y eviten problemas de plegamiento. Además es necesario incursionar en otros mecanismos de excreción celular, que tengan menor relación con sistemas de compartimentalización celular o bien que eviten relación con los mecanismo de ubiquitinación y degradación por proteólisis de proteínas mal plegadas.

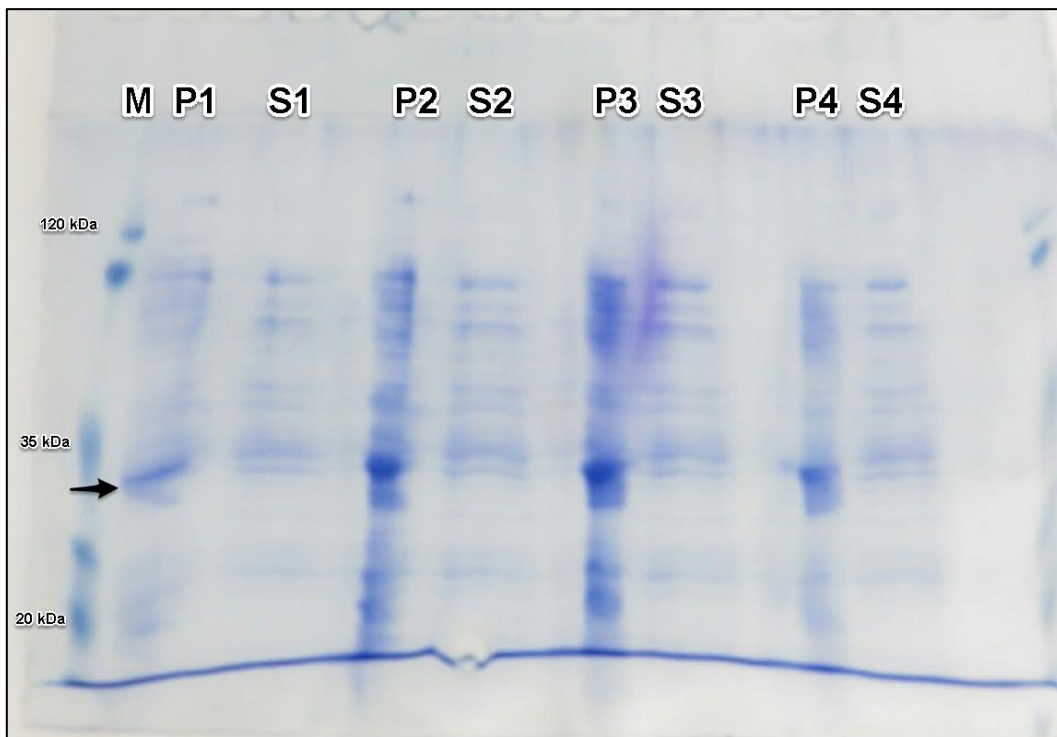


Figura 41. Análisis de enzima alginato liasa (Aly) recombinante (31 kDa) en *S. cerevisiae* S288c transformada con pSV-HPH-Oly. M: Pierce prestained protein MW marker (ThermoFischer cat:26612), P1-4: pellet celular, S1-4: sobrenadante.

La figura 42 muestra la expresión y purificación de la siguiente enzima de a ruta metabólica oligo alginato liasa, que fue identificada con un tamaño de 87 kDa mostrando una gran

producción de la proteína. La presencia de la banda se puede observar en las fracciones de lavado de la purificación, a medida que se cargan las fracciones de elución es posible un incremento de la proteína. Esta enzima por ser un tamaño mayor, posiblemente pueda afectar que el protocolo de purificación deba ser modificado disminuyendo las concentraciones de imidazol en los lavados, e incrementándola en la purificación. Se observa una proteína de menor tamaño en las fracciones de lysis, de un tamaño inferior a los 85 kDa, que aparece también en las fracciones de lavado, pero va desapareciendo a medida que se avanza en las fracciones de elución. Esto puede deberse a una proteína nativa con propiedades similares a la columna de afinidad en las condiciones que se purificó la proteína como también un problema en la expresión de la proteína, que genera un tamaño más pequeño y que por lo tanto interacciona de forma diferentes con la columna de afinidad.

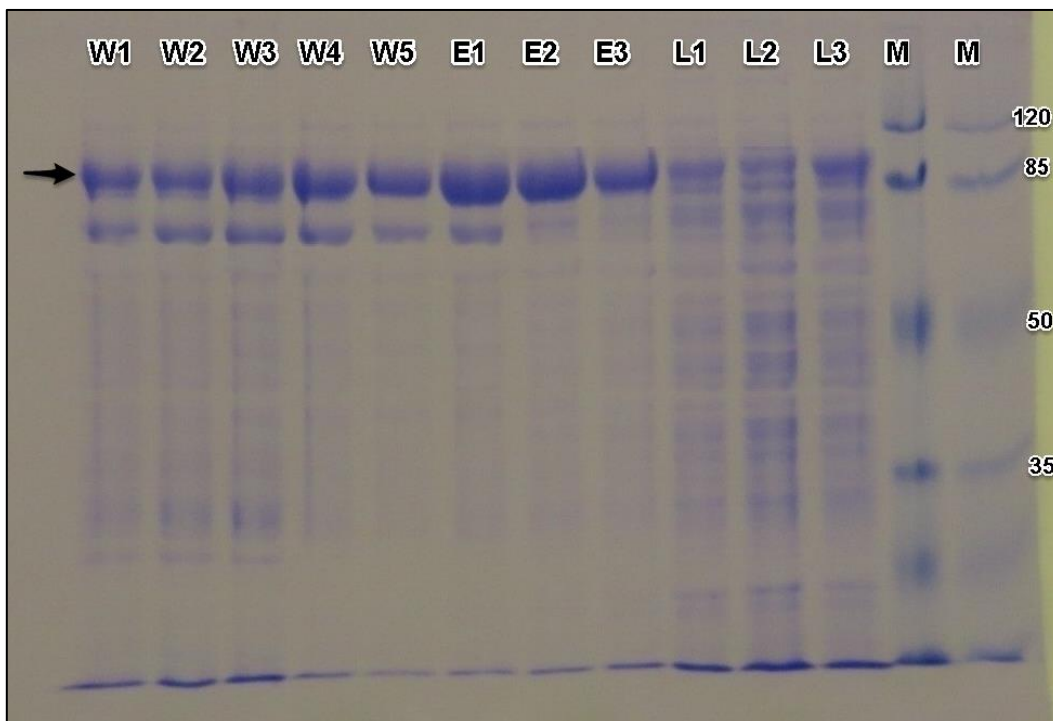


Figura 42. Análisis de enzima Oligoalginato liasa (Oly) recombinante (87 kDa) en *S. cerevisiae* S288c transformado con pSV-HPH-Oly, purificada por Ni-NTA gravity-flow. M: Pierce prestained protein MW marker (ThermoFischer cat:26612), L1-3: repeticiones del lisado celular, W1-5: buffer lavado a través de columna, E1-3: buffer elución a través de columna.

Más adelante se observan los resultados para las enzimas responsables de la integración de los ácidos urónicos al metabolismo de *S. cerevisiae*, mediante la implementación de la ruta heteróloga de Entner-Doudoroff. La primera enzima corresponde a la enzima DEHU reductasa, la cual no fue posible de identificar mediante SDS-PAGE la presencia de la proteína. Los resultados de purificación por afinidad tampoco mostraron la retención de

alguna proteína ni la elución de ésta. Si bien estudios previos mostraron que los genes se encuentran específicamente, es posible que ésta proteína sea degradada por la maquinaria celular de *S. cerevisiae*, como también que la expresión no sea lo suficientemente importante para que se pueda visualizar en el gel.

La siguiente enzima ceto deoxigluconato quinasa, se puede observar en un tamaño de 34 kDa (figura 43), en el cual se puede observar en el lisado celular, como también en las fracciones de lavado. El tamaño está presente en las fracciones de elución, donde se observa una banda única correspondiente al tamaño de la enzima. En los lavados hay una banda que aparece cercano a los 50 kDa, lo cual puede sugerir que la enzima posiblemente forma estructuras de dimerización, lo cual se ha evidenciado en otros estudios de enzimas de este tipo (Ohshima et al., 2004).

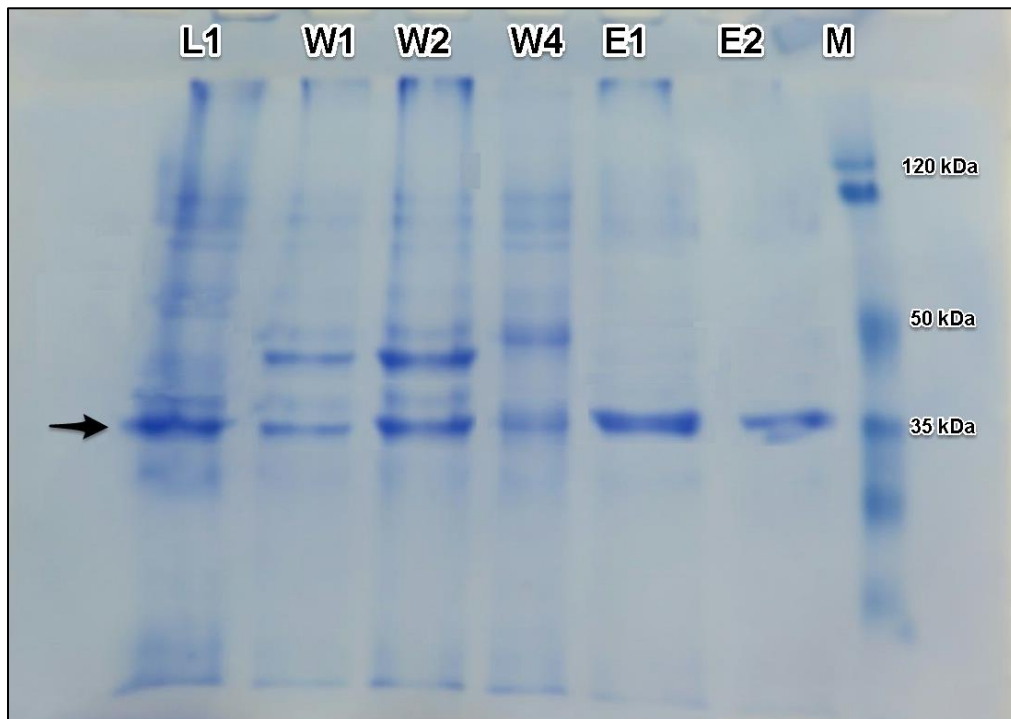


Figura 43. Preparación de enzima ceto-deoxigluconato quinasa (KDGK) recombinante (34 kDa). M: Pierce prestained protein MW marker (ThermoFischer cat:26612), L1: lisado celular, W1-2: buffer lavado a través de columna, E1-2: buffer elución a través de columna.

Posterior a la enzima ceto deoxi gluconato quinasa, es necesario evaluar la presencia de la enzima ceto deoxigluconato fosfato aldolasa (KDGPA), la cual se puede observar en un SDS-PAGE de la figura 44, se observa en el lisado total una banda prominente de tamaño de 40 kDa aproximadamente, que no corresponde al tamaño esperado de la proteína KDGPA. A medida que se realizan los lavados la proteína comienza a salir de la columna

hasta llegar al lavado 4 (W4), mientras que en las fracciones de elución comienza a aparecer el tamaño esperado de KDGPA (11 kDa). No existen reportes que pudiesen sugerir que la enzima KDGPA forma estructuras diméricas que pudiesen afectar la interpretación su un patrón electroforético, por lo que este resultado podría indicar la formación de cuerpos de inclusión en los precipitados totales celulares, mientras que a medida que se eluyen las fracciones se logra observar parte de la proteína que mantiene su plegamiento correcto. Este fenómeno es un indicado que los promotores constutivos para la expresión en vectores episomales puede no ser la mejor estrategia para la actividad de la enzima KDGPA. Por otro por lo general los patrones de expresión presentes genes que se han integrado en el genoma por recombinación homóloga presentan menores niveles de expresión utilizando los mismos promotores consitutivos (Flagfeldt et al., 2009)

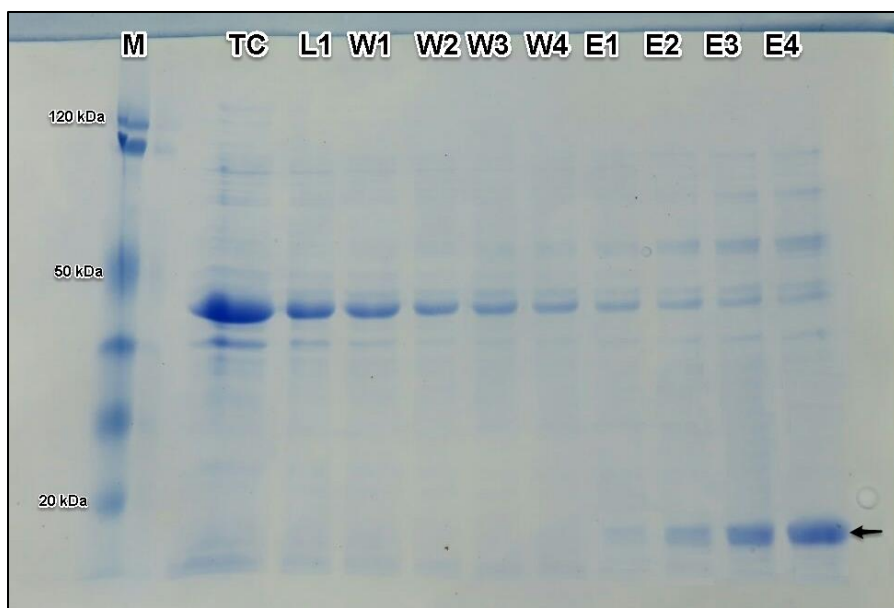


Figura 44. Preparacion de enzima ceto-deoxiguconato fosfato aldolasa (KDGPA) recombinante (11 kDa). M: Pierce prestained proteín MW marker (ThermoFischer cat:26612), TC: Lisado celular total L1: proteínas en lisis buffer, W1-4: buffer lavado a través de columna, E1-4: buffer elución a través de columna.

2.3. Actividad enzimática de las fracciones

La actividad de las enzimas alginato y oligo alginato liasas fue medida en función de la formación de los azúcares reductores generado en la reacción. La actividad detectada para

la enzima alginato liasa es de 61,6 U por mg de proteína, mientras que la actividad generada para la enzima oligoalginato liasa es de 18,9 U/mg. En otros estudios, la actividad de la enzima alginato liasa en *E. coli* puede llegar al orden de los 1324 U/mg de proteína (Shimizu et al., 2003). Por otro lado la baja actividad de la enzima oligo alginato liasa puede afectar la capacidad de generación de ácidos urónicos que pueden ser incorporados en la ruta. En otros microorganismos recombinantes se ha logrado expresar la actividad de enzimas del tipo oligo alginato liasa del orden de los 29 U/mg de proteína (Jagtap et al., 2014). La enzima se encuentra tanto en el sobrenadante como también a nivel intracelular, la enzima medida corresponde a la enzima total. Estudios posteriores se requieren para poder evaluar la actividad específica de la enzima liberada exclusivamente hacia el medio extracelular. De esta forma la actividad de las enzimas podría ser aumentada estudiando la causa, si bien puede estar asociada a los niveles de expresión o bien a la capacidad de liberación extracelular por el metabolismo de *S. cerevisiae*.

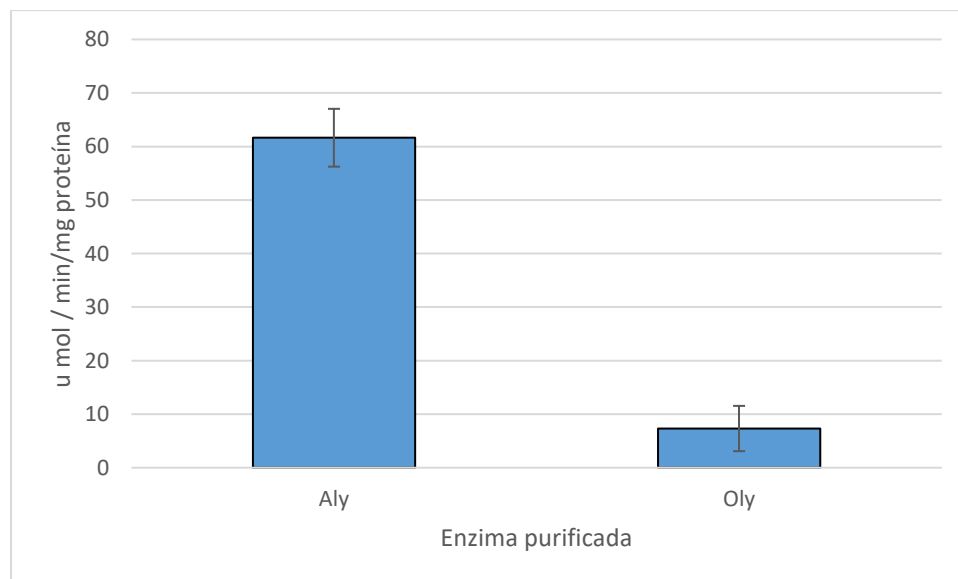


Figura 45. Actividad específica de enzimas Aly y Oly producidas en *S. cerevisiae* S288c con vector pSV-HPH-Aly y pSV-HPH-Oly en las eluciones de purificación por Ni-NTA gravity Flow..

La actividad de las otras enzimas la ruta se pueden apreciar en la figura 45, en la cual la enzima KDGK y KDGPA fueron medidas de forma acoplada con la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, evaluando el consumo de NADH. La actividad de la enzima KDGK es de 0,23 μ mol por minuto por mg de proteína, un 30% inferior a la actividad de KDGPA

de 0,342 μmol por minuto por mg de proteína. La actividad de la enzima DehR no pudo ser determinada en fracciones de elución de proteína purificada, ya que no se observa presente en los resultados anteriores de SDS-PAGE. A pesar de haber sido medida en el crudo en función del consumo de NADPH (Ver Tabla Anexos I.), no es posible obtener resultados concluyentes sobre su actividad debido a la cantidad de enzimas presentes en el crudo, que potencialmente podrían interactuar como agentes generadores y/o consumidores de este cofactor.

La actividad de las enzimas puede ser considerada deficiente si se desea expresar de forma heteróloga una ruta más eficiente, sin embargo el consumo de cofactores genera un desbalance redox en el organismo y plantea la necesidad de implementar una mejora para alcanzar el equilibrio. Una alternativa propuesta en estudios previos menciona que una forma de equilibrar el balance redox podría ser integrar la ruta degradativa de manitol para llegar a razones entre 1 – 1,6 entre consumo de NADH por DehR y generación de éste por la enzima involucrada manitol deshidrogenasa (Contador et al., 2015).

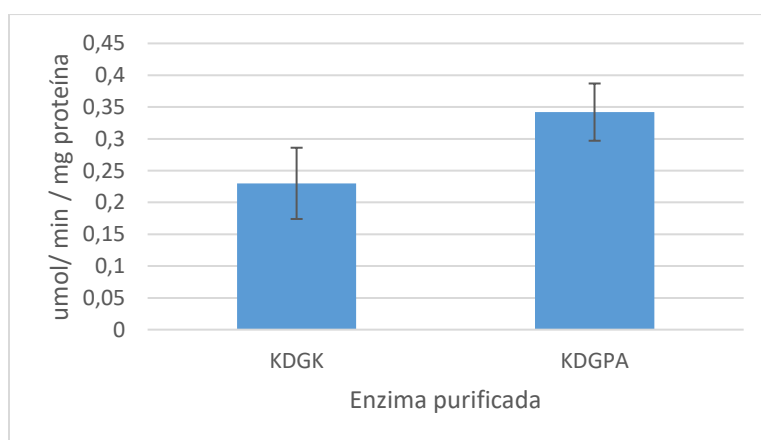


Figura 46. Actividad enzimática de las enzimas KDGK y KDGPA obtenidas desde los transformantes de *S. cerevisiae* S288c con los vectores pSV-HPH-KDGK y pSV-HPH-KDGPA en eluciones de purificación mediante Ni-NTA gravity Flow.

Mediante estudios de termoestabilidad y adaptación al pH se pueden buscar alternativas a las enzimas KDGK y KDGPA, con el fin de evaluar cuáles son los factores adicionales que podrían contribuir al aumento de la actividad específica de cada una de ellas, de una forma tal que genere un aumento en el rendimiento global de la ruta degradativa. Así también se requieren evaluar otros factores que pueden afectar a la actividad de la enzima, como la regulación de los niveles de expresión en *S. cerevisiae*, dada la alta carga metabólica incorporada al establecer 6 genes herólogos mediante promotores constitutivos, dentro de lo cual la regulación en la expresión de las enzimas en proporción a su actividad y a la

estequiometría de la ruta específica podrían ayudar a precisar un incremento de la actividad degradativa de alginato.

Las enzimas del tipo KDGPA son conocidas por requerir para su correcto funcionamiento la participación de un cluster del tipo [Fe-S] (Benisch and Boles, 2014), siendo éste factor un limitante para el aprovechamiento máximo de su capacidad catalítica. La enzima expresada en este estudio posee un valor comparable con la actividad reportada de otras fuentes heterólogas como *E. coli* mediante promotores constitutivos para *S. cerevisiae* (Enquist-Newman et al., 2014), sin embargo es un 35% inferior a las reportadas con mayor actividad, obtenidas desde el microorganismo *Vibrio splendidus*. Para el caso particular esta enzima de tipo aldolasa, es necesario evaluar mecanismos para aumentar la disponibilidad de cluster [Fe-S] ya sea mediante la implementación de péptidos de fusión a las enzimas aldolasas o bien el uso de péptidos señal para la traslocación hacia los complejos de ensamblaje de hierro-sulfuro a nivel citosólico, para lo cual es necesario una mayor profundización sobre los mecanismos de señalización en *S. cerevisiae*.

Finalmente aspectos generales como la optimización de codones, compartimentalización de una ruta sintética de Entner-Doudoroff y análisis de los flujos metabólicos asociados para los genes heterólogos también deben ser considerados para incrementar la actividad en las enzimas involucradas.

Conclusiones

Se ha obtenido una cepa recombinante de *S.cerevisiae* S288c-47, que contiene la ruta degradativa de alginato, consistente en las enzimas Alginato liasa, Oligoalginato liasa, DEHU reductasa, KDG quinasa y KDGP aldolasa. Adicionalmente se tiene una versión de este transformante con un vector episomal pSV-HPH-GAT-1 que posee un crecimiento en condiciones de alginato de sodio 10 g/L suplementado con glucosa 5 g/L, con un crecimiento de un 20% superior a la nativa. Las actividades enzimáticas fueron detectadas en clones independientes mediante vectores episomales con los módulos de expresión para cada enzima independiente. No fue posible evaluar la expresión y actividad de DEHU reductasa en los transformantes. Estudios de Molecular Docking sugieren que GAT-1 es un transportador del tipo MFS candidato para la asimilación de ácidos urónicos en *S. cerevisiae*.

Bibliografía

- Abdel-Fattah A., Edress M. 1972. A Study on the polysaccharide content of *Ulva Lactuca* L. *Qual. Plant Mater. Veg.* **1**:15–22.
- Alexandrov NN, Nussinov R, Zimmer RM. 1996. Fast protein fold recognition via sequence to structure alignment and contact capacity potentials. *Pac. Symp. Biocomput.*:53–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390223>.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–10. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602>.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski P a, Duarte FM, Netto OVC, Missawa SK, Galzerani F, Costa GGL, Vidal RO, Noronha MF, Dominska M, Andrietta MGS, Andrietta SR, Cunha AF, Gomes LH, Tavares FC a, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD, Pereira G a G. 2009. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* **19**:2258–70. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2792172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Azodi A, Taylor WR. 1996. Homology modelling by distance geometry. *Fold Des.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080179>.
- Bairoch A, Apweiler R. 2000. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**:45–48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=10592178.
- Barbosa MJ, Hoogakker J, Wijffels RH. 2003. Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomol. Eng.* **20**:115–123. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034403000339>.
- Basso LC, Basso TO, Rocha SN. 2010. Ethanol Production in Brazil : The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: . *Biofuel Prod. Dev. Prospect.*, Vol. 1530, p.
- Bauer EF, Pretorius LS. 2000. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency : How to Survive the Making of Wine - A Review. *Yeast Stress responde Ferment.* **21**:27–51.
- Benisch F, Boles E. 2014. The bacterial Entner-Doudoroff pathway does not replace glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* due to the lack of activity of iron-sulfur cluster enzyme 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biotechnol.* **171**:45–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.025>.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **28**:15–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102453&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Benz JP, Protzko RJ, Andrich JM, Bauer S, Dueber JE, Somerville CR. 2014. Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. *Biotechnol. Biofuels* **7**:20. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3933009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Berezina O V, Brandt A, Yarotsky S, Schwarz WH, Zverlov V V. 2009. Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain: high level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new *Clostridium saccharobutylicum* isolate. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**:449–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19674858>.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M. 1977. The Protein Data Bank. *Eur. J. Biochem.* **80**:319–324.
- Bixler HJ, Porse H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* **23**:321–335.
- Blanch HW, Simmons B a, Klein-Marcuschamer D. 2011. Biomass deconstruction to sugars. *Biotechnol. J.* **6**:1086–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834132>.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. 2008. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* **4**:1–13. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.197>.
- Borneman AR, Forgan AH, Pretorius IS, Chambers PJ. 2008. Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* **8**:1185–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778279>.
- Bower MJ, Cohen FE, Dunbrack RL. 1997. Prediction of protein side-chain rotamers from a backbone-dependent rotamer library: a new homology modeling tool. *J. Mol. Biol.* **267**:1268–1282. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283697909268>.
- BP. 2017. BP Statistical Review of World Energy 2017. *Br. Pet.* 1-52 p. <http://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review-2017/bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report.pdf>.
- Branduardi P, Longo V, Berterame NM, Rossi G, Porro D. 2013. A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **6**:68. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3662618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**:557–577.
- Brenner SE, Chothia C, Hubbard TJ. 1998. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:6073–8. <http://www.pnas.org/content/95/11/6073.abstract>.
- Briand X, Morand P. 1997. Anaerobic digestion of *Ulva* sp . 1 . Relationship between *Ulva* composition and methanisation. *J. Appl. Phycol.* **9**:511–524.
- Brucoleri RE. 1993. Application of Systematic Conformational Search to Protein Modeling. *Mol.*

Simul. **10**:151–174.

- Chakraborty S, Santra SC. 2008. Biochemical composition of eight benthic algae collected from Sunderban. *Indian J. Mar. Sci.* **37**:329–332.
- Chynoweth D. 2002. Review of Biomethane from marine biomass; University of Florida.
- Colovos C, Yeates TO. 1993. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **2**:1511–1519.
- Contador CA, Shene C, Olivera A, Yoshikuni Y, Buschmann A, Andrews BA, Asenjo JA. 2015. Analyzing redox balance in a synthetic yeast platform to improve utilization of brown macroalgae as feedstock. *Metab. Eng. Commun.* **2**:76–84.
- Conte L Lo, Ailey B, Hubbard TJP, Brenner SE, Murzin AG, Chothia C. 2000. SCOP : a Structural Classification of Proteins database. *Nucleic Acids Res.* **28**:257–259.
- Contreras-Martel C, Matamala A, Bruna C, Poo-Caamaño G, Almonacid D, Figueroa M, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. 2007. The structure at 2A resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex. *Biophys. Chem.* **125**:388–396.
- Contreras A, Hidalgo C, Henschke P a, Chambers PJ, Curtin C, Varela C. 2014. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:1670–8.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3957604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**:10881–90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849754>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC338945>.
- Costa D a, de Souza CJ a, Costa PS, Rodrigues MQRB, dos Santos AF, Lopes MR, Genier HL a, Silveira WB, Fietto LG. 2014. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**:3829–40.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973951&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dawes CI, Lawrence J, Cheney D, Matheson A. 1973. Ecological Studies of Floridian *Euchema*. III: Seasonal variation of carrageenan, total carbohydrate, protein and lipid. *Bull. Mar. Sci.* **647**.
- Dinçer I, Midilli A, Kucuk H. 2014. Progress in Sustainable Energy Technologies Vol II: Creating Sustainable Development. Vol. 2 1-10p.
- Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Gowda CLL. 2010. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Appl. Energy* **87**:732–742.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030626190900302X>.
- Enquist-Newman M, Faust AME, Bravo DD, Santos CNS, Raisner RM, Hanel A, Sarvabhowman P, Le C, Regitsky DD, Cooper SR, Peereboom L, Clark A, Martinez Y, Goldsmith J, Cho MY, Donohoue PD, Luo L, Lamberson B, Tamrakar P, Kim EJ, Villari JL, Gill A, Tripathi S a, Karamchedu P, Paredes CJ, Rajgarhia V, Kotlar HK, Bailey RB, Miller DJ, Ohler NL, Swimmer C, Yoshikuni Y. 2014. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic

- yeast platform. *Nature* **505**:239–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291791>.
- Felix, Ghaderi A, Fink GR, Stephanopoulos G. 2014. Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science (80-.)*. **346**:71–75. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1257859>.
- Fischer D, Eisenberg D. 1996. Protein fold recognition using sequence-derived predictions. *Protein Sci.* **5**:947.
- Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L, Nielsen J. 2009. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*:545–551.
- Flockner H, Braxenthaler M, Lackner P, Jaritz M, Ortner M, Sippl MJ, Flockner H, Braxenthaler M, Lackner P, Jaritz M, Ortner M, Sippl MJ. 1995. Progress in fold recognition. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **23**:376–386.
- Fonvielle M, Weber P, Dabkowska K, Therisod M. 2004. New highly selective inhibitors of class II fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**:2923–2926.
- Gacesa P. 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**:161–182.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014486178890001X>.
- Garron M-L, Cygler M. 2010. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology* **20**:1547–73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805221>.
- Germany W, Reed RH, Davison IR, Chudek IA. 1985. The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. *Phycologia* **24**:35–47.
- Gerstein M, Levitt M. 1997. A structural census of the current population of proteins sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:11911–11916.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison C a, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**:343–5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363495>.
- Godzikl A, Kolinskp A, Skolnickl J, Godzik A, Kolinski A, Skolnick J. 1992. Topology fingerprint approach to the inverse protein folding problem. *J. Mol. Biol.* **227**:227–38.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1522587>.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**:546, 563–567.
- Goh CS, Lee KT. 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**:842–848.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002329>.
- Griffin TJ. 2002. Complementary Profiling of Gene Expression at the Transcriptome and Proteome Levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Proteomics* **1**:323–333.
<http://www.mcponline.org/cgi/doi/10.1074/mcp.M200001-MCP200>.
- Gupta JC, Mukherjee KJ. 2001. Stable maintenance of plasmid in continuous culture of yeast under non-selective conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:317–323.

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172301802334>.

- Gutierrez A, Correa T, Muñoz V, Santibañez A, Marcos R, Cáceres C, Buschmann A. 2006. Farming of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in the southern Chile for development of novel food products. *J. Appl. Phycol.* **18**:259–267.
- Harris LM, Blank L, Desai RP, Welker NE, Papoutsakis ET. 2001. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated solR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:322–328.
- Harris LM, Desai RP, Welker NE, Papoutsakis ET. 2000. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: Need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol. Bioeng.* **67**:11. <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0290%2820000105%2967%3A1%3C1%3A%3AAID-BIT1%3E3.3.CO%3B2-7>.
- Heiland S, Radovanovic N, Hofer M, Winderickx J, Lichtenberg H. 2000. Multiple hexose transporter of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **182**:2153–2162.
- Henikoff S, Henikoff JG, Alford WJ, Pietrokovski S. 1995. Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene* **163**:16–22.
- Holm L, Sander C. 1999. Protein folds and families: Sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* **27**:244–247.
- Hooft RWW, Vriend G, Sander C, Abola EE. 1996. Errors in protein structures. *Nature*. <http://www.nature.com/doi/10.1038/381272a0>.
- Huang L, Zhou J, Li X, Peng Q, Lu H, Du Y. 2013. Characterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium* sp. S20. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**:113–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111633>.
- Huisjes EH, de Hulster E, van Dam JC, Pronk JT, van Maris AJA. 2012. Galacturonic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on galactose, xylose, and arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:5052–5059.
- Jagtap SS, Hehemann JH, Polz MF, Lee JK, Zhao H. 2014. Comparative biochemical characterization of three exolytic oligoalginate lyases from *Vibrio splendidus* reveals complementary substrate scope, temperature, and pH adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:4207–4214.
- Jang J-S, Cho Y, Jeong G-T, Kim S-K. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**:11–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918837>.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**:403–405.
- Johnson S, Eswaran N, Sujatha M. 2011. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. as a sustainable energy crop. *Plant Cell Rep.* **30**:1573–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584678>.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992. A new approach to protein fold recognition. *Nature* **358**:86–89.

- Khramtsov N, McDade L, Amerik A, Yu E, Divatia K, Tikhonov A, Minto M, Kabongo-Mubalamate G, Markovic Z, Ruiz-Martinez M, Henck S. 2011. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **102**:8310–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683582>.
- Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**:387–392.
- Kim HS, Lee C-G, Lee EY. 2011. Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**:843–851. <http://link.springer.com/10.1007/s12257-011-0352-8>.
- Kopp J, Schwede T. 2004. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics* **5**:405–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165176>.
- Lallemand. 2014. Lalvin EC-1118 Datasheet The Original “Prise de Mousse” 2 p. www.lalvinwine.com.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**:283–291. <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889892009944>.
- Laskowski R a, Rullmann J a, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**:477–486.
- Lau MW, Dale BE. 2009. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:1368–73. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2635794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Leandro MJ, Fonseca C, Gonçalves P. 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. *FEMS Yeast Res.* **9**:511–525.
- Lee R a., Lavoie J-M. 2013. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Anim. Front.* **3**:6–11. <http://www.animalfrontiers.org/cgi/doi/10.2527/af.2013-0010>.
- Levitt M. 1992. Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *J. Mol. Biol.* **226**:507–533.
- Linder H, Lichtenthaler F. 1981. Extended Zigzag conformation of glucopyranosil manitol. *Carbohydr. Res.* **93**:135–140.
- Lund O, Frimand K, Gorodkin J, Bohr H, Bohr J, Hansen J, Brunak S. 1997. Protein distance constraints predicted by neural networks and probability density functions. *Protein Eng.* **10**:1241–1248.
- Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**:83–85.
- Macartain P, Gill CIR, Brooks M, Campbell R, Rowland IR. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* **2007**:535–543.
- Malcata FX. 2011. Microalgae and biofuels: a promising partnership? *Trends Biotechnol.* **29**:542–9.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724282>.
- Marck J. 1984. Comparative Studies on the Carbohydrate Composition of Marine Macroalgae 34 p.
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Sanchez R, Melo F, Sali A. 2000. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:291–325.
- Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, Ralph J. 2009. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr. Biol.* **19**:169–75.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167225>.
- Mayer V, Aguilera A. 1990. High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **231**:177–186.
- McHugh DJ. 2003. A Guide to the Seaweed Industry. *FAO Fish. Tech. Pap.* 105 p.
- Mckee JWA, Kavalieris L, Brasch DJ, Brown MT, Melton LD. 1992. Alginate content and composition of *Macrocystis pyrifera* from New Zealand. *J. Appl. Phycol.*:357–369.
- Melo F, Feytmans E. 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* **277**:1141–1152.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283698916655>.
- Miyake O, Hashimoto W, Murata K. 2003. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV). *Protein Expr. Purif.* **29**:33–41.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592803000184>.
- Msuya FE, Neori A. 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa* : Macroalgae That Can Biofilter Effluent from Tidal Fishponds in Tanzania. *West. Indian Ocean J. Mar. Sci. Sci.*
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* **320**:1344–9.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. 2000. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:292.
- Ndimba BK, Ndimba RJ, Johnson TS, Waditee-Sirisattha R, Baba M, Sirisattha S, Shiraiwa Y, Agrawal GK, Rakwal R. 2013. Biofuels as a sustainable energy source: an update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *J. Proteomics* **93**:234–44.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792822>.
- Neushul P. 1989. Seaweed for war: California's World War I kelp industry. *Technol. Cult.* **30**:561–583.
<http://www.jstor.org/stable/3105951>
<http://www.jstor.org/stable/3105951?origin=crossref>.
- OECD. 2012. OECD Environmental Outlook to 2050 353 p. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-environmental-outlook-to-2050_9789264122246-en.
- Ohshima N, Inagaki E, Yasuike K, Takio K, Tahirov TH. 2004. Structure of *Thermus thermophilus* 2-

- Keto-3-deoxygluconate kinase: Evidence for recognition of an open chain substrate. *J. Mol. Biol.* **340**:477–489.
- Oldfield TJ. 1992. SQUID: a program for the analysis and display of data from crystallography and molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **10**:247–252.
- Orengo CA, Pearl FMG, Bray JE, Todd AE, Martin AC, Lo Conte L, Thornton JM. 1999. The CATH database provides insights into protein structure/function relationships. *Nucleic Acids Res.* **27**:275–279.
- Ortiz J. 2011. Monografía Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas Chilenas : *Macrocytis pyrifira y Durvillaea antarctica*:1–35.
- Ozcan S, Dover J, Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* **17**:2566–2573.
- Ozcan S, Johnston M. 1995. Three Different Regulatory Mechanisms Enable Yeast Hexose Transporter (HXT) Genes To Be Induced by Different Levels of Glucose **15**:1564–1572.
- Paciello L, Parascandola P, Landi C. 2014. Auxotrophic *Saccharomyces C erevisiae* CEN . PK Strains as New Performers in Ethanol Production. *Chem. ENcingeerin Trans.* **38**:463–468.
- Parmar A, Singh NK, Pandey A, Gnansounou E, Madamwar D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.* **102**:10163–72.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924898>.
- Paull RE, Chen NJ. 2008. Postharvest handling and storage of the edible red seaweed *Gracilaria*. *Postharvest Biol. Technol.* **48**:302–308.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521407003924>.
- Pearson WR. 1995. Comparison of methods for searching protein sequence databases. *Protein Sci.* **4**:1145–1160.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2143149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pearson WR. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**:63–98.
- Peitsch MC, Jongeneel C V. 1993. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.* **5**:233–238.
- Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira J a, Domingues L. 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. *Biotechnol. Lett.* **32**:1655–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574836>.
- Pereira L. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova* **26**:863–871.
- Pieper U, Webb BM, Barkan DT, Schneidman-Duhovny D, Schlessinger A, Braberg H, Yang Z, Meng EC, Pettersen EF, Huang CC, Datta RS, Sampathkumar P, Madhusudhan MS, Sjölander K, Ferrin TE, Burley SK, Sali A. 2011. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **39**:465–474.
- Pontius F. 1994. Deprivative answers regarding arsenic health risks at low exposures will be elusive

without additional research.

- Reis VCB, Nicola AM, de Souza Oliveira Neto O, Batista VDF, de Moraes LMP, Torres FAG. 2012. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**:1673–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892884>.
- Roesijadi G, Jones SB, Snowden-Swan LJ, Zhu Y. 2010. Macroalgae as a Biomass Feedstock : A Preliminary Analysis. Richland, Washington 41 p.
- Roesijadi G, Forster J, Thom RM, Hanisak MD. 2008. Techno-Economic Feasibility Analysis of Offshore Seaweed Farming for Bioenergy and Biobased Products 115 p.
- Rost B. 1995. TOPITS: Threading One-dimensional Predictions Into Three-dimensional Structures. *Third Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*:314–321.
- Ryu M, Lee EY. 2011. Saccharification of alginate by using exolytic oligoalginate lyase from marine bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. *J. Ind. Eng. Chem.* **17**:853–858. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X11001651>.
- Sali A. 1995. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Mol. Med. Today* **1**:270–277. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357431095911707>.
- Schaumann K, Weide G. 1990. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. *Hydrobiologia* **204–205**:589–596. <http://link.springer.com/10.1007/BF00040292>.
- Schaumann K, Weide G. 1995. Efficiency of uronic acid uptake in marine alginate-degrading fungi. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **49**:159–167. <http://link.springer.com/10.1007/BF02368346>.
- Scherens B, Goffeau A. 2004. The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Biology (Basel)*:1–8.
- Schmer MR, Vogel KP, Mitchell RB, Perrin RK. 2008. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *PNAS* **2007**:21–26.
- Sedlak M, Ho N. 2004. Production of Ethanol from Cellulosic Biomass Hydrolysates Using Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of Cofermenting Glucose and Xylose. *Appl. Biochem. Bi* **113**:403–416.
- Shao Z, Zhao H, Zhao H. 2009. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res.* **37**:e16. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2632897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shimizu E, Ojima T, Nishita K. 2003. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*. *Carbohydr. Res.* **338**:2841–2852.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:13207–12. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Silva S De, Kumar S. 1988. Carbohydrate constituent of the marine algae of Sri Lanka. Composition of Carbohydrates Extracted from the Brown Seaweed *Turbinaria Conoides*. *J. Natu Sci. Ctry. Sri Lanka* **16**.
- da Silva Filho EA, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SKB, do Monte Resende A, Simões DA, de Morais MA. 2005. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**:481–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175407>.
- Sippl MJ. 1993. Recognition of Errors in 3-Dimensional Structures of Proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **17**:355–362.
- Smith RF, Wiese BA, Wojzynski MK, Davison DB, Worley KC. 1996. BCM Search Launcher--an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res* **6**:454–462. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743995>.
- Soares-Costa A, Nakayama DG, Andrade LDF, Catelli LF, Bassi APG, Ceccato-Antonini SR, Henrique-Silva F. 2014. Industrial PE-2 strain of *Saccharomyces cerevisiae*: from alcoholic fermentation to the production of recombinant proteins. *N. Biotechnol.* **31**:90–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013100>.
- Souffriau B, Den Abt T, Thevelein JM. 2012. Evidence for rapid uptake of d-galacturonic acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a channel-type transport system. *FEBS Lett.* **586**:2494–2499.
- Spalding A, Tuite M. 1989. Ploidy on Plasmid Stability and Copy Number. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1037–1045.
- Stambuk BU, Dunn B, Alves SL, Duval EH, Sherlock G. 2009. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res.* **19**:2271–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2792166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Steen EJ, Chan R, Prasad N, Myers S, Petzold CJ, Redding A, Ouellet M, Keasling JD. 2008. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb. Cell Fact.* **7**:36. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2621116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stevenson J, Bothwell M, Lowe R. 1996. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Ed. Elsevier (USA) Elsevier A. London: Academic Press 788 p.
- Sudhakar Johnson T, Badri J, Kalpana Sastry R, Shrivastava A, Kavi Kishor PB, Sujatha M. 2013. Genetic Improvement of Biofuel Plants: Recent Progress and Patents. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **7**:2–12. <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1872-2156&volume=7&issue=1&spage=2>.
- Sutcliffe MJ, Haneef I, Carney D, Blundell TL. 1987. Knowledge Based Modeling of Homologous Proteins .1. 3-Dimensional Frameworks Derived From the Simultaneous Superposition of Multiple Structures. *Protein Eng.* **1**:377–384.

- Suzuki H, Suzuki K, Inoue A, Ojima T. 2006. A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that releases disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner. *Carbohydr. Res.* **341**:1809–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697989>.
- Thammasittirong SN-R, Thirasaktana T, Thammasittirong A, Srisodsuk M. 2013. Improvement of ethanol production by ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* UVNR56. *Springerplus* **2**:583. <http://www.springerplus.com/content/2/1/583>.
- Ujita S, Kimura K. 1982. Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from *Bacillus subtilis*. *Methods* **90**:235–241.
- USDA. 2012. Evolution of Biofuels in Chile 1-16 p.
- USDA. 2017. China - Peoples Republic Biofuels Demand Expands, Supply Uncertain. *Required Rep.*
- Vriend G, Sander C, Stouten PFW. 1994. A novel search method for protein-sequence structure relations using property profiles. *Protein Eng.* **7**:23–29.
- Wargacki AJ, Leonard E, Win MN, Regitsky DD, Santos CNS, Kim PB, Cooper SR, Raisner RM, Herman A, Sivitz AB, Lakshmanaswamy A, Kashiya Y, Baker D, Yoshikuni Y. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* **335**:308–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267807>.
- Wasungu KM, Simard RE. 1982. Growth Characteristics of Bakers' Yeast in Ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **XXIV**.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**:123–128.
- Wong TY, Preston LA, Schiller NL. 2000. ALGINATE LYASE: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:289–340. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.micro.54.1.289>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018131>.
- You KM, Rosenfield C, Douglas K. 2003. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1499–1503.
- Zemke-white WL, Ohno M. 1999. World seaweed utilisation : An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.*:369–376.
- Zhang. 1997. High-butanol ratio clostridium acetobutylicum and culturing method and use thereof. *China Pat. CN 1063483*:6–10.
- Zubia M, Payri C, Deslandes E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.* **20**:1033–1043. <http://link.springer.com/10.1007/s10811-007-9303-3>.

Anexos

A. Tabla de partidores

N°	Partidor	Secuencia (5' -3')
1	Atu1557_FW	TATAATTAACATAACATGTTACAACGTCCGCCTA
2	Atu_1557_RW	ATAATTATATTAATCTCAGGCGGCCTTCTGGCGCG
3	TP1t_FW	CAGAAGGCCGCTGAGATTAATATAATTATATAAAAA
4	TP1t_RW	TATATAACAGTTGAAATTTG
5	TP1t_RW(2)	TATATAACAGTTGAAATTTGGATA
6	?HXT7p_FW	ACTTCTCGTAGGAACAAT
7	?HXT7p_RW	AATCTTTTTGGACATTTTTTGATTAATAATTAATAAAAACT
8	KDGK_FW	AATTTTAATCAAAAAATGTCCAAAAAGATTGCCGTGA
9	KDGK_RW	TCGTGATTTTTGTTATTACGCTGGCATCGCCTCA
10	PGI1t_FW	GCGATGCCAGCGTAATAACAAAAATCACGATCTGG
11	PGI1t_RW	TTTTAGGCTGGTATCTTGAT
12	PYK1p_FW	AATGCTACTATTTTGGAGAT
13	PYK1p_RW	GGCAGAGGGACGCATTGTGATGATGTTTTATTTGT
14	Ato3025_FW	TAAACATCATCACAATGCGTCCCTCTGCCCCGGC
15	Ato3025_RW	ACATAAGAGATCCGCTTAGAACTGCTTGGGAAGGGAGAGC
16	ADH2t_FW	CCCAAGCAGTTCTAAGCGGATCTCTTATGTCTTTA
17	ADH2t_RW	TAGAATTATATAACTTGATGAGA
18	PDC1p_FW	CATGCGACTGGGTGAGCATA
19	PDC1p_RW	GGCGAGGATGGACATTTTGATTGATTTGACTGTGTTATTTGT
20	qutD_FW	GTCAAATCAATCAAAATGTCCATCCTCGCCTTGGT
21	qutD_RW	TTAGTTAAAAGCACTTTAAGCCTCCTCGACATACT
22	ENO2t_FW	GTCGAGGAGGCTTAAAGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAG
23	ENO2t_RW	AGGTATCATCTCCATCTCCC
24	FBA1p_FW	TCCAAGTGGCACCCTG
25	FBA1p_RW	GACTTTGGACTCCATTTTGAATATGTATTACTTGTTATG
26	KDGPA_FW	TAATACATATTCAAAATGGAGTCCAAAGTCGTTGA
27	KDGPA_RW	TTAATTTGAATTAACCTTACACTTGGAAAACAGCCT
28	FBA1t_FW	GTTTTCCAAGTGTAAGTTAATTCAAATTAATTGAT
29	FBA1t_RW	GTAAGCTACTATGAAAG
30	FBA1t_RW(2)	GTAAGCTACTATGAAAGACTTTAC
31	PGI1t_RV(2)	ACGGCCCCGGTATACTGGAGGCTTCATG
32	TEF2p_FW(2)	AGTATACCGGGGCCGTATACTTACATATAG
33	HPH_full_fwd	AAAGGAGGTGCACGCATTATG
34	HPH_full_rev	cgcttgagtTATATAACAGTTGAAATTTGGATAAGAACATC
35	aly_fwd	ctgttatataACTCAAGACGCACAGATATTATAAC
36	aly_rev	aatagtagcattACGATGAGAGTGTAACCTG

37	oal_fwd	ctctcatcgtAATGCTACTATTTTGGAGATTAATC
38	oal_rev	ttgtcgcggTAGAATTATATAACTTGATGAGATGAG
39	DehR_fwd	atataattctaCCGCGACAAATTACCCATAAG
40	DehR_rev	tacgagaagtTATATAACAGTTGAAATTTGGATAAGAAC
41	KGDK_fwd	ctggtatataACTTCTCGTAGGAACAATTTTC
42	KGDK_rev	gccagttggaTTTTAGGCTGGTATCTTGATTC
43	KDGPA_fwd	cagcctaaaaTCCAAGTGGCACCGCTGG
44	KDGPA_rev	acgtcccatcGTAAGCTACTATGAAAGACTTTACAAAGAACTCG
45	DOWN_full_fwd	agtagcttacGATGGGACGTCAGCACTG
46	DOWN_full_rev	CGGTATTACTCGAGCCCG
47	PYK1p_fwd	AATGCTACTATTTTGGAGATTAATC
48	PYK1p_rev	agggacgcatTGTGATGATGTTTTATTTGTTTTG
49	Ato3025_fwd	catcatcacaATGCGTCCCTCTGCCCG
50	Ato3025_rev	agagatccgcTTAGAACTGCTTGGAAGGGAGAGC
51	ADH2t_fwd	gcagttctaaGCGGATCTCTTATGTCTTTAC
52	ADH2t_rev	TAGAATTATATAACTTGATGAGATGAG
53	KDGPA_rev(2)	CGGTATTACTCGAGCCCGTAATACAACA
54	cluster1_fwd	AAAGGAGGTGCACGCATTATG
55	cluster1_rev	cagtcgcatgGTAAGCTACTATGAAAGACTTTACAAAG
56	quTD_fwd	agtagcttacCATGCGACTGGGTGAGCA
57	quTD_rev	acgtcccatcAGGTATCATCTCCATCTCCCATATG
58	DOWN(3)_fwd	gatgatacctGATGGGACGTCAGCACTG
59	DOWN(3)_rev	CGGTATTACTCGAGCCCG
60	Cluster2_fwd	AAAGGAGGTGCACGCATTATG
61	Cluster2_rev	aagaaaagtactcGTAAGCTACTATGAAAGACTTTACAAAG
62	gat1_rev	acgtcccatcAGGTATCATCTCCATCTCC
63	DOWN(4)_fwd	gatgatacctGATGGGACGTCAGCACTG
64	DOWN(4)_rev	CGGTATTACTCGAGCCCG
65	RW VECTOR	TTGGGGCCAATACGCCCG
66	FW VECTOR	GAGGTCCGAAGACTCATTAAAAT3'
67	HPSV_FW	ggcgtattggcccaaTAGAATTATATAACTTGATGAGATG'
68	HPSV RW	atgagtcttcggacctcAATGCTACTATTTTGGAGATTAATC
69	OST1_FW	ATGAGGCAGGTTTGGTTCTCTTGATTGTGG
70	OST1_RW	AGCAGAAGACACGTTGAAAAAACATAGGAACAATC
71	OST1Aly_RW	AGTCAAAATTTCCATAGCAGAAGACACGTTGAAAAAACAT
72	OST1Oly_RW	GGCAGAGGGACGCATAGCAGAAGACACGTTGAAAAAACAT
73	AlyOST1_FW	AACGTGTCTTCTGCTATGGAAATTTGACTTATTTGT
74	OST1_FW(2)	ATGAGGCAGGTTTGGTTC
75	OlyOST1_FW	AACGTGTCTTCTGCTATGCGTCCCTCTGCCCGG
76	Oly_RW(2)	TTAGAACTGCTTGGGAAGG
77	AlySV_FW	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGCGGTGGAAGTATGAGGCAGGTTTGGTTC
78	AlySV_RW	CTCGAGGAGATATTGTACACTAAACCAAATGTTAACCAACAGCAACTTCT
79	OlySV_RW	CTCGAGGAGATATTGTACACTAAACCAAATGTTAGAACTGCTTGGGAAG

B. Protocolos

B.1. Extracción de DNAg

La extracción de ADNg se llevó a cabo utilizando el protocolo Promega® DNA kit Extraction. Se realiza un inóculo de 1 mL que crece durante 20 hrs, y se prepara un crecimiento hasta alcanzar $1,9 \times 10^8$ células/mL, y es centrifugado a 5000 RPM por 4 minutos.

- Posteriormente se agregan 293 μ L de EDTA 50 mM y se agitó para resuspender las células.
- Agregar 7,5 μ L de 75 U/ μ L de liticasa (Lyticase from *Arthobacter Luteus* Sigma Aldrich® L-4025) e incubar por 37°C por 1 hora.
- Centrifugar a 5000 RPM por 2 minutos y se retirar el sobrenadante
- Agregar 300 μ L de Nuclei Lysis Solution al precipitado y resuspender con micropipeta (evitar formación de burbujas).
- Agregar 100 μ L de Protein Precipitation Solution y agitar por vortex vigorosamente a alta velocidad por unos 20 segundos.
- Incubar la muestra por 5 minutos en hielo
- Centrifugar la muestra a 14.000 RPM por 5 minutos
- Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL, que contiene 300 μ L de isopropanol a temperatura ambiente.
- Agitar 4 veces por inmersión. Es muy importante no tomar nada del precipitado, ya que éste contiene el lisado celular y proteínas que contaminarán la muestra. El isopropanol permite que el ADNg precipite, de forma tal que comienzan a formarse una especie de estrias. Se debe seguir agitando por inversión del tubo hasta que se forme un pequeño pellet.
- Centrifugar a 14.000 RPM por 2 minutos.
- Cuidadosamente decantar el sobrenadante y drene el tubo sobre una toalla absorbente. Agregar 300 μ L de etanol 70% a temperatura ambiente y luego invertir el tubo muchas veces para lavar el pellet de DNA.
- Centrifugar a 14.000 RPM por 2 minutos. Cuidadosamente aspirar todo el etanol.
- Esperar que se seque el tubo. Alternativamente puede poner el tubo en un termobloque abierto, a 50°C por 15 minutos para secar todo el etanol.
- Agregar 50 μ L de DNA Rehydration solution e incubar a 65°C por una hora para rehidratar el ADN.
- Cuantificar mediante Maestoro Nano®.

B.2. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el protocolo de Trizol™ Reagent, específicamente la sección de extracción mediante cultivos en suspensión de 1×10^7 células / mL.

- Se centrifugan 1 mL de cultivo a 5000 RPM por 10 minutos y se elimina el sobrenadante.
- Se agregan 0,75 mL de Trizol® por cada 0,25 mL de muestra y se resuspende utilizando micropipeta.
- Incubar las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación del complejo de nucleoproteínas.
- Agregar 0,2 mL de Cloroformo por 1 mL de reactivo Trizol™, utilizado para la lisis y apreté fuertemente el tubo para evitar apertura por emisión de gases e incubar por 3 minutos.
- Centrifugar por 15 minutos a 12.000 RPM y en 4°C. LA mezcla se para en dos fases. La fase superior incolora corresponde a la fase acuosa, mientras que la fase inferior es orgánica. En la fase acuosa se encuentra el ARN, en la interfase las proteínas, y en la fase orgánica el ADN.
- Transferir la fase acuosa que contiene el ARN desde el tubo eppendorf establecimiento un ángulo de 45° para evitar tomar la interfase, a un tubo nuevo eppendorf e 1,5 mL.
- Agregar 0,5 mL de isopropanol por cada 1 mL de Trizol™ e incubar por 10 minutos
- Centrifugar por 10 minutos a 12.000 RPM a 4°C. El ARN se hará visible como una pellet de coloración blanca.
- Descarte el sobrenadante
- Resuspende agregando 1 mL de Etanol 75% por cada 1 mL de Trizol™. Agite la muestra con vortex.
- Centrifugar a 7.500 RPM a 4°C y luego descartar el sobrenadante
- Repetir el procedimiento de lavado etanol dos veces más.
- Secar el pellet en una campana de flujo laminar por 10 minutos
- Resuspende el pellet agregando 50 µL de agua tratada con DEPC 0.1% con micropipeta.

- Incubar a 60°C por 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, medir concentración, integridad y almacenar a -80°C.

B.3. PCR KOD Hotstart Kit y OE-PCR

El protocolo de la enzima KOD polimerasa Hotstart se efectuó según las indicaciones del fabricante. La preparación del cocktail PCR para una amplificación convencional se realiza con los siguientes reactivos:

Tabla 8. Preparación de cocktail PCR para DNA Polimerasa KOD Hotstart (50 μ L).

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración final
10X Buffer Hotstart	5	1X
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM ^a
dNTP (2 mM c/u)	5	0,2 mM
Partidor Forward (10 μ M)	1,5	0,3 μ M
Partidor Reverse (10 μ M)	1,5	0,3 μ M
Templado	1	100 ng
KOD HotStart DNA polymerase	1	0,02 U/ μ L
Agua Libre Nucleasas	32	-

a: La concentración de MgSO₄ puede variar según tamaño de amplicón (1,5 - 2,5 mM)

Para la preparación de OE-PCR se utiliza el mismo kit pero con modificaciones en dos etapas, con el fin de ensamblar inicialmente una pequeña cantidad de fragmento y posteriormente establecer una amplificación selectiva de los módulos.

Tabla 9. Preparación de cocktail PCR para 1° y 2° etapa en Overlap Extension PCR.

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Etapa 1		
Fragmento de tamaño mayor	6	~350 ng
Fragmento de tamaño menor	3	~250 ng
10X Buffer Hotstart	3	1X
dNTP (2 mM c/u)	3	0,2 mM
MgSO ₄ (25 mM)	1,2	1,5 mM
Enzima KOD	0,6	0,02 U/μL
Agua libre nucleasas	13,2	-
Etapa 2		
10X Buffer Hotstart	2	1X
dNTP (2 mM c/u)	5	0,2 mM
MgSO ₄ (25 mM)	1,2	1,5 mM
Partidor Forward (10 μM)	3	0,6 μM
Partidor Reverse (10 μM)	3	0,6 μM
Enzima KOD ^a	0,4 - 0,8	0,02 U/μL
Agua libre nucleasas	a 50uL	-

a: cantidad variable dependiendo de tamaño de ensamble. 0,4 μL

(<1,5 kb), 0,6 (1,5 - 3 kb), 0,8 (>3 kb)

B.4. PCR Phusion Kit

El protocolo de amplificación de DNA Phusion Polymerase se realizó según instrucciones del fabricante con modificaciones en relación a los partidores.

Tabla 10. Preparación del cocktail PCR para DNA Phusion Polymerase (50 uL).

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
5X HF/GC Buffer	10	1X
dNTP (2 mM)	5	0,2 mM
Partidor Forward (5 μM)	5	0,5 μM
Partidor Reverse (5 μM)	5	0,5 μM

Template DNA	1 100 ng
Phusion Polymerase (2 U/ μ L)	0,5 0,02 U/ μ L
Nuclease Free Water	23,5 -

B.5. Extracción DNA plasmidial

El protocolo de extracción de ADN plasmidial se realizó utilizando el kit Gene Jet plasmid miniprep con modificaciones. Se realizó un cultivo de *E. coli* de 5 mL y se dejó crecer durante 16 horas. Posteriormente se procede con la extracción:

- Centrifugar los 5 mL a 5000 RPM durante 4 minutos, y eliminar el sobrenadante
- Agregar 250 μ L de Resuspension Solution. Transferir la suspensión de células a un tubo eppendorf de 1,5 mL.
- Agregar 250 μ L de Lysis Solution y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo 4 a 6 veces hasta que la solución se vuelva clara. Nota: No aplicar vortex para evitar el daño del DNA cromosomal. No incubar por más de 5 minutos para evitar la denaturación del DNA plasmidial superenrollado.
- Agregar 350 μ L de Neutralization Solution y mezcle inmediatamente invirtiendo el tubo de 4-6 veces.
- Centrifugar por 10 minutos a 14.000 RPM para precipitar el debris celular y el ADN cromosomal.
- Transferir el sobrenadante a las columnas GeneJet Spin Column por pipeteo, evitar transferir el precipitado.
- Centrifugar por 1 minuto a 14.000 RPM y descartar el flujo pasado por la columna, y volver a colocar la columna en el tubo colector
- Agregar 500 μ L de Wash Buffer a la columna Centrifugar por 1 minuto a 14.000 RPM.
- Repita el procedimiento de lavado
- Descarte el sobrenadante y centrifuge por 1 minuto adicional para remover los residuos de lavado.
- Traspasar la columna a un tubo eppendorf de 1,5 mL y agregar 50 μ L de Elution Buffer o agua libre de nucleasas y e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

- Centrifugar a 14.000 RPM por 5 minutos y rescatar el flujo a través de la columna en el eppendorf y cuantificar.

B.6. Extracción Gel agarose

- El protocolo de extracción en gel de agarosa se realizó mediante el kit Gene Jet Gel Extraction (Invitrogen®). Todas las etapas de purificación son realizadas a temperatura ambiente.
- Cortar la banda del gel utilizando un bisturí, tratando de cortar el tamaño mas mínimo posible para reducir en lo posible la cantidad de gel a purificar y depositar en un tubo de 1.5 mL. (si el material genetico a purificar va a ser posteriormente secuenciado, es importante disminuir en lo posible el uso excesivo del transiluminador UV, para evitar la formacion de dímeros de timina y provocar mutaciones)
- Agregar un volumen de 1:1 del binding buffer. Ejemplo: agregue 100 uL de buffer por cada 100 mg de gel de agarosa (para esto debe pesar su tubo en la balanza analítica, utilizando como referencia TARE un tubo eppendorf vacío). En el caso de trabajar con geles de mayor porcentaje de concentración (1,5 - 2%) deberá agregar 2 volúmenes de binding buffer por cada 100 mg de gel.
- Incubar el gel a 50 - 60°C durante 10 minutos, hasta que el gel se disuelva completamente. Asegúrese que el gel esté completamente disuelto y agite con vortex si es necesario. Debe chequear que el color de la solución torne de un color amarillo, lo que indica que se encuentra en el pH óptimo para la unión del DNA a la columna de purificación del kit. Si la solución es naranja o violeta, deberá agregar 10 uL de acetato de sodio 3 M a pH 5,2 y mezclar. El color deberá volverse amarillo.
- Opcionalmente, si es que el tamaño del fragmento a purificar es menor a 500 bp o mayor 10 kb, agregue 1 volumen de isopropanol a la solución de gel diluido.
- Transferir hasta 800 uL de la solución a la columna morada del kit. Centrifugar por 1 min a 14.000 RPM. Si es que su solución posee más de 800 uL, deberá repetir este paso con la solución remanente.
- Agregar 700 uL de la solución Wash Buffer, espere reposar 1 min la columna y luego centrifuge por 1 min a 14.000 RPM. Descarte del flujo del tubo colector y vuelta a ponerlo en la columna.

- Agregar nuevamente 700 uL de la solución Wash Buffer, espere reposar 1 min la columna y luego centrifuge por 1 min a 14.000 RPM. Descarte del flujo del tubo colector y vuelta a ponerlo en la columna.
- Centrifugar nuevamente por 3 min a 14.000 RPM (sin agregar nada) con el fin de secar la columna. Descarte lo que pueda quedar en el tubo colector si es necesario.
- Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo (previamente rotulado) y agregue 20 uL de la solución Elution Buffer cuidadosamente, apuntando con precisión al centro de la columna y deje reposar por 3 min. En este paso es clave que el buffer de elución quede totalmente absorbido en la membrana y que no quede en las paredes o en el marco de goma que sujeta la membrana, de lo contrario se reducirá dramáticamente la concentración final obtenida.
- Centrifugar por 3 min a 14.000 RPM, rescatando la solución eluida en el tubo eppendorf nuevo.
- Cuantificar, Rotule, almacene -20°C para ensayos posteriores.

B.7. Preparación de células electrocompetentes E. coli (DH5-alfa y Top10)

El siguiente protocolo de preparación de células electrocompetentes se ha probado en las cepas DH5-alfa, BL21(DE3), TOP10 y Blue XL-1 Supercompetent.

- Inocular 500 mL de medio LB (sin NaCl) con 5 mL de un cultivo fresco saturado (cultivo-overnight) para lograr una dilución de 1/100 del cultivo original.
- Crecer a 37°C con agitación vigorosa (190-200 RPM) hasta alcanzar una OD₆₀₀: 0,5 - 0.65 (fase exponencial). El tiempo aproximado desde el inóculo a que los 500 mL alcancen esa OD es de aproximadamente 4 hrs.
- Incubar el cultivo en hielo durante 15 a 30 min.
- Distribuir 250 mL de cultivo en 2 tubos de plástico de 300 mL previamente enfriado y centrifugar a 5000 RPM por 10 min a 4°C.
- Remover todo el sobrenadante (lo mejor posible). Resuspender el total del pellet en 500 mL de glicerol al 10% (250 mL en cada tubo) y agregar 250 mL de glicerol 10% previamente enfriado.
- Centrifugar a 4000 RPM durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.

- Resuspender el total del pellet en 250 mL de glicerol al 10% (125 mL en cada tubo).
- Centrifugar a 4000 RPM durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el total del pellet en 10 mL de glicerol a 10% (falcon de 50 mL). Juntar todas las fracciones en uno, completando los 10 mL en un sólo tubo.
- Resuspender en un volumen final de 2 mL de glicerol al 10% el pellet de células.
- Agregar en tubos de 600 uL alícuotas de 60 uL y almacenar a -80°C. Mientras se realiza el alicuotado en los tubos eppendorf de 0,6 mL es importante mantener todo en hielo, manteniendo la cadena de frío.

B.8. Transformación de células electrocompetentes *E. coli*.

La transformación de células electrocompetentes de tipo *E. coli*, se utilizan las células preparadas y almacenadas en la sección B.7, dentro de un período no superior a 1 año.

- Agregar 2 - 3 uL de vector a las alícuotas de células electrocompetentes e incubar en hielo por 5 min.
- Traspasar a una cubeta de electroporación fría de 0,2 mm, verificando que el cultivo quede en contacto con las placas.
- Aplicar en electroporador un pulso 2,2 kV , 25µFD, 200 ohms
- Agregar 900 µL de medio LB y resuspender
- Incubar transformantes a 37°C por 60 - 90 min
- Sembrar en placas con medio LB-ampicilina e incubar por 24 hrs.
- Rescatar colonias transformantes.

B.9. PCR Colonia

El protocolo PCR colonia se utilizó para detectar la presencia de fragmentos ensamblados en *E. coli* en vectores de clonación y finalmente seleccionar el módulo para su almacenamiento. Se realiza un cocktail PCR sugerido.

Tabla 11. Cocktail PCR para una reacción de PCR Colonia.

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer Green 5X	4	1X
dNTP (2 mM)	2	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	3,2	2,5 mM
Primer FW (5 μM)	2	500 nM
Primer RV (5 μM)	2	500 nM
templado	0,6	~ 50 ng
Go Taq	0,1	0,02 U/ μL
Agua Libre Nucleasas	6,1	-

C. Tabla de construcción de módulos

La tabla de construcción de módulos con sus secuencias codificantes.

1. Modulo HPH			
Elemento regulador /gen	PYK1p	Origen	S. cerevisiae S288c
AATGCTACTATTTTGGAGATTAATCTCAGTACAAAACAATATTTAAAAGAGGTGAATTATTTTCCCCCTTATTTTTTTTTTGTAAAATTGATCC AAATGTAAATAACAATCACAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCGCCATGACCCCGGATCGTCGGTTGTGATACGGTCAGGGTAGCGCC TGGTCAAACCTCAGAACTAAAAAATAATAAGGAAGAAAAAAAAATAGCTAATTTTTCCGGCAGAAAGATTTTCGCTACCCGAAAGTTTTTCCGGCAAG CTAAATGGAAAAAGGAAAGATTATTGAAAGAGAAAGAAAGAAAAAAAAAAATGTACACCCAGACATCGGGCTTCCACAATTTCCGGCTCTATTGTTT TCCATCTCTCGCAACGGCGGGATTCCCTCTATGGCGTGTGATGTCTGTATCTGTTACTTAATCCAGAACTGGCACTTGACCCAACCTCTGCCACGTGG GTCGTTTTGCCATCGACAGATTGGGAGATTTTCATAGTAGAATTCAGCATGATAGCTACGTAAATGTGTTCCGCACCGTCACAAAGTGTTCCTACT GTTCTTTCTTCTTCGTTCAATTCAGTTGAGTTGAGTGAGTGCTTTGTTCAATGGATCTTAGCTAAAATGCATATTTTTTCTCTTGGTAAATGAATGC TTGTGATGTCTTCCAAGTGATTTCCCTTTCCCATATGATGCTAGGTACCTTTAGTGTCTTCTAAAAAAGGCTCGCCATCAAACGA TATTCGTTGGCTTTTTTTTTCTGAATTATAAATACTCTTTGGTAACTTTTCATTTCCAAGAACCTCTTTTTTCCAGTTATATCATGGTCCCTTTCAA AGTTATTCTCTACTCTTTTTCATATTCATTCTTTTTCATCCTTTGGTTTTTATTCTTAACTTGTTTATTATTCTCTCTTGTTCATTTACAAGAC ACCAATCAAACAATAAAAACATCATCACA			
Elemento regulador /gen	HPH	Origen	pCDNA 3.1 /Hygro (+)
ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAG AATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCG GCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGT GTCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGA CGAGCGGGTTTCGGCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTG GCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCACTGCGTCCGTTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTC GTGCACGCGGATTTTCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGGATTCCCAAT ACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATC GCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGT CGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAG TACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG			
Elemento regulador /gen	ADH2t	Origen	S. cerevisiae S288c

GCGGATCTCTTATGTCTTTACGATTTATAGTTTTTCATTATCAAGTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTTCGAAGTTTCACG
AATAAAAGATAATATTCTACTTTTTGCTCCCACCGCGTTTTGCTAGCACGAGTGAACACCATCCCTCGCTGTGAGTTGTACCCATTCTCTAAACTG
TAGACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTTCGTTATGTACGGCATCCTCCAACAAACAGTCGGTTATAGTTTTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGAT
ATTTCTCATTTTCTTCGCATGCCAGCATTGAAATGATCGAAGTTCAATGATGAAACGGTAATTCTTCTGTCATTTACTCATCTCATCTCATCAAGT
TATATAATTCTA

2. Modulo Aly

Elemento regulador /gen	PGK1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
ACTCAAGACGCACAGATATTATAACATCTGCACAATAGGCATTTGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACCTGCAT TTAAAGATGCCGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGGAAGTGTTCCCTCCTTCTTGAAT TGATGTTACCCCTATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAACAACTGAAAAAACCCAG ACACGCTCGACTTCCTGTCTTCTATTGATTGCAGCTTCCAATTTTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAACAAGCAATC GAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAAGGGTTTTAGTACCACATGCTATGATGCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTC TCTCTTTCAAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTTAGTTTAGTAGAA CCTCGTGAAACTTACATTTACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGT TCTTAGATGCTTTCTTTTTCTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTTACAACAAATATAAAACA			

Elemento regulador /gen	HdAlex	Origen	Sintesis
ATGGAATTTTGACTTATTTGTTGTTCTTCTTCTTGACTACTGCTGAAGCTTCTATTGTTTGGACTCATAATGAATTCGATCCAGCTTATTTTCAGAA ATGGTATGCATTTCTCCAGTTACTGATGAAGATGTTAATGGTCTGCTACTGTTGTTCCAGATCCAAATGGTGGTTCTAATTTGGTTTTGAAAGTTTT CTATGAAAAAGGTTCTTATTCTCATCATGGTCCAAATTTCTAAAGTTCAATCTTCGCTACTCCAATAAACAAGAGTTGCTATGACTTTGTCCTTAT GATGTTAGATTCGATCCAAATTTTCGATTTTCAGAATTGGTGGTAAATTGCCAGGTTTGTATGGTGGTTTTGGTTAATTGTTCTGGTGGTAGACATTCTG ATGATTGTTTCTCTACTAGATTCATGTGGAGAGATAATGGTGATGGTGAAGTTTATGGTTATGTTCCAGATCAATCTCATCAATTGCCAGGTTTCTG TACTAAAAATATTTGTGATCCAGTTAAAGGTTTCTCTTTTCGGTAGAGGTTCTTGGAGATTCCAAAGAGGTGTTTGGCAAACCTATTGCTCAATCTATT AAATTGAATACTCCAGGTTCTACTGATGGTGCTATTAAGTTGTTTATAATGGTAAAGTTGTTTATGCTTCTAATAATTTGGCTTTGAGATCTCAAT CTGATGTTAATATTGATGGTATTTTCTTCTCTACTTTCTTCGGTGGTTCTTATGCTAATTTGGGCTCCAATAAGAGATTGTTATACTTGGTTCAAAA TTTCGCTATTTCTTTTCGATACTGGTCCAGAAGTTGCTGTTGGTTAA			

Elemento regulador /gen	CYC1t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
ACAGGCCCTTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCAGAAAAGGAAGGAG TTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTTTTAATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTG TACAAACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTCGCAGTTTAC ACTCTCATCGT			

3. Modulo Oly

Elemento regulador /gen	PYK1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
<p>AATGCTACTATTTTGGAGATTAATCTCAGTACAAAACAATATTA AAAAGAGGTGAATTATTTTCCCCCTTATTTTTTTTTTTGTTAAAATTGATCC AAATGTAAATAAACAAATCACAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCGCCATGACCCCGGATCGTTCGGTTGTGATACGGTCAGGGTAGCGCC TGGTCAAACCTCAGAACTAAAAAATAATAAGGAAGAAAAAAAAATAGCTAATTTTTCCGGCAGAAAGATTTTCGCTACCCGAAAGTTTTTCCGGCAAG CTAAATGGAAAAAGGAAAGATTATTGAAAGAGAAAGAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAATGTACACCCAGACATCGGGCTTCCACAATTTCCGGCTCTATTGTTT TCCATCTCTCGCAACGGCGGGATTCCCTCTATGGCGTGTGATGTCTGTATCTGTTACTTAATCCAGAAACTGGCACTTGACCCA ACTCTGCCACGTGG GTCGTTTTGCCATCGACAGATTGGGAGATTTTCATAGTAGAATTCAGCATGATAGCTACGTAAATGTGTTCCGCACCGTCACAAAGTGTTTTCTACT GTTCTTTCTTCTTTCGTTCAATTCAGTTGAGTTGAGTGAGTGCTTTGTTCAATGGATCTTAGCTAAAATGCATATTTTTTCTCTTGGTAAATGAATGC TTGTGATGTCTTCCAAGTGATTTCCCTTTCCCTCCCATATGATGCTAGGTACCTTTAGTGTCTTCCATAAAAAAAAAAAGGCTCGCCATCAAACGA TATTCGTTGGCTTTTTTTTTCTGAATTATAAATACTCTTTGGTAACTTTTCATTTCCAAGAACCTTTTTTTCCAGTTATATCATGGTCCCTTTCAA AGTTATTCTCTACTCTTTTTTCATATTCATCTTTTTTCATCCTTTGGTTTTTTATTCTTAACTTGTTTTATTATTCTCTCTTGTCTTATTTACAAGAC ACCAATCAAAAACAATAAAACATCATCACA</p>			
Elemento regulador /gen	Ato3025	Origen	<i>A. tumefaciens</i> C58
<p>ATGCGTCCCTCTGCCCCGGCCATCTCCAGACAGACACTTCTCGATGAACCCCGCCCGGGCTCATTGACCATTGGCTACGAGCCGAGCGAAGAAGCAC AACCGACGGAGAACCCTCCGCGCTTTTCATGGCTACCCGATATTGACGACGGCGCGCTTACGTGCTGCGCATTTTCGACCGATCCCGGTTTTACAGA CAAAAAACGCTCGTCTTCGAGGATCTCGCCTGGAATTTCTTACCCCGGATGAAGCACTGCCGGACGGCCATTATCACTGGTGTATGCGCTATGG GATCAGAAATCCGCAACAGCGCATTTCCA ACTGGAGCACCGTACGCAGTTTCGAGATCAGTGAAGCACTGCCGAAAACGCCGCTGCCCGGCAGGTCTG CCCGCCATGCTGCCGCGCAAACCAGCCACCCTCGGCTGTGGCTCAACTCCGAGCAATTGAGTGCCTTCGCCGATGCCGTTGCGAAGGACCCCAACCA TTGTGGCTGGGCGAGTTTTACGAAAAATCGGTGAGCCGTGGCTCGAGCGGCCGGTTCATGCCGGAACCGCAGCCCTATCCCAACAACACGCGTGTG GCCACGCTCTGGCGGCAGATGTATATAGACTGCCAGGAAGTGATCTATGCGATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGTCTCGGACGCGACGACC TTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTGCGCCCTGGGACACGAAAGGTGCGACCTCACGCGCTATAATGACGAGGCGGGGTTCGCGCT CGTCGTGCACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGAAGACGAACGCAGGACCGTGCATCCGTTCTTCTCGAACGGACGCGG GAAGTTGCCGATCATGTGCATCGCACACGCCCGCATTCACGTCTTTCCCTATGACAGCCATGCGGTGCGCTCGCTTTTCGGCTGTATTGACCGCGCCT GCATCGCACTTCAGGGAGAAAGCGACGAGGCTGGCGAATGGCTCGACTATACCGTGAATTCCTTGCCACGCTCTATTCTCCCTGGGCGGGAACCGA TGGTGGTTGGGCGGAAGGTCCGCATTACTGGATGACCGGCATGGCCTATCTCATCGAGGCCGCAATCTGATCCGCTCCTATATTGGTTATGACCTC TATCAACGGCCGTTTTTTCCAGAATACCGGTCGTTCCCGCTTTACACCAAGGCGCCGGGAACCCGCGCAGCAACTTCGGCGACGACTCCACCCTTG GCGACCTTCCCGCCTGAAGCTGGGATACAACGTCCGGCAATTCGCCGGCGTACCAGGCAATGGCCATTACCAGTGGTATTTTCGATCACATCAAGGC CGATGCGACAGGCACGGAAATGGCCTTTTACAATTACGGCTGGTGGGACCTCAACTTCGACGATCTCGTCTATCGCCACGATTACCCGACAGGTGGAA GCCGTGTCTCCCGCCGACCTGCCGGCACTCGCCGTTTTTCGATGATATTGGTTGGGCGACCATCAAAAAGACATGGAAGACCCGGACCGGCACCTGC AGTTGCTCTCAAATCCAGCCCTTACGGTTGCTCAGCCACAGTCACGGCGACCAGAATGCCTTTGTGCTTTATGCCCATGGCGAGGATCTGGCGAT CCAGTCCGGTTATTACGTGGCGTTCAATTCGCAGATGCATCTGAATTGGCGGCGTCAGACACGGTCGAAAAATGCCGTGCTGATCGGCGGCAAAGGC CAATATGCGGAAAAGGACAAGGCGCTTGCACGCCGCGCCGCGCCGCGCATCGTCTCGGTGGAGGAACAGCCGGCCATGTTCGTATCGTTCGGCGATG CAACCGCCGCTACCAGGTTGCGAACCCGCTGGTTCAAAGGTGCTGCGCGAAACCCACTTCGTTAATGACAGCTATTTTCGTGATTGTGACGAAGT</p>			

CGAATGTTTCGGAACCCAGGAACTGCAATGGCTTTGCCATACACTCGGAGCGCCGACAGACCGGCAGGTCAAGCTTCCGCTACAATGGCCGGAAAGCC
 GGTTTCTACGGACAGTTTCGTTTACTCTTCGGGCGGCACGCCGCAAATCAGCGCCGTGGAGGGTTTTCCCGATATCGACCCGAAAGAATTCGAAGGGC
 TCGACATAACACCACCATGTCTGCGCCACGGTTCGGGCCGCCACCCGGCATCGCCTTGTACCCTTCTGGTGCCTTACAGCCTGAAGGAGCCGAAGCG
 CATTTTCAGCTTCATCGATGATCAGGGTTTTCCACCGACATCTACTTCAGTGATGTGATGACGAGCGTTTCAAGCTCTCCCTTCCCAAGCAGTTC
 TAA

Elemento regulador /gen	ADH2t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
GCGGATCTCTTATGTCTTTACGATTTATAGTTTTTCATTATCAAGTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTCGAAGTTTCACG AATAAAAGATAATATTCTACTTTTTGCTCCCACCGCGTTTTGCTAGCACGAGTGAACACCATCCCTCGCCTGTGAGTTGTACCCATTCTCTAAACTG TAGACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTCGTTATGTACGGCATCCTCCAACAAAACAGTCGGTTATAGTTTTGTCTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGAT ATTTCTCATTTTCTTCGCATGCCAGCATTGAAATGATCGAAGTTCAATGATGAAACGGTAATTCTTCTGTCATTTACTCATCTCATCTCAAGT TATATAATTCTA			

4. Modulo DehR

Elemento regulador /gen	TEF1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
CCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGT TGCTGACAGAAGCCTCAAGAAAAAATAATTTCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGT TCCATCACCTTCTTTTTCTGGTGTGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCTATTTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTTTTCTAATATATA AATTCTCTTGCATTTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTATTCCCTTCAAGGTTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAAATATACGG TCAACGAACATAATTAACTAAAC			

Elemento regulador /gen	Atu1557	Origen	<i>A. tumefaciens</i> C58
ATGTTCAACAACGTCCGCCTATGCCTGCGATGACGGCTCTTCGCCGATGAAGCTCGCGACCATCAGGCGCCGCGATCCCGGTCCGCGCGATGTCGAAA TCGAGATAGAAATCTGTGGCGTCTGCCACTCGGACATCCATACGGCCCGCAGCGAATGGCCGGGCTCCCTCTACCCTTTCGCTCCCCGGCCACGAAAT CGTCGGCCGTGTCGGTCCGGTGGGCGCGCAAGTCACCCGGTTCAAGACGGGTGACCGCGTCCGGTGTGCGGCTGTATCGTTCGATAGCTGCCGCGAATGC GCAAGCTGCGCCGAAGGGCTGGAGCAATATTGCGAAAACGGCATGACCGGCACCTATAACTCCCCTGACAAGGCGATGGGCGGGCGGCGGCATACGC TTGGCGGCTATTCCGCCCATGTGGTGGTGGATGACCGCTATGTGCTCAATATTCCCGAAGGGCTCGATCCGGCGGCAGCAGCACCGCTACTCTGCGC TGGTATCACCACTACTCGCCGCTGCGCCACTGGAATGCCGGCCCCGGCAAACGCGTCCGGTCTGTCGGTCTGGGCGGCTCGGCCATATGGCCGTC AAGCTCGCCAATGCCATGGGTGCGACTGTGCTGATGATCACCACTCGCCCGCAAGGCGGAGGATGCCAAAAACTCGGCGCACACGAGGTGATCA TCTCCCGCGATGCGGAGCAGATGAAGAAGGCTACCTCGAGCCTCGATCTCATCATCGATGCTGTGCGCGCCGACCACGACATCGACGCTATCTGGC GCTGCTGAAACGCGATGGCGCGTGGTGCAGGTGGGCGCGCCGAAAAGCCACTTTCGGTGTGGCCTTCAGCCTCATCCCCGGCCGCAAGACCTTT GCCGGCTCGATGATCGGCGGTATTCCCAGACTCAGGAAATGCTGGATTTCTGCGCCGAAAAGGCATCGCCGGCGAAATCGAGATGATCGATATCG ATCAGATCAATGACGCTTATGAACGCATGATAAAAAGCGATGTGCGTTATCGTTTCGTATTGATATGAAGAGCCTGCCGCGCCAGAAGGCCGCTG A			

Elemento regulador /gen	TPI1t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
GATTAATATAAATTATATAAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAAAATAAATTGATGACTACGGAAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTTCATTCTGAGCCACTTAAATTTTCGTGAATGTTCTTGTAAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATAACAACAAAAGCAAGGCGCTTTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATTTAACAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAATATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGTAATAATGTGTACGATCTCTATATGGTTACTCATAAGTGTACCGAAGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTTTCACTGGAGGCGTCATTTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCACTGTTATATA			
5. Modulo KDGK			
Elemento regulador /gen	HXT7p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
ACTTCTCGTAGGAACAATTTCTGGGCCCTGCGTGTTCTTCTGAGGTTTCATCTTTTACATTTGCTTCTGCTGGATAATTTTCAGAGGCAACAAGGAAAATTAGATGGCAAAAAGTCGTCTTTCAAGGAAAAATCCCCACCATCTTTTCGAGATCCCCTGTAACCTTATTGGCAACTGAAAGAATGAAAAGGAGGAAATAACAAAATATACTAGAACTGAAAAAAAAAAGTATAAATAGAGACGATATATGCCAATACTTCACAATGTTTCGAATCTATTCTTTCATTTGCAGCTATTGTAATAATAAAAACATCAAGAACAACAAGCTCAACTTGTCTTTTCTAAGAACAAGAATAAACACAAAAACAAAAGTTTTTTTTAATTTTAACTCAAAA			
Elemento regulador /gen	KDGK	Origen	<i>E. coli</i>
ATGTCCAAAAAGATTGCCGTGATTGGCGAATGCATGATTGAGCTTTCCGAGAAAGGCGCGGACGTTAAGCGCGGTTTCGGCGGCGATACCCTGAACACTTCCGTCTATATCGCCCCGTCAGGTCGATCCTGCGGCATTAACCGTTCATTACGTAACGGCGCTGGGAACGGACAGTTTTAGCCAGCAGATGCTGGAAGCGCCTGGCACGGCGAGAACGTTGATACTTCCCTGACCCAACGGATGGAAAACCGTCTGCCGGGCCTTTACTACATTGAAACCGACAGCACCGGCGAGCGTACGTTCTACTACTGGCGGAACGAAGCCGCCGCAAATTCGGCTGGAGAGTGAGCAGTCTGCCGGCGATTTGCCGAAGAGCTGGCGAATTTTCGATTATCTCTACCTGAGCGGGATTAGCCTGGCGATCTTAAGCCCAGCCAGCCGCGAAAAGCTGCTTTCCTGCTGCGCGAATGCCGCGCCAACGGCGGAAAAGTGATTTTCGACAATAACTATCGTCCGCGCCTGTGGGCCAGCAAAGAAGAGACACAGCAGGTGTACCAACAAATGCTGGAATGCACGGATATCGCCTTCCTGACGCTGGACGACGAAGACGCGCTGTGGGGTCAACAGCCGGTGGAAAGACGTCATTGCGCGCACCCATAACGCGGGCGTGAAAGAAGTGGTGGTGAAACGCGGGGCGGATTCTTGCCTGGTGTCCATTGCTGGCGAAGGGTTAGTGGATGTTCCGGCGGTGAAACTGCCGAAAAGAAAAGTGATCGATAACCACCGCAGCTGGCGACTCTTTTCAGTGCCGGTTATCTGGCGGTACGTCGTGACAGGCGGCAGCGCGGAAGACGCGGCGAAACGTGGGCACCTGACCGCAAGTACCGTTATTCAGTATCGCGGCGCGATTATCCCGCGTGAGGCGATGCCAGCGTAA			
Elemento regulador /gen	PGI1t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
TAACAAAATCACGATCTGGGTGGGTGTGGGTGTATTGGATTATAGGAAGCCACGCGCTCAACCTGGAATTACAGGAAGCTGGTAATTTTTTGGGTTTGCAATCATCACCATCTGCACGTTGTTATAATGTCCCGTGTCTATATATATCCATTGACGGTATTCTATTTTTTTGCTATTGAAATGAGCGTTTTTTGTTACTACAATTGGTTTTACAGACGGAATTTCCCTATTTGTTTCGTCCATTTTTCTTTCTCATTGTTCTCATATCTTAAAAGGTCTTTCTTCATAATCAATGCTTTCTTTTACTTAATATTTACTTGCATTCAGTGAATTTAATACATATTCCTCTAGTCTTGCAAAATCGATTTAGAATCAAGATACCAGCCTAAAA			

6. Modulo KDGPA				
Elemento regulador /gen	FBA1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c	
TCCAACCTGGCACCCTGGCTTGAACAACAATACCAGCCTTCCAACCTTCTGTAAATAACGGCGGTACGCCAGTGCCACCAGTACCCTTACCTTTCCGGT ATACCTCCTTTCCCCATGTTTCCAATGCCCTTCATGCCTCCAACGGCTACTATCACAAATCCTCATCAAGCTGACGCAAGCCCTAAGAAATGAATAA CAATACTGACAGTACTAAATAATTGCCTACTTGGCTTACATACGTTGCATACGTCGATATAGATAATAATGATAATGACAGCAGGATTATCGTAAT ACGTAATAGTTGAAAATCTCAAAAATGTGTGGGTCATTACGTAAATAATGATAGGAATGGGATTCTTCTATTTTTTCCATTCTAGCAGCCG TCGGAAAACGTGGCATCCTCTCTTTCCGGCTCAATTGGAGTACGCTGCCGTGAGCATCCTCTCTTTCCATATCTAACAACCTGAGCACGTAACCAA TGGAAAAGCATGAGCTTAGCGTTGCTCCAAAAAAGTATTGGATGGTTAATACCATTTGTCTGTTCTCTTCTGACTTTGACTCCTCAAAAAAAAAAAAA TCTACAATCAACAGATCGCTTCAATTACGCCCTCACAAAAACTTTTTTCTTCTTCTCGCCACGTTAAATTTTTATCCCTCATGTTGTCTAACGGA TTTCTGCACTTGATTTATTATAAAAAGACAAAGACATAATACTTCTCTATCAATTTAGTTATTGTTCTTCTTCTGCTTATTCTTCTGTTCTTCTTT TTCTTTTGTCTATATAACCATAACCAAGTAATACATATTCAA				
Elemento regulador /gen	KDGPA	Origen	<i>B. subtilis</i> 168	
ATGGAGTCCAAAGTCGTTGAAAACCGTCTGAAAGAAGCAAAGCTGATTGCAGTCATTTCGTTCAAAGGATAAGCAGGAGGCCTGTCAGCAGATTGAGA GTTTATTAGATAAAGGGATTTCGTGCAGTTGAAGTGACGTATACGACCCCCGGGCATCAGATATTATCGAATCCTTCCGTAATAGGGAAGATATTTT AATTGGCGCGGGTACGGTCATCAGCGCGCAGCAAGCTGGGGAAGCTGCTAAGGCTGGCGCGCAGTTTATTGTCAGTCCGGGTTTTTTCAGCTGATCTT GCTGAACATCTATCTTTTGTAAAGACACATTATATCCCCGGCGTCTTGACTCCGAGCGAAATTTATGGAAGCGCTGACATTCGGTTTTTACGACATTAA AGCTGTTCCCAAGCGGTGTGTTGGCATTCCGTTTATGAAAAATTTAGCGGGTCTTTCCCGCAGGTGACCTTTATTCCGACAGGCGGGATACATCC GTCTGAAGTGCCTGATTGGCTTAGAGCCGGAGCTGGCGCCGTGGAGTCCGAGCCAGTTGGGCAGCTGTTCAAAGAGGATTTGCAGGCTGTTTTT CAAGTGTA				
Elemento regulador /gen	FBA1t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c	
GTTAATTCAAATTAATTGATATAGTTTTTAAATGAGTATTGAATCTGTTTAGAAATAATGGAATATTATTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTG GGCTCTTTTTCTTCTGAAGGTCAATGACAAAATGATATGAAGGAAATAATGATTTCTAAAATTTTACAACGTAAGATATTTTTTACAAAAGCCTAGCTC ATCTTTTGTCTATGCACTATTTTACTCACGCTTGAATTAACGGCCAGTCCACTGCGGAGTCATTTCAAAGTCATCCTAATCGATCTATCGTTTTTGA TAGCTCATTTTGGAGTTCGCGATTGTCTTCTGTTATTACAACTGTTTTAATTTTTATTTTATTCTGGAACCTTTCGAGTTCTTTGTAAAGTCTTTC ATAGTAGCTTAC				
7. Modulo Transportador quTD				
Elemento regulador /gen	PDC1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c	
CATGCGACTGGGTGAGCATATGTTCCGCTGATGTGATGTGCAAGATAAACAAGCAAGGCAGAAACTAAGTCTTCTTTCATGTAATAAACACACCCCG CGTTTTATTTACCTATCTCTAACTTCAACACCTTATATCATAACTAATATTTCTTGAGATAAGCACACTGCACCCATACCTTCCTTAAAAACGTAGC TTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCTTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAAATGCATAACCTATGCA TTTAAAAGATTATGTATGCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTGTGTGTTTAC				

GGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTTGAGTACTTTTCTTCATAATTGCA
 TAATATTGTCCGCTGCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCT
 CATTTGAATCAGCTTATGGTGTGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAAATATAAACCAAGGCTCTTTCAC
 TCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTCCCTTTATTTTCATATTTCTTGTTCATATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAA
 AATAACACAGTCAAATCAATCAAA

Elemento regulador /gen	quTD	Origen	<i>A. nidulans</i>
ATGTCCATCCTCGCCTTGGTCGAAGACCGCCCAACTCCCCGCGAGGTTTACAACCTGGCGCGTCTACCTCCTGGCCGAGTCGCCTCCTTCACATCAT GCATGATCGGCTACGACAGCGCCTTCATCGGCACAACGCTGTCTCTGCAATCCTTTCAAAAATGAATTTAATTGGGAATCGCTCAATACGGATCTCAT CAGCGCAATATCGTCTCGCTATATCAAGCAGGTGCCTTCTTCGGCGCTCTTTTCGCGTACCCCATCGGCCACTTCTGGGGCCGCCGTTGGGGTCTT ATGTTCTCTGCTCTTATTTTTCTTCCTTGGTGCCGGCATGATGCTCGGTGCGAATGGGGATCGAGGGCTAGGGCTGATCTATGGTGGCCGAGTGCTTG CGGGCATTGGCGTGGCGCCGGGTGCAACATCTGTCTATCTACATCTCAGAAATGGCACCTCCCCTATTTCGGGGTGCCTTGTGGGGTTTATGA GCTGGGTTGGCAGATTGGTGGCGTCTGGGTTCTGGATCAATGTACTTCCCCTTATTTTTCTCTGGTTTTCCAGGTTTGTCTAACAGAATAGTACGG CGTGGACGAAACCCTTGCCCAAGCCACAAACAATGGATCATCCCCTTTGCCGTGCAATTGATTCCTGCTGGCCTGCTCATTATCGGGCGCCCTCTTG ATCCGCAATCTCCTCGTTGGCTCTTCCTCCGCGTAACCGTGAAAAGGGCATTGAGACCCTGGCCTGGATCCGCAACCTGCCAGCCGACCATATCT ATATGGTTCGAGGAAATCAACATGATCGAGCAGTGCCTCGAACAACAGCGTGTCAAATTTGGGCTTGGTTTTCTGGAACCCTTTAAAGCAGCCTGGAC GAACAAGCGTATTCTCTACCGCCTCTTTTTGGGGTCTATGTTGTTCTCTGGCAGAACGGGTGAGGCATCAATGCGATCAACTATTACAGCCCGCGC GTCTTCAAGAGTATTGGCGTATCGGGTGGCAATACCTCACTCTTGACAACGGGCATTTTTCGGTGTCGTCAGGCGGTCAATTACCTTTGTTTGGCTGT TGTATTTGATCGATCATTTTGGACGACGGAACCTTGCTGCTTGTGGTGGCGGGCGGTTGAGTCTGCCTTTGGATTGTGGGCGGATACATCAAGAT CGCGAAGCCAGAGAACAACCCCGAGGGAACGCAGCTTGATAGCGGTGGCATTGCGGCTATATTTCTTCTTACCTGTGGACGGCCTTCTATACACCA TCTTGGAACGGCACGCCTTGGGTCATCAACTCGGTAAGTCTCCTTCGTGGCCTTCCAAAAGAAAGCACATATTAACAGTGTCCGCAGGAAATGTTTCG ATCCCACCGTCCGCTCCCTTGCACAAGCCTGTGCTGCCGCTCAAACCTGGCTCTGGAACCTTTCTGATCTCTCGCTTTACGCCCCAGATGTTACGCTC CATGGGATACGGAGTCTACTTCTTCTTTGCATCGTTGATGATCCTCTCGATCGTGTGTTGTTTTCTTCTCATTCCCAGACGAAGGGCGTGCCGCTG GAGAGCATGGAGACTCTATTTGACAAGAAACCGGTTTGGCAGCCCATTCGCAGCTAATCAGGGAGCTGAGGGAGAATGAGGAGGCGTTCCGGGCGG ATATGGGTGCGAGTGGGAAGGGAGGTGTGACGAAGGAGTATGTCGAGGAGGCTTAA			

Elemento regulador /gen	ENO2t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
AGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATAGTTTATGAATCTATTTAGG TTTAAAAATGATACAGTTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAAAAAAGGTGCACACGCGT GGCTTTTTTCTTGAATTTGCAGTTTGAATAAATACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAATCAGCTGGTAACG TCTTCGTTAATTGGATACTCAAAAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCATATGGGAGATG GAGATGATACCT			

8. Modulo Transportador GAT-1

Elemento regulador /gen	PDC1p	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
-------------------------	-------	--------	-------------------------------

CATGCGACTGGGTGAGCATATGTTCCGCTGATGTGATGTGCAAGATAAACCAAGCAAGGCAGAACTAACTTCTTCTTCATGTAATAAACACACCCCG
CGTTTTATTTACCTATCTCTAACTTCAACACCTTATATCATAACTAATATTTCTTGAGATAAGCACACTGCACCCATACCTTCCTTAAAAACGTAGC
TTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCCCTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAAATGCATAACCTATGCA
TTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTTGTGTGTTAC
GGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCCTTGGAGTACTTTTCTTCATAATTGCA
TAATATTGTCCGCTGCCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCT
CATTTGAATCAGCTTATGGTGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAATATATAAACCAAGGCTCTTTCAC
TCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCTTTATTTTCATATTTCTTGTCAATTTCTTCAATTATTTTTCTACTCATAACCTCACGCAA
AATAACACAGTCAAATCAATCAAA

Elemento regulador /gen	gat-1	Origen	<i>N. crassa</i> 074A
ATGGGTCTTTCGATAGGAAATAGGATCCTCCGAAAATTGTCAAAAATGAGGCCATGGCAGAAGATCCCCAGAGATCTATGGCTGGCGTGTCTATC TCCTAGCGTGCTCTGCCTGCTTCGGCGCCATGTCTTTCCGGCTGGGATTCCCTCCGTCATCGGCGGCGTCATCGAACTCGAACCCTTTAAACACGACTT TGGCTTCATCGGCAACGATAAAGCCAAGGCCAACCTGGGCGCAATATCGTCTCTACCCTCCAAGCCGGCTGCTTCCTCGGTGCGCTGATCGCCTCA CCTATAACCGATCGCTTCGGCCGCAAGTGGTGTCTCATCGCTGTCTCCCTGGTGTGTCATCATCGGTATCATCATGCAAGCCGCCGCTCAGGCAACC TCGACCCCATGTACATTGGCCGTTTTCGTCGCCGGCGTGGGCGTCGGCGCCGCGCAGCTGCATCAACCCGCTTTTGTGTCTGAGAACGCTCCCCGCTC GATCCGCGGTCTGTTGACGGCCCTTACCAACTCTTCATTGTCACCGGCGGCATGATCGCATTTCTGGATCAACTACTCCGCTCTCTGCACTTCAAG GGCAAATCCATGTACATCTTCCCGCTCGCCATCCAAGGTCTTCCCGCCGGCCTTTTTGTGCGTCTGCATGCTCCTCTGCCACGAAAGCCCGCGTGGC TGGCCCGTCTGACCGATGGGAAGAATGCAAGTCTGTGCTGGCGCGCATCCGCAACCTCCCCCAGACCACCCGTACATCGTCGACGAGTCCGCGA GATCCAGGACCAGCTCGAACAGGAGCGTCTCCAGGGCGACGCCACTTACTGGGACTTGACCCGCGATATGTGGACCGTCGCCGGCAACCGCAAG CGCGCCCTGATTAGTATTTTTCTTGATGATCTGCCAGCAAAATGACGGGCACCAACGCCATCAACACGTACGCGCCTACCATCTTCAAGAACTGGGTA TCACCGGCACGTCGACTAGCTTGTTTAGTACGGCATCTATGGTATTGTCAAGGTGCTTAGCTGCGTCATTTTTCTTGCTGTTCTTGGCCGACTCGCT GGGTGCTAGACGTTTCGCTGCTGTGGACGTCGATTGCGCAGGGTCTTGCTATGTTTTATATTGGCCTTTATGTCCGCATCTCGCCGCCGATTGATGGC CAGCCGGTGCCGCTGCGGGTATGTAGCGTGGTGTGCATATTTCTGTTTGCTGCTTTCTTCCAATTTGGCTGGGGTCTGCCTGCTGGATCTACG CCTCGAAAATCCCCGCCGCCGCTGCGCTCCCTCAACGTGTCTACGCCGCCGCGACGCAGTGGCTGTTCAATTTGTCGTTGGCCCGCGCCGTGCC TACTATGCTGGTACGGTCGGCCCCACGGTTACGGCACCTACCTCATCTTTGGCAGCTTCTGCCTCAGCATGTTTGTCTTTGTCTGGTTCTTCGTG CCCAGACAAAGGTATCTCGCTTGAGCACATGGATGAGCTGTTTGGCGTTACTGATGGGCCTGCCGCTGAGAAGTCGTCGGTGCATGGTGGAGATG ATGTCGGGTGCGAGATGGGAAGGGGGATCAGAAGTCGAAGCATGTGGAGGTTTATGTTTAA			

Elemento regulador /gen	ENO2t	Origen	<i>S. cerevisiae</i> S288c
AGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTTCATCATAGTTTGAACACTTTTATATTAACGAATAGTTTATGAATCTATTTAGG TTTAAAAATTGATACAGTTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAAGGGGAAAAAAGGTGCACACGCGT GGCTTTTTTCTTGAATTTGCAGTTTGA AAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAATCAGCTGGTAACG TCTTCGTTAATTGGATACTCAAAAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCATATGGGAGATG GAGATGATACCT			

D. Cepas de levaduras

Tabla D.1: Estado del arte de levadura optimizadas para la producción de alcoholes.

Especie	Cepa	Producto	Concentración máxima g/L	Productividad máxima (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fuente Biomasa	Observación	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	S288c	Etanol	16,50	0,80	Maíz	Silvestre	(Pereira et al., 2010)
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 8739	Etanol	36,20	1,90	DEHU	Recombinante - alginolítica	(Enquist-Newman et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	UVN R56	Etanol	26,70	1,40	Melaza	Mutagénesis UV	(Thammasittiro ng et al., 2013)
<i>S. cerevisiae</i>	424A (LNH-ST)	Etanol	40,00	2,00	Maíz	Recombinante - xilanasa	(Lau and Dale, 2009; Sedlak and Ho, 2004)
<i>S. cerevisiae</i>	CAT-1	Etanol	21,08	2,11	Medio YPD	Evolución adaptativa	(Basso et al., 2010; Costa et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	PE-2	Etanol	19,43	1,94	Medio YPD	Evolución adaptativa	(Argueso et al., 2009; Costa et al., 2014; Soares-Costa et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	LBM-1	Etanol	22,24	2,22	Medio YPD	Nativa	(Costa et al., 2014)
<i>K. Marxianus</i>	UFV-3	Etanol	22,62	2,26	Medio YPD	Nativa	(Costa et al., 2014)
<i>K. Marxianus</i>	ATCC 8554	Etanol	22,32	2,23	Medio YPD	Nativa	(Costa et al., 2014)
<i>K. Marxianus</i>	CCT 4086	Etanol	21,48	2,15	Medio YPD	Nativa	(Costa et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	JP1	Etanol	-	-	-	Selección asistida por marcadores	(da Silva Filho et al., 2005)
<i>S. cerevisiae</i>	VR-1	Etanol	-	-	-	Evolución adaptativa	(Stambuk et al., 2009)
<i>S. cerevisiae</i>	CEN. PK11 3-7D	Etanol	80,00	2,00	Medio YEPD15	auxótrofa URA3	(Paciello et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	YJM7 89	Etanol	40,00	2,20	Medio YPD (mod.)	Baker yeast	(Wasungu and Simard, 1982)
<i>S. cerevisiae</i>	AWRI 1631	Etanol	90,00	1,25	Mosto Uva	Cepa Vínica Australiana	(Borneman et al., 2008; Contreras et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	EC11 18	Etanol	170,00	-	Mosto uva	Cepa Vínica Industrial	(Bauer and Pretorius, 2000; Lallemand, 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	K1-V111 6_M odificada	Etanol	260	2.9	Lignocelulosa	Recombinante - celulasas	(Khramtsov et al., 2011)

<i>C. Saccharobutylicum</i>	Ox29	Butanol	9.2	-	Hemicelulosa	Nuevo Aislado	(Berezina et al., 2009)
<i>C. acetobutylicum</i>	PJC4 BK	Butanol	16.7	-	Medio LB	Recombinante - knockout	(Harris et al., 2000)
<i>C. acetobutylicum</i>	SolR H (ptAAD)	Butanol	17.6	-	Melaza	Selección asistida por marcadores	(Harris et al., 2001)
<i>C. acetobutylicum</i>	EA2018	Butanol	14.4	-	Maíz	Mutagénesis Química	(Zhang, 1997)
<i>S. cerevisiae</i>	CEN. PK 102-5B	Butanol	0.092	-	Definido (glicina)	Recombinante	(Branduardi et al., 2013)
<i>S. cerevisiae</i>	ESY2-3-4	Butanol	0.0025	-	Medio SD	Recombinante	(Steen et al., 2008)

Tabla D2. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio.

Especie	Cepa	Aislado	Genes presentes
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Nativa	N/A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia1	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia2	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia3	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia4	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia5	Sc-HPH-Aly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia6	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia7	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia8	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia9	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia10	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia11	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia12	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia13	Sc-Aly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia14	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia15	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia16	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia17	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia18	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia19	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia20	Sc-HPH-Aly-Oly

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia21	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia22	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia23	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia24	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia25	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia26	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia27	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia28	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia29	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia30	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia31	Sc-HPH-DehR-KDGK-KDGPA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia32	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia33	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia34	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia35	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia36	Sc-HPH-KDGK-KDGPA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia37	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia38	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia39	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia40	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia41	Sc-HPH-Aly-Oly
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia42	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia43	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia44	Sc-HPH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia45	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia46	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR
<i>Saccharomyces cerevisiae*</i>	S288c	Colonia47	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR-KDGK-KDGPA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia48	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia49	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288c	Colonia50	Sc-HPH-Aly-Oly-DehR-KDGK-KDGPA

*: Clon seleccionado para los ensayos posteriores.

E. Cepas de *E. coli*

Muestra el número de cepas transformantes que se han generado y que han sido utilizadas en este estudio.

<i>Especie</i>	Cepa	Plásmido	Genotipo
<i>E. coli</i>	TOP10	-	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-HPH	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-Aly	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-Oly	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-DehR	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-KDGK	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-KDGPA	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-quTD	AmpR ⁺
<i>E. coli</i>	TOP10	pSB-GAT-1	AmpR ⁺

F. Tabla herramientas de modelamiento estructural y proteínas y Docking Molecular

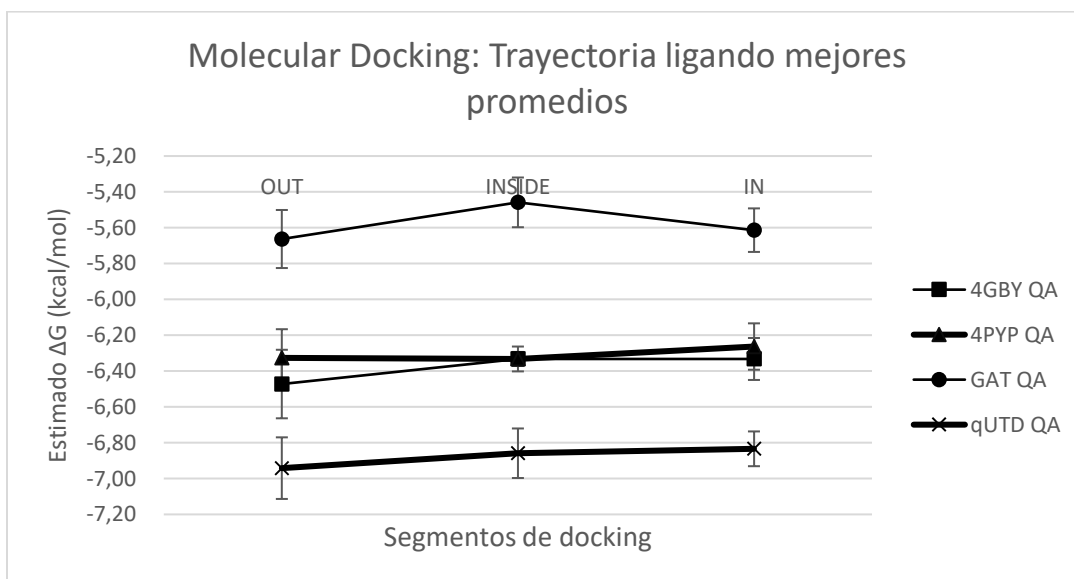
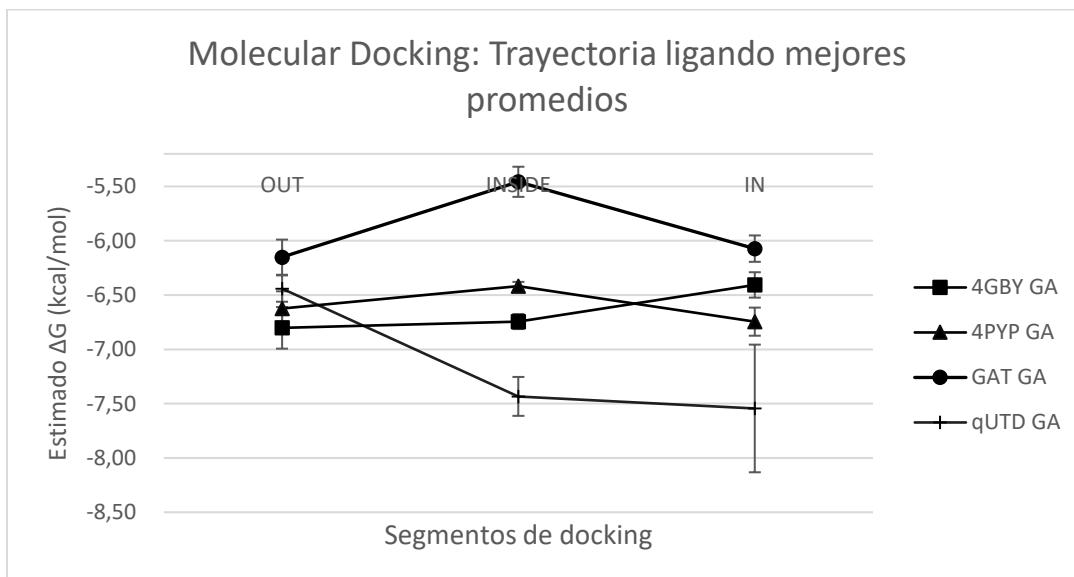
Nombre	Tipo	acceso	Referencia
CATH	S	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath	(Orengo et al., 1999)
GeneBank	S	www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank	(Benson et al., 2000)
GeneCensus	S	bioinfo.mbb.yale.edu/modbase	(Gerstein and Levitt, 1997)
MODBASE	S	guitar.rockefeller.edu/modbase	(Pieper et al., 2011)
PDB	S	www.rcsb.org/pdb	(Bernstein et al., 1977)
PRESAGE	S	presage.stanford.edu	(Brenner et al., 1998)
SCOP	S	scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop	(Conte et al., 2000)
SWISSPROT+			(Bairoch and Apweiler, 2000)
TrEMBL		www.ebi.ac.uk/swissprot	
Templados			
123D	S	www.lmmb.ncicrf.gov/~nicka/123D.html	(Alexandrov et al., 1996) (Altschul et al., 1990)
BLAST	S	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast	
DALI	S	www2.ebi.ac.uk/dali	(Holm and Sander, 1999)
FastA	S	www2.ebi.ac.uk/fasta3	(Pearson, 1995)
MATCHMAKER	P	bioinformatics.burnham-inst.org www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html	(Godzik et al., 1992)
PHD, TOPITS	S		(Rost, 1995)
PROFIT	P	www.came.sbg.ac.at globin.bio.warwick.ac.uk/~jones/threader.html	(Flockner et al., 1995)
THREADER	P	www.doe-mbi.ucla.edu/people/frsvr/frsvr.html	(Jones et al., 1992)
UCLA-DOE FRVSR	S		(Fischer and Eisenberg, 1996)
Alineamiento de secuencias			
BCM Server	S	dot.imgem.bcm.tmc.edu:9331/	(Smith et al., 1996)
BLAST	S	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html	(Altschul et al., 1997)
BLOCK MAKER	S		(Henikoff et al., 1995)

CLUSTAL	S	www2.ebi.ac.uk/clustalw	(Jeanmougin et al., 1998)
FASTA3	S	www2.ebi.ac.uk/FASTA3	(Pearson, 1990)
MULTALIN	S	pbil.ibcp.fr/	(Corpet, 1988)
Modelamiento			(Sutcliffe et al., 1987)
COMPOSER	P	www-cryst.bioc.cam.ac.uk	(Brucoleri, 1993)
CONGEN	P	www.congenomics.com/congen/congen.html	(Lund et al., 1997)
CPH Models	S	www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels	(Aszodi and Taylor, 1996)
Dragon	P	www.nimr.mrc.ac.uk/~mathbio/a- aszodi/dragon.html	-
ICM	P	www.molsoft.com	-
InsightII	P	www.msi.com	-
MODELLER	P	guitar.rockefeller.edu/modeller/modeller.html	(Sali, 1995)
LOOK	P	wwwmag.com	(Levitt, 1992)
QUANTA	P	www.msi.com	(b)
SYBYL	P	www.tripos.com	©
SCWRL	P	www.cmpharm.ucsf.edu/~bower/scrwl/scwl.html	(Bower et al., 1997)
SWISS-MOD	S	www.expasy.ch/swissmod	(Peitsch and Jongeneel, 1993)
WHAT IF	P	www.sander.embl.-heidelberg.de/whatif	(Vriend et al., 1994)
Evaluación de modelos			(Melo and Feytmans, 1998)
ANOLEA	S	www.fund.ac.be/pub/anolea.html	(Laskowski et al., 1996)
AQUA	P	www-nmr.chem.ruu.nl/users/rull/aqua.html	(Hooft et al., 1996; Laskowski et al., 1993)
BIOTECH	S	biotech.embl-ebi.ac.uk:8400/	(Colovos and Yeates, 1993)
ERRAT	S	www.doe-mpi.ucla.edu/errata_server.html	(Laskowski et al., 1993)
PROCHECK	P	www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html	(d)
ProCeyron	P	www.proceyron.com	(Sippl, 1993)
Prosall	P	www.came.sbg.ac.at	(Pontius, 1994)
PROVE	S	www.ucmb.ulb.ac.be/ucmb/prove	(Oldfield, 1992)
SQUID	P	www.yorvic.york.ac.uk/~oldfield/squid	(Lüthy et al., 1992)
VERIFY3D	S	www.doe-mpi.ucla.edu/verify3d.html	

G. Tabla de Molecular Docking

<i>Docking</i>		ΔG [kcal/mol]					Desv		
Proteina	ligando	OUT	INSIDE	IN		Desv OUT	INSIDE	Desv OUT	
4GBY	DEHU	6,53	6,39	6,47	-	0,19	0,07	0,12	
4PYP	DEHU	6,50	6,35	6,63	-	0,16	0,04	0,13	
GAT	DEHU	6,07	5,52	5,93	-	0,16	0,14	0,12	
qUTD	DEHU	6,28	7,40	7,16	-	0,31	0,05	0,31	
4GBY	GA	6,80	6,74	6,41	-	0,20	0,29	0,14	
4PYP	GA	6,63	6,42	6,74	-	0,37	0,10	0,13	
GAT	GA	6,15	5,46	6,07	-	0,20	0,06	0,30	
qUTD	GA	6,44	7,43	7,54	-	0,12	0,18	0,59	
4GBY	QA	6,47	6,33	6,33	-	0,14	0,11	0,11	
4PYP	QA	6,33	6,33	6,26	-	0,17	0,11	0,05	
GAT	QA	5,66	5,46	5,61	-	0,19	0,08	0,09	
qUTD	QA	6,94	6,86	6,83	-	0,17	0,14	0,10	

Valores estimados de ΔG para otros ligando evaluados



H. Tabla de purificación enzimática

Extracción	Enzima	Proteína total (mg)	actividad total (U/min)	actividad específica (U/min/mg)	Factor Purificación	rendimiento (%)
Lisado celular	Aly	7,6	231	30,39	1	100%
Elución	Aly	1,113	68,6	61,64	2,027	30%
Lisado celular	Oly	4,32	14	3,24	1	100%
Elución	Oly	0,97	7	7,22	2,226	50%

Extracción	Enzima	Proteína total (mg)	actividad total (umol/min)	actividad específica (umol/min/mg)	Factor Purificación	rendimiento (%)
Lisado celular	DehR	20	1,89	0,09	1	100%
Elución	DehR	-	-	-	-	-
Lisado celular	KDGK	4,3	0,5	0,12	1	100%
Elución	KDGK	1,54	0,23	0,15	1,28	46%
Lisado celular	KDGPA	4,54	0,7	0,15	1	100%
Elución	KDGPA	0,967	0,342	0,35	2,29	49%

I. Resultados de secuenciación

Consensus Alignment: Aly_Template, Aly_T7_promoter, Aly_T7_ter...

I. Resultados de Secuenciación y Alineamiento

ACTCAAGACGCACAGATATTATAACATCTGCACAATAGGCATTTGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACTGCATTTA
 consensus sequence Untitled Consensus

ACTCAAGACGCACAGATATTATAACATCTGCACAATAGGCATTTGCAAGAATTACTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACTGCATTTA
 aligned sequence Aly_Template

-----CTCGTGAGTAAGGAAAGAGTGAGGAACTATCGCATACTGCATTTA
 aligned sequence Aly_T7_promoter

 aligned sequence Aly_T7_terminator

AAGATGCCGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGGAAGTGTTTCCCTCCTTCTTGAATTGATGT
 consensus sequence Untitled Consensus

AAGATGCCGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGGAAGTGTTTCCCTCCTTCTTGAATTGATGT
 aligned sequence Aly_Template

AAGATGCCGATTTGGGCGCGAATCCTTTATTTTGGCTTCACCCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAAGGAAGTGTTTCCCTCCTTCTTGAATTGATGT
 aligned sequence Aly_T7_promoter

 aligned sequence Aly_T7_terminator



TACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAACAACTGAAAAACCCAGACACGCTCG
consensus sequence Untitled Consensus

TACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAACAACTGAAAAACCCAGACACGCTCG
aligned sequence Aly_Template

TACCCTCATAAAGCACGTGGCCTCTTATCGAGAAAGAAATTACCGTCGCTCGTGATTTGTTTGCAAAAAGAACAACAACTGAAAAACCCAGACACGCTCG
aligned sequence Aly_T7_promoter

aligned sequence Aly_T7_terminator



ACTTCCTGTCTTCCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGA
consensus sequence Untitled Consensus

ACTTCCTGTCTTCCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGA
aligned sequence Aly_Template

ACTTCCTGTCTTCCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTCACACAACAAGGTCCTAGCGACGGCTCACAGGTTTTGTAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGA
aligned sequence Aly_T7_promoter

aligned sequence Aly_T7_terminator



ATGGCGGGAAAGGTTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTTTCAAACAGA
consensus sequence Untitled Consensus

ATGGCGGGAAAGGTTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTTTCAAACAGA
aligned sequence Aly_Template

ATGGCGGGAAAGGTTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTTCGATCGTACTGTTACTCTCTCTTTCAAACAGA
aligned sequence Aly_T7_promoter

aligned sequence Aly_T7_terminator

ATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAAACTTACATT
 consensus sequence Untitled Consensus

ATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAAACTTACATT
 aligned sequence Aly_Template

ATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTAGTTTAGTAGAACCTCGTGAAACTTACATT
 aligned sequence Aly_T7_promoter

 aligned sequence Aly_T7_terminator

TACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTTCT
 consensus sequence Untitled Consensus

TACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTTCT
 aligned sequence Aly_Template

TACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTTCT
 aligned sequence Aly_T7_promoter


-----AAGAAATACATATTTGGTCTTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTTCT
 aligned sequence Aly_T7_terminator

CTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGAAATTTTGACTTATTTGTTGTTCTTCTTCTTGACTACTG
 consensus sequence Untitled Consensus

CTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGAAATTTTGACTTATTTGTTGTTCTTCTTCTTGACTACTG
 aligned sequence Aly_Template

CTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGAAATTTTGACTTATTTGTTGTTCTTCTTCTTGACTACTG
 aligned sequence Aly_T7_promoter


CTTTTTTACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGAAATTTTGACTTATTTGTTGTTCTTCTTCTTGACTACTG
 aligned sequence Aly_T7_terminator


 CTGAAGCTTCTATTGTTTGGACTCATAATGAATTCGATCCAGCTTATTTCAGAAATGGTATGCATTCTCCAGTTACTGATGAAGATGTTAATGGTTCTGC
 consensus sequence Untitled Consensus

CTGAAGCTTCTATTGTTTGGACTCATAATGAATTCGATCCAGCTTATTTCAGAAATGGTATGCATTCTCCAGTTACTGATGAAGATGTTAATGGTTCTGC
 aligned sequence Aly_Template

CTGAAGCTTCTATTGTTTGGACTCATAATGAATTCGATCCAGCTTATTTCAGAAATGGTATGCATTCTCCAGTTACTGATGAAGATGTTAATGGTTCTGC
 aligned sequence Aly_T7_promoter


CTGAAGCTTCTATTGTTTGGACTCATAATGAATTCGATCCAGCTTATTTCAGAAATGGTATGCATTCTCCAGTTACTGATGAAGATGTTAATGGTTCTGC
 aligned sequence Aly_T7_terminator


 TACTGTTGTTCCAGATCCAAATGGTGGTTCTAATTTGGTTTTGAAAGTTTTCTATGAAAAGGTTCTTATTCTCATCATGGTCCAAATTCTAAAGTTCAA
 consensus sequence Untitled Consensus

TACTGTTGTTCCAGATCCAAATGGTGGTTCTAATTTGGTTTTGAAAGTTTTCTATGAAAAGGTTCTTATTCTCATCATGGTCCAAATTCTAAAGTTCAA
 aligned sequence Aly_Template

TACTGTTGTTCCAGATCCAAATGGTGGTTCTAATTTGGTTTTGAAAGTTTTCTA-----
 aligned sequence Aly_T7_promoter

TACTGTTGTTCCAGATCCAAATGGTGGTTCTAATTTGGTTTTGAAAGTTTTCTATGAAAAGGTTCTTATTCTCATCATGGTCCAAATTCTAAAGTTCAA
 aligned sequence Aly_T7_terminator


 TTCTTCGCTACTCCAATAAACCAAGAGTTGCTATGACTTTGTCTTATGATGTTAGATTTCGATCCAAATTTGATTTCAGAATTGGTGGTAAATTGCCAG
 consensus sequence Untitled Consensus

TTCTTCGCTACTCCAATAAACCAAGAGTTGCTATGACTTTGTCTTATGATGTTAGATTTCGATCCAAATTTGATTTCAGAATTGGTGGTAAATTGCCAG
 aligned sequence Aly_Template

 aligned sequence Aly_T7_promoter

TTCTTCGCTACTCCAATAAACCAAGAGTTGCTATGACTTTGTCTTATGATGTTAGATTTCGATCCAAATTTGATTTCAGAATTGGTGGTAAATTGCCAG
 aligned sequence Aly_T7_terminator



GTTTGTATGGTGGTTTGGTTAATTGTTCTGGTGGTAGACATTCTGATGATTGTTTCTCTACTAGATTCATGTGGAGAGATAATGGTGATGGTGAAGTTTA
consensus sequence Untitled Consensus

GTTTGTATGGTGGTTTGGTTAATTGTTCTGGTGGTAGACATTCTGATGATTGTTTCTCTACTAGATTCATGTGGAGAGATAATGGTGATGGTGAAGTTTA
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter

GTTTGTATGGTGGTTTGGTTAATTGTTCTGGTGGTAGACATTCTGATGATTGTTTCTCTACTAGATTCATGTGGAGAGATAATGGTGATGGTGAAGTTTA
aligned sequence Aly_T7_terminator



TGTTATGTTCCAGATCAATCTCATCAATTGCCAGGTTTCTGTACTAAAATATTTGTGATCCAGTTAAAGGTTTCTCTTTCGGTAGAGGTTCTTGGAGA
consensus sequence Untitled Consensus

TGTTATGTTCCAGATCAATCTCATCAATTGCCAGGTTTCTGTACTAAAATATTTGTGATCCAGTTAAAGGTTTCTCTTTCGGTAGAGGTTCTTGGAGA
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter

TGTTATGTTCCAGATCAATCTCATCAATTGCCAGGTTTCTGTACTAAAATATTTGTGATCCAGTTAAAGGTTTCTCTTTCGGTAGAGGTTCTTGGAGA
aligned sequence Aly_T7_terminator



TTCAAAGAGGTGTTTGGCAAATATTGCTCAATCTATTAATTGAATACTCCAGGTTCTACTGATGGTGCTATTAAGTTGTTTATAATGGTAAAGTTG
consensus sequence Untitled Consensus

TTCAAAGAGGTGTTTGGCAAATATTGCTCAATCTATTAATTGAATACTCCAGGTTCTACTGATGGTGCTATTAAGTTGTTTATAATGGTAAAGTTG
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter

TTCAAAGAGGTGTTTGGCAAATATTGCTCAATCTATTAATTGAATACTCCAGGTTCTACTGATGGTGCTATTAAGTTGTTTATAATGGTAAAGTTG
aligned sequence Aly_T7_terminator



TTTATGCTTCTAATAATTTGGCTTTGAGATCTCAATCTGATGTTAATATTGATGGTATTTTCTTCTCTACTTTCTTCGGTGGTTCTTATGCTAATTGGGC
consensus sequence Untitled Consensus

TTTATGCTTCTAATAATTTGGCTTTGAGATCTCAATCTGATGTTAATATTGATGGTATTTTCTTCTCTACTTTCTTCGGTGGTTCTTATGCTAATTGGGC
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter

TTTATGCTTCTAATAATTTGGCTTTGAGATCTCAATCTGATGTTAATATTGATGGTATTTTCTTCTCTACTTTCTTCGGTGGTTCTTATGCTAATTGGGC
aligned sequence Aly_T7_terminator



TCCAAGTAGAGATTGTTATACTTGGTTCAAAAATTTGCTATTTCTTTTCGATACTGGTCCAGAAGTTGCTGTTGGTTAAACAGGCCCTTTTCCTTTGTC
consensus sequence Untitled Consensus

TCCAAGTAGAGATTGTTATACTTGGTTCAAAAATTTGCTATTTCTTTTCGATACTGGTCCAGAAGTTGCTGTTGGTTAAACAGGCCCTTTTCCTTTGTC
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter

TCCAAGTAGAGATTGTTATACTTGGTTCAAAAATTTGCTATTTCTTTTCGATACTGGTCCAGAAGTTGCTGTTGGTTAAACAGGCCCTTTTCCTTTGTC
aligned sequence Aly_T7_terminator




GATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCC
consensus sequence Untitled Consensus

GATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCC
aligned sequence Aly_Template

aligned sequence Aly_T7_promoter


GATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCC
aligned sequence Aly_T7_terminator


 CTATTTATTTTTTTTAAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAACATT
 consensus sequence Untitled Consensus

CTATTTATTTTTTTTAAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAACATT
 aligned sequence Aly_Template

 aligned sequence Aly_T7_promoter

CTATTTATTTTTTTTAAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAACATT
 aligned sequence Aly_T7_terminator


 ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTCGCAGTTTACACTCTCATCGT
 consensus sequence Untitled Consensus

ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTCGCAGTTTACACTCTCATCGT
 aligned sequence Aly_Template

 aligned sequence Aly_T7_promoter

ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTCGCAGTTTACACTCTCATCGT
 aligned sequence Aly_T7_terminator

Consensus Alignment: Oly_T7_promoter, Oly_template, Oly_T3_pro...

gtaatacgcactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctcgaggtcgacggtatcgataagcttgataAATGCTACTATTTTGGAGATTAATCTC
 consensus sequence Untitled Consensus

gtaatacgcactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctcgaggtcgacggtatcgataagcttgataAATGCTACTATTTTGGAGATTAATCTC
 aligned sequence Oly_T7_promoter

-----AATGCTACTATTTTGGAGATTAATCTC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

AGTACAAAACAATATTTAAAAAGAGGTGAATTATTTTCCCCCTTATTTTTTTTTTGTAAAATTGATCCAAATGTAAATAAACAATCACAAGGAAAAAA
 consensus sequence Untitled Consensus

AGTACAAAACAATATTTAAAAAGAGGTGAATTATTTTCCCCCTTATTTTTTTTTTGTAAAATTGATCCAAATGTAAATAAACAATCACAAGGAAAAAA
 aligned sequence Oly_T7_promoter

AGTACAAAACAATATTTAAAAAGAGGTGAATTATTTTCCCCCTTATTTTTTTTTTGTAAAATTGATCCAAATGTAAATAAACAATCACAAGGAAAAAA
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

AAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCGCCATGACCCCGGATCGTCGGTTGTGATACGGTCAGGGTAGCGCCCTGGTCAAACCTCAGAACTAAAAAAAAATAAAGG
consensus sequence Untitled Consensus

AAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCGCCATGACCCCGGATCGTCGGTTGTGATACGGTCAGGGTAGCGCCCTGGTCAAACCTCAGAACTAAAAAAAAATAAAGG
aligned sequence Oly_T7_promoter

AAAAAAAAAAAAAAAAATAGCCGCCATGACCCCGGATCGTCGGTTGTGATACGGTCAGGGTAGCGCCCTGGTCAAACCTCAGAACTAAAAAAAAATAAAGG
aligned sequence Oly_template

aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter

AAAAAAAAATAGCTAATTTTTCCGGCAGAAAGATTTTCGCTACCCGAAAGTTTTCCGGCAAGCTAAATGGAAAAGGAAAGATTATTGAAAGAGAAAG
consensus sequence Untitled Consensus

AAAAAAAAATAGCTAATTTTTCCGGCAGAAAGATTTTCGCTACCCGAAAGTTTTCCGGCAAGCTAAATGGAAAAGGAAAGATTATTGAAAGAGAAAG
aligned sequence Oly_T7_promoter

AAAAAAAAATAGCTAATTTTTCCGGCAGAAAGATTTTCGCTACCCGAAAGTTTTCCGGCAAGCTAAATGGAAAAGGAAAGATTATTGAAAGAGAAAG
aligned sequence Oly_template

aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter

AAAGAAAAAAAAAAAAATGTACACCCAGACATCGGGCTTCCACAATTTGGGCTCTATTGTTTTCCATCTCTCGCAACGGCGGGATTCTCTATGGCGTGTG
 consensus sequence Untitled Consensus

AAAGAAAAAAAAAAAAATGTACACCCAGACATCGGGCTTCCACAATTTGGGCTCTATTGTTTTCCATCTCTCGCAACGGCGGGATTCTCTATGGCGTGTG
 aligned sequence Oly_T7_promoter

AAAGAAAAAAAAAAAAATGTACACCCAGACATCGGGCTTCCACAATTTGGGCTCTATTGTTTTCCATCTCTCGCAACGGCGGGATTCTCTATGGCGTGTG
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

ATGTCTGTATCTGTTACTTAATCCAGAAACTGGCACTTGACCCA ACTCTGCCACGTGGGTCGTTTTGCCATCGACAGATTGGGAGATTTTCATAGTAGAA
 consensus sequence Untitled Consensus

ATGTCTGTATCTGTTACTTAATCCAGAAACTGGCACTTGACCCA ACTCTGCCACGTGGGTCGTTTTGCCATCGACAGATTGGGAGATTTTCATAGTAGAA
 aligned sequence Oly_T7_promoter

ATGTCTGTATCTGTTACTTAATCCAGAAACTGGCACTTGACCCA ACTCTGCCACGTGGGTCGTTTTGCCATCGACAGATTGGGAGATTTTCATAGTAGAA
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

TACCTTTAGTGTCTTCCTAAAAAAAAAAAAAGGCTCGCCATCAAACGATATTCGTTGGCTTTTTTTTTCTGAATTATAAATACTCTTTGGTAACTTTTCA
consensus sequence Untitled Consensus

TACCTTTAGTGTCTTCCTAAAAAAAAAAAAAGGCTCGCCATCAAACGATATTCGTTGGCTTTTTTTTTCTGAATTATAAATACTCTTTGGTAACTTTTCA
aligned sequence Oly_T7_promoter

TACCTTTAGTGTCTTCCTAAAAAAAAAAAAAGGCTCGCCATCAAACGATATTCGTTGGCTTTTTTTTTCTGAATTATAAATACTCTTTGGTAACTTTTCA
aligned sequence Oly_template

aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter

TTTCCAAGAACCTCTTTTTCCAGTTATATCATGGTCCCCTTTCAAAGTTATTCTCTACTCTTTTTTCATATTCATTCTTTTTTCATCCTTTGGTTTTTTAT
consensus sequence Untitled Consensus


TTTCCAAGAACCTCTTTTTCCAGTTATATCATGGTCCCCTTTCAAAGTTATTCTCTACTCTTTTTTCATATTCATTCTTTTTTCATCCTTTGGTTTTTTAT
aligned sequence Oly_T7_promoter

TTTCCAAGAACCTCTTTTTCCAGTTATATCATGGTCCCCTTTCAAAGTTATTCTCTACTCTTTTTTCATATTCATTCTTTTTTCATCCTTTGGTTTTTTAT
aligned sequence Oly_template

aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



 TCTTAACTTGTTTATTATTCTCTCTTGTGTTTCTATTTACAAGACACCAATCAAACAAATAAAACATCATCACAATGCGTCCCTCTGCCCCGGCCATCTCC

 consensus sequence Untitled Consensus

TCTTAACTTGTTTATTATTCTCTCTTGTGTTTCTATTTACAAGACACCAATCAAACAAATAAAACATCATCACAATGCGTCCCTCTGCCCCGGCCATCTCC

 aligned sequence Oly_T7_promoter

TCTTAACTTGTTTATTATTCTCTCTTGTGTTTCTATTTACAAGACACCAATCAAACAAATAAAACATCATCACAATGCGTCCCTCTGCCCCGGCCATCTCC


 aligned sequence Oly_template

-----AACAAATAAAACATCATCACAATGCGTCCCTCTGCCCCGGCCATCTCC

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter



 AGACAGACTTCTCGATGAACCCCGCCCGGGCTCATTGACCATTGGCTACGAGCCGAGCGAAGAAGCACAACCGACGGAGAACCCTCCGCGCTTTTCAT

 consensus sequence Untitled Consensus

AGACAGACTTCTCGATGAACCCCGCCCGGGCTCATTGACCATTGGCTACGAGCCGAGCGAAGAAGCACAACCGACGGAGAACCCTCCGCGCTTTTCAT

 aligned sequence Oly_T7_promoter

AGACAGACTTCTCGATGAACCCCGCCCGGGCTCATTGACCATTGGCTACGAGCCGAGCGAAGAAGCACAACCGACGGAGAACCCTCCGCGCTTTTCAT

 aligned sequence Oly_template

AGACAGACTTCTCGATGAACCCCGCCCGGGCTCATTGACCATTGGCTACGAGCCGAGCGAAGAAGCACAACCGACGGAGAACCCTCCGCGCTTTTCAT

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter



GGCTACCCGATATTGACGACGGCGCGCGTACGTGCTGCGCATTTCGACCGATCCCGGTTTTACAGACAAAAAACGCTCGTCTTCGAGGATCTCGCCTG
consensus sequence Untitled Consensus

GGCTACCCGATATTGACGACGGCGCGCGTACGTGCTGCGCATTTCGACCGATCCCGGTTTTACAGACAAAAAACGCT-----
aligned sequence Oly_T7_promoter

GGCTACCCGATATTGACGACGGCGCGCGTACGTGCTGCGCATTTCGACCGATCCCGGTTTTACAGACAAAAAACGCTCGTCTTCGAGGATCTCGCCTG
aligned sequence Oly_template

GGCTACCCGATATTGACGACGGCGCGCGTACGTGCTGCGCATTTCGACCGATCCCGGTTTTACAGACAAAAAACGCTCGTCTTCGAGGATCTCGCCTG
aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



GAATTTCTTCACCCCGGATGAAGCACTGCCGGACGGCCATTATCACTGGTGTATGCGCTATGGGATCAGAAATCCGCAACAGCGCATTCCAACCTGGAGC
consensus sequence Untitled Consensus


aligned sequence Oly_T7_promoter

GAATTTCTTCACCCCGGATGAAGCACTGCCGGACGGCCATTATCACTGGTGTATGCGCTATGGGATCAGAAATCCGCAACAGCGCATTCCAACCTGGAGC
aligned sequence Oly_template

GAATTTCTTCACCCCGGATGAAGCACTGCCGGACGGCCATTATCACTGGTGTATGCGCTATGGGATCAGAAATCCGCAACAGCGCATTCCAACCTGGAGC
aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



ACCGTACGCAGTTTTCGAGATCAGTGAAGCACTGCCGAAAACGCCGCTGCCCGGCAGGTCTGCCCGCCATGCTGCCGCGCAAACCAGCCACCCTCGGCTGT
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

ACCGTACGCAGTTTTCGAGATCAGTGAAGCACTGCCGAAAACGCCGCTGCCCGGCAGGTCTGCCCGCCATGCTGCCGCGCAAACCAGCCACCCTCGGCTGT
aligned sequence Oly_template

ACCGTACGCAGTTTTCGAGATCAGTGAAGCACTGCCGAAAACGCCGCTGCCCGGCAGGTCTGCCCGCCATGCTGCCGCGCAAACCAGCCACCCTCGGCTGT
aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



GGCTCAACTCCGAGCAATTGAGTGCCTTCGCCGATGCCGTTGCGAAGGACCCCAACCATTGTGGCTGGGCCGAGTTTTACGAAAAATCGGTTCGAGCCGTG
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

GGCTCAACTCCGAGCAATTGAGTGCCTTCGCCGATGCCGTTGCGAAGGACCCCAACCATTGTGGCTGGGCCGAGTTTTACGAAAAATCGGTTCGAGCCGTG
aligned sequence Oly_template

GGCTCAACTCCGAGCAATTGAGTGCCTTCGCCGATGCCGTTGCGAAGGACCCCAACCATTGTGGCTGGGCCGAGTTTTACGAAAAATCGGTTCGAGCCGTG
aligned sequence Oly_inter_1_FW

aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



GCTCGAGCGGCCGGT CATGCCGGAACCGCAGCCCTATCCCAACAACACGCGTGTGCCACGCTCTGGCGGCAGATGTATATAGACTGCCAGGAAGTGATC
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

GCTCGAGCGGCCGGT CATGCCGGAACCGCAGCCCTATCCCAACAACACGCGTGTGCCACGCTCTGGCGGCAGATGTATATAGACTGCCAGGAAGTGATC
aligned sequence Oly_template

GCTCGAGCGGCCGGT CATGCCGGAACCGCAGCCCTATCCCAACAACACGCGTGTGCCACGCTCTGGCGGCAGATGTATATAGACTGCCAGGAAGTGATC
aligned sequence Oly_inter_1_FW

-----AGGAAGTGATC
aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



TATGCGATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGCTCGGACGCGACGACCTTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTCGCCGCCTGGGACA
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

TATGCGATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGCTCGGACGCGACGACCTTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTCGCCGCCTGGGACA
aligned sequence Oly_template

TATGCGATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGCTCGGACGCGACGACCTTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTCGCCGCCTGGGACA
aligned sequence Oly_inter_1_FW

TATGCGATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGCTCGGACGCGACGACCTTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTCGCCGCCTGGGACA
aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter

CGAAAGGTGCGACCTCACGCGCCTATAATGACGAGGCGGGTTCCGCGTCGTCGTCGCACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CGAAAGGTGCGACCTCACGCGCCTATAATGACGAGGCGGGTTCCGCGTCGTCGTCGCACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGA
 aligned sequence Oly_template

CGAAAGGTGCGACCTCACGCGCCTATAATGACGAGGCGGGTTCCGCGTCGTCGTCGCACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGA
 aligned sequence Oly_inter_1_FW

CGAAAGGTGCGACCTCACGCGCCTATAATGACGAGGCGGGTTCCGCGTCGTCGTCGCACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGA
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

AGACGAACGCAGGACCGTGCGATCCGTTCTTCTCGAACGGACGCGGGAAGTTGCCGATCATGTCATCGCACACGCCCGCATTACAGTCTTTCCCTATGAC
 consensus sequence Untitled Consensus


 aligned sequence Oly_T7_promoter

AGACGAACGCAGGACCGTGCGATCCGTTCTTCTCGAACGGACGCGGGAAGTTGCCGATCATGTCATCGCACACGCCCGCATTACAGTCTTTCCCTATGAC
 aligned sequence Oly_template

AGACGAACGCAGGACCGTGCGATCCGTTCTTCTCGAACGGACGCGGGAAGTTGCCGATCATGTCATCGCACACGCCCGCATTACAGTCTTTCCCTATGAC
 aligned sequence Oly_inter_1_FW

AGACGAACGCAGGACCGTGCGATCCGTTCTTCTCGAACGGACGCGGGAAGTTGCCGATCATGTCATCGCACACGCCCGCATTACAGTCTTTCCCTATGAC
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter



AGCCATGCGGTGCGCTCGCTTTTCGGCTGTATTGACGCCGGCCTGCATCGCACTTCAGGGAGAAAGCGACGAGGCTGGCGAATGGCTCGACTATACCGTCG
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

AGCCATGCGGTGCGCTCGCTTTTCGGCTGTATTGACGCCGGCCTGCATCGCACTTCAGGGAGAAAGCGACGAGGCTGGCGAATGGCTCGACTATACCGTCG
aligned sequence Oly_template

AGCCATGCGGTGCGCTCGCTTTTCGGCTGTATTGACGCCGGCCTGCATCGCACTTCAGGGAGAAAGCGACGAGGCTGGCGAATGGCTCGACTAT-----
aligned sequence Oly_inter_1_FW

AGCCATGCGGTGCGCTCGCTTTTCGGCTGTATTGACGCCGGCCTGCATCGCACTTCAGGGAGAAAGCGACGAGGCTGGCGAATGGCTCGACTATACCGTCG
aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter



AATTCCTTGCCACGCTCTATTCTCCCTGGGCGGGAACCGATGGTGGTTGGGCGGAAGGTCCGCATTACTGGATGACCGGCATGGCCTATCTCATCGAGGC
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence Oly_T7_promoter

AATTCCTTGCCACGCTCTATTCTCCCTGGGCGGGAACCGATGGTGGTTGGGCGGAAGGTCCGCATTACTGGATGACCGGCATGGCCTATCTCATCGAGGC
aligned sequence Oly_template

aligned sequence Oly_inter_1_FW

AATTCCTTGCCACGCTCTATTCTCCCTGGGCGGGAACCGATGGTGGTTGGGCGGAAGGTCCGCATTACTGGATGACCGGCATGGCCTATCTCATCGAGGC
aligned sequence Oly_inter_2_RV

aligned sequence Oly_T3_promoter

CGCCAATCTGATCCGCTCCTATATTGGTTATGACCTCTATCAACGGCCGTTTTTCCAGAATACCGGTCGCTTCCCGCTTTACACCAAGGCGCCGGGAACC
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CGCCAATCTGATCCGCTCCTATATTGGTTATGACCTCTATCAACGGCCGTTTTTCCAGAATACCGGTCGCTTCCCGCTTTACACCAAGGCGCCGGGAACC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

CGCCAATCTGATCCGCTCCTATATTGGTTATGACCTCTATCAACGGCCGTTTTTCCAGAATACCGGTCGCTTCCCGCTTTACACCAAGGCGCCGGGAACC
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

CGCCGCGCCAACTTCGGCGACGACTCCACCCTTGGCGACCTTCCCGGCCTGAAGCTGGGATACAACGTCCGGCAATTCGCCGGCGTCACCGGCAATGGCC
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CGCCGCGCCAACTTCGGCGACGACTCCACCCTTGGCGACCTTCCCGGCCTGAAGCTGGGATACAACGTCCGGCAATTCGCCGGCGTCACCGGCAATGGCC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

CGCCGCGCCAACTTCGGCGACGACTCCACCCTTGGCGACCTTCCCGGCCTGAAGCTGGGATACAACGTCCGGCAATTCGCCGGCGTCACCGGCAATGGCC
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

ATTACCAAGTGGTATTTTCGATCACATCAAGGCCGATGCGACAGGCACGGAAATGGCCTTTTACAATTACGGCTGGTGGGACCTCAACTTCGACGATCTCGT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

ATTACCAAGTGGTATTTTCGATCACATCAAGGCCGATGCGACAGGCACGGAAATGGCCTTTTACAATTACGGCTGGTGGGACCTCAACTTCGACGATCTCGT
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

ATTACCAAGTGGTATTTTCGATCACATCAAGGCCGATGCGACAGGCACGGAAATGGCCTTTTACAATTACGGCTGGTGGGACCTCAACTTCGACGATCTCGT
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

 aligned sequence Oly_T3_promoter

CTATCGCCACGATTACCCGCAGGTGGAAGCCGTGTCTCCCGCCGACCTGCCGGCACTCGCCGTTTTTCGATGATATTGGTTGGGCGACCATCCAAAAGAC
 consensus sequence Untitled Consensus

-----CGTCTTCGAGGA-----
 aligned sequence Oly_T7_promoter

CTATCGCCACGATTACCCGCAGGTGGAAGCCGTGTCTCCCGCCGACCTGCCGGCACTCGCCGTTTTTCGATGATATTGGTTGGGCGACCATCCAAAAGAC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

CTATCGCCACGATTACCCGCAGGTGGAAGCCGTGTCTCCCGCCGACCTGCCGGCACTCGCCGTTTTTCGATGATATTGGTTGGGCGACCATCCAAAAGAC
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

-----TTTCGATGATATTGGTTGGGCGACCATCCAAAAGAC
 aligned sequence Oly_T3_promoter

ATGGAAGACCCGGACCGGCACCTGCAGTTCGTCTTCAAATCCAGCCCTTACGGTTCGCTCAGCCACAGTCACGGCGACCAGAATGCCTTTGTGCTTTATG
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

ATGGAAGACCCGGACCGGCACCTGCAGTTCGTCTTCAAATCCAGCCCTTACGGTTCGCTCAGCCACAGTCACGGCGACCAGAATGCCTTTGTGCTTTATG
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

ATGGAAGACCCGGACCGGCACCTGCAGTTCGTCTTCAAATCCAGCCCTTACGGTTCGCTCAGCCACAGTCACGGCGACCAGAATGCCTTTGTGCTTTATG
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

ATGGAAGACCCGGACCGGCACCTGCAGTTCGTCTTCAAATCCAGCCCTTACGGTTCGCTCAGCCACAGTCACGGCGACCAGAATGCCTTTGTGCTTTATG
 aligned sequence Oly_T3_promoter

CCCATGGCGAGGATCTGGCGATCCAGTCCGGTTATTACGTGGCGTTCAATTCGCAGATGCATCTGAATTGGCGGCGTCAGACACGGTCGAAAAATGCCGT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CCCATGGCGAGGATCTGGCGATCCAGTCCGGTTATTACGTGGCGTTCAATTCGCAGATGCATCTGAATTGGCGGCGTCAGACACGGTCGAAAAATGCCGT
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

CCCATGGCGAGGATCTGGCGATCCAGTCCGGTTATTAC-----
 aligned sequence Oly_inter_2_RV

CCCATGGCGAGGATCTGGCGATCCAGTCCGGTTATTACGTGGCGTTCAATTCGCAGATGCATCTGAATTGGCGGCGTCAGACACGGTCGAAAAATGCCGT
 aligned sequence Oly_T3_promoter


 GCTGATCGGCGGCAAAGGCCAATATGCGGAAAAGGACAAGGCGCTTGCACGCCGCGCCGCCGGCCGCATCGTCTCGGTGGAGGAACAGCCCGGCCATGTT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

GCTGATCGGCGGCAAAGGCCAATATGCGGAAAAGGACAAGGCGCTTGCACGCCGCGCCGCCGGCCGCATCGTCTCGGTGGAGGAACAGCCCGGCCATGTT
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

GCTGATCGGCGGCAAAGGCCAATATGCGGAAAAGGACAAGGCGCTTGCACGCCGCGCCGCCGGCCGCATCGTCTCGGTGGAGGAACAGCCCGGCCATGTT
 aligned sequence Oly_T3_promoter


 CGTATCGTCGGCGATGCAACCGCCGCCTACCAGGTTGCGAACCCGCTGGTTCAAAGGTGCTGCGCGAAACCCACTTCGTTAATGACAGCTATTTGCGTA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CGTATCGTCGGCGATGCAACCGCCGCCTACCAGGTTGCGAACCCGCTGGTTCAAAGGTGCTGCGCGAAACCCACTTCGTTAATGACAGCTATTTGCGTA
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

CGTATCGTCGGCGATGCAACCGCCGCCTACCAGGTTGCGAACCCGCTGGTTCAAAGGTGCTGCGCGAAACCCACTTCGTTAATGACAGCTATTTGCGTA
 aligned sequence Oly_T3_promoter

TTGTTCGACGAAGTCGAATGTTTCGGAACCCCAGGAACTGCAATGGCTTTGCCATACACTCGGAGCGCCGCAGACCCGGCAGGTCAAGCTTCCGCTACAATGG
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

TTGTTCGACGAAGTCGAATGTTTCGGAACCCCAGGAACTGCAATGGCTTTGCCATACACTCGGAGCGCCGCAGACCCGGCAGGTCAAGCTTCCGCTACAATGG
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

TTGTTCGACGAAGTCGAATGTTTCGGAACCCCAGGAACTGCAATGGCTTTGCCATACACTCGGAGCGCCGCAGACCCGGCAGGTCAAGCTTCCGCTACAATGG
 aligned sequence Oly_T3_promoter

CCGAAAGCCGGTTTCTACGGACAGTTCGTTTACTCTTCGGGCGGCACGCCGCAAATCAGCGCCGTGGAGGGTTTTCCCGATATCGACCCGAAAGAATTC
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CCGAAAGCCGGTTTCTACGGACAGTTCGTTTACTCTTCGGGCGGCACGCCGCAAATCAGCGCCGTGGAGGGTTTTCCCGATATCGACCCGAAAGAATTC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

CCGAAAGCCGGTTTCTACGGACAGTTCGTTTACTCTTCGGGCGGCACGCCGCAAATCAGCGCCGTGGAGGGTTTTCCCGATATCGACCCGAAAGAATTC
 aligned sequence Oly_T3_promoter

GAAGGGCTCGACATACACCACCATGTCTGCGCCACGGTTCGGGCCGCCACCCGGCATCGCCTTGTACCCTTCTGGTGCCTTACAGCCTGAAGGAGCCGA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

GAAGGGCTCGACATACACCACCATGTCTGCGCCACGGTTCGGGCCGCCACCCGGCATCGCCTTGTACCCTTCTGGTGCCTTACAGCCTGAAGGAGCCGA
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

GAAGGGCTCGACATACACCACCATGTCTGCGCCACGGTTCGGGCCGCCACCCGGCATCGCCTTGTACCCTTCTGGTGCCTTACAGCCTGAAGGAGCCGA
 aligned sequence Oly_T3_promoter

AGCGCATTTTCAGCTTCATCGATGATCAGGGTTTTTCCACCGACATCTACTTCAGTGATGTCGATGACGAGCGTTTCAAGCTCTCCCTTCCCAAGCAGTT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

AGCGCATTTTCAGCTTCATCGATGATCAGGGTTTTTCCACCGACATCTACTTCAGTGATGTCGATGACGAGCGTTTCAAGCTCTCCCTTCCCAAGCAGTT
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

AGCGCATTTTCAGCTTCATCGATGATCAGGGTTTTTCCACCGACATCTACTTCAGTGATGTCGATGACGAGCGTTTCAAGCTCTCCCTTCCCAAGCAGTT
 aligned sequence Oly_T3_promoter

CTAAGCGGATCTCTTATGTCTTTACGATTTATAGTTTTTCATTATCAAGTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTCGAAGTTTCAC
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence Oly_T7_promoter

CTAAGCGGATCTCTTATGTCTTTACGATTTATAGTTTTTCATTATCAAGTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTCGAAGTTTCAC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

CTAAGCGGATCTCTTATGTCTTTACGATTTATAGTTTTTCATTATCAAGTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTCGAAGTTTCAC
 aligned sequence Oly_T3_promoter

GAATAAAAGATAATATTCTACTTTTTGCTCCCACCGCGTTTGCTAGCACGAGTGAACACCATCCCTCGCCTGTGAGTTGTACCCATTCCTCTAAACTGTA
 consensus sequence Untitled Consensus


 aligned sequence Oly_T7_promoter

GAATAAAAGATAATATTCTACTTTTTGCTCCCACCGCGTTTGCTAGCACGAGTGAACACCATCCCTCGCCTGTGAGTTGTACCCATTCCTCTAAACTGTA
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

GAATAAAAGATAATATTCTACTTTTTGCTCCCACCGCGTTTGCTAGCACGAGTGAACACCATCCCTCGCCTGTGAGTTGTACCCATTCCTCTAAACTGTA
 aligned sequence Oly_T3_promoter


 GACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTTCGTTATGTACGGCATCCTCCAACAAACAGTCGGTTATAGTTTGCCTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGATATTTCC
 consensus sequence Untitled Consensus


 aligned sequence Oly_T7_promoter

GACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTTCGTTATGTACGGCATCCTCCAACAAACAGTCGGTTATAGTTTGCCTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGATATTTCC
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

GACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTTCGTTATGTACGGCATCCTCCAACAAACAGTCGGTTATAGTTTGCCTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGATATTTCC
 aligned sequence Oly_T3_promoter


 TCATTTTCCTTCGCATGCCAGCATTGAAATGATCGAAGTTCAATGATGAAACGGTAATTCTTCTGTCATTTACTCATCTCATCTCATCAAGTTATATAAT
 consensus sequence Untitled Consensus

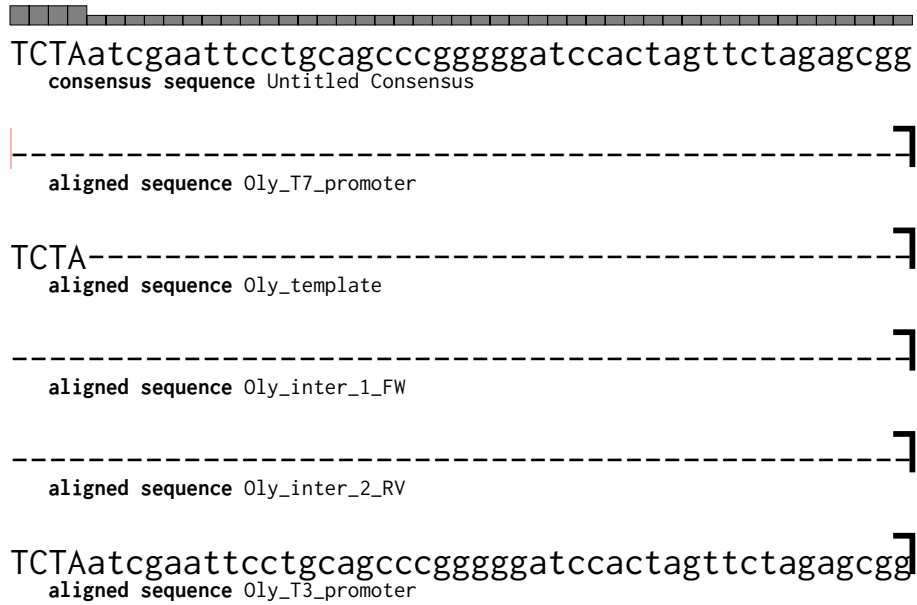
 aligned sequence Oly_T7_promoter

TCATTTTCCTTCGCATGCCAGCATTGAAATGATCGAAGTTCAATGATGAAACGGTAATTCTTCTGTCATTTACTCATCTCATCTCATCAAGTTATATAAT
 aligned sequence Oly_template

 aligned sequence Oly_inter_1_FW

 aligned sequence Oly_inter_2_RV

TCATTTTCCTTCGCATGCCAGCATTGAAATGATCGAAGTTCAATGATGAAACGGTAATTCTTCTGTCATTTACTCATCTCATCTCATCAAGTTATATAAT
 aligned sequence Oly_T3_promoter



Consensus Alignment: DEHR2_T3, pBS-DehR, _DEHR2_T7, Untitled C...

CCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGC
 consensus sequence Untitled Consensus

CCGCGACAAATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGC
 aligned sequence pBS-DehR

-----CATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGC
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

TGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAAAAATTCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCCATC
 consensus sequence Untitled Consensus

TGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAAAAATTCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCCATC
 aligned sequence pBS-DehR

TGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAAAAATTCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATATATAGCTAAATTGGTTCCATC
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

ACCTTCTTTTCTGGTGTGCGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCCTATTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAAATTCTCTT
 consensus sequence Untitled Consensus

ACCTTCTTTTCTGGTGTGCGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCCTATTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAAATTCTCTT
 aligned sequence pBS-DehR

ACCTTCTTTTCTGGTGTGCGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCCTA-TTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAAATTCTCTT
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

GCATTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTTTATTCCCTTCAAGTTTTTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAATATACGGTCAACGAAC
 consensus sequence Untitled Consensus

GCATTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTTTATTCCCTTCAAGG----TTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAATATACGGTCAACGAAC
 aligned sequence pBS-DehR

GCATTTTCTATTTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTTTATTCCCTTCAAGTTTTTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAATATACGGTCAACGAAC
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

TATAATTAACATAACATGTTACAACGTCCGCCTATGCCTGCGATGACGGCTCTTCGCCGATGAAGCTCGCGACCATCAGGCGCCGCGATCCCGGTCCGC
 consensus sequence Untitled Consensus

TATAATTAACATAACATGTTACAACGTCCGCCTATGCCTGCGATGACGGCTCTTCGCCGATGAAGCTCGCGACCATCAGGCGCCGCGATCCCGGTCCGC
 aligned sequence pBS-DehR

TATAATTAACATAACATGTTACAACGTCCGCCTATGCCTGCGATGACGGCTCTTCGCCGATGAAGCTCGCGACCATCAGGCGCCGCGATCCCGGTCCGC
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

CGCATGTCGAAATCGAGATAGAATTCTGTGGCGTCTGCCACTCGGACATCCATACGGCCCGCAGCGAATGGCCGGGCTCCCTCTACCCTTGCGTCCCCGG
 consensus sequence Untitled Consensus

CGCATGTCGAAATCGAGATAGAATTCTGTGGCGTCTGCCACTCGGACATCCATACGGCCCGCAGCGAATGGCCGGGCTCCCTCTACCCTTGCGTCCCCGG
 aligned sequence pBS-DehR

CGCATGTCGAAATCGAGATAGAATTCTGTGGCGTCTGCCACTCGGACATCCATACGGCCCGCAGCGAATGGCCGGGCTCCCTCTACCCTTGCGTCCCCGG
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7

CCACGAAATCGTCGGCCGTGTCGGTGGGCGCGCAAGTCACCCGTTCAAGACGGGTGACCGCGTCGGTGTGGCTGTATCGTCGATAGCTGCCGC
 consensus sequence Untitled Consensus

CCACGAAATCGTCGGCCGTGTCGGTGGGCGCGCAAGTCACCCGTTCAAGACGGGTGACCGCGTCGGTGTGGCTGTATCGTCGATAGCTGCCGC
 aligned sequence pBS-DehR

CCACGAAATCGTCGGCCGTGTCGGTGGGCGCGCAAGTCACCCGTTCAAGACGGGTGACCGCGTCGGTGTGGCTGTATCGTCGATAGCTGCTGC
 aligned sequence DEHR2_T3


 aligned sequence _DEHR2_T7

GAATGCGCAAGCTGCGCCGAAGGGCTGGAGCAATATTGCGAAAACGGCATGACCGGCACCTATAACTCCCCTGACAAGGCGATGGGCGGCGGCGCGCATA
 consensus sequence Untitled Consensus

GAATGCGCAAGCTGCGCCGAAGGGCTGGAGCAATATTGCGAAAACGGCATGACCGGCACCTATAACTCCCCTGACAAGGCGATGGGCGGCGGCGCGCATA
 aligned sequence pBS-DehR

GAATGCGCAAGCTGCGCCGAAGGGCTGGAGCAATATTGCGAAAACGGCATGACCGGCACCTATAACTCCCCTGACAAGGCGATGGGCGGCGGCGCGCATA
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7



CGCTTGGCGGCTATTCCGCCCATGTGGTGGTGGATGACCGCTATGTGCTCAATATTCCCGAAGGGCTCGATCCGGCGGCAGCAGCACCGCTACTCTGCG
 consensus sequence Untitled Consensus




CGCTTGGCGGCTATTCCGCCCATGTGGTGGTGGATGACCGCTATGTGCTCAATATTCCCGAAGGGCTCGATCCGGCGGCAGCAGCACCGCTACTCTGCG
 aligned sequence pBS-DehR



CGCTTGGCGGCTATTCCGCCCATGTGGTGGTGGATGACCGCTATGTGCTCAATATTCCCGAAGGGCTCGATCCGGCGGCAGCAGCACCGCTACTCTGCG
 aligned sequence DEHR2_T3

 aligned sequence _DEHR2_T7



CTGGTATCACCACCTACTCGCCGCTGCGCCACTGGAATGCCGGCCCCGGCAAACGCGTCGGCGTCGTCGGTCTGGGCGGCCTCGGCCATATGGCCGTCAA
 consensus sequence Untitled Consensus



CTGGTATCACCACCTACTCGCCGCTGCGCCACTGGAATGCCGGCCCCGGCAAACGCGTCGGCGTCGTCGGTCTGGGCGGCCTCGGCCATATGGCCGTCAA
 aligned sequence pBS-DehR



CTGGTATCACCACCTACTCGCCGCTGCGCCACTGGAATGCCGGCCCCGGCAAACGCGTCGGCGTCGTCGGTCTGGGCGGCCTCGGCCATATGGCCGTCAA
 aligned sequence DEHR2_T3


-----GCCACTGGAATGCCGGCCCCGGCAAACGCGTCGGCGTCGTCGGTCTGGGCGGCCTCGGCCATATGGCCGTCAA
 aligned sequence _DEHR2_T7




GCTCGCCAATGCCATGGGGTGC GACTGGTCTGTGATGATCACCACCTTCGCCCCGCAAGGCCGGGAGGATGCCAAAAAACTCGGCGCACACGAGGTGATCA
 consensus sequence Untitled Consensus



GCTCGCCAATGCCATGGGGTGC GACTGGTCTGTGATGATCACCACCTTCGCCCCGCAAGGCCGGGAGGATGCCAAAAAACTCGGCGCACACGAGGTGATCA
 aligned sequence pBS-DehR



GCTCGCCAATGCCATGGGGTGC GACTGGTCTGTGATGATCACCACCTTCGCCCCGCAAGGCCGGGAGGATGCCAAAAAACTCGGCGCACACGAGGTGATCA
 aligned sequence DEHR2_T3



GCTCGCCAATGCCATGGGGTGC GACTGGTCTGTGATGATCACCACCTTCGCCCCGCAAGGCCGGGAGGATGCCAAAAAACTCGGCGCACACGAGGTGATCA
 aligned sequence _DEHR2_T7

TCTCCCGCGATGCGGAGCAGATGAAGAAGGCTACCTCGAGCCTCGATCTCATCATCGATGCTGTCGCCGCCGACCACGACATCGACGCCTATCTGGCGCT
 consensus sequence Untitled Consensus

TCTCCCGCGATGCGGAGCAGATGAAGAAGGCTACCTCGAGCCTCGATCTCATCATCGATGCTGTCGCCGCCGACCACGACATCGACGCCTATCTGGCGCT
 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3

TCTCCCGCGATGCGGAGCAGATGAAGAAGGCTACCTCGAGCCTCGATCTCATCATCGATGCTGTCGCCGCCGACCACGACATCGACGCCTATCTGGCGCT
 aligned sequence _DEHR2_T7

GCTGAAACGCGATGGCGCGCTGGTGCAGGTGGGCGCGCCGAAAAGCCACTTTCGGTGATGGCCTTCAGCCTCATCCCCGGCCGCAAGACCTTTGCCGGC
 consensus sequence Untitled Consensus

GCTGAAACGCGATGGCGCGCTGGTGCAGGTGGGCGCGCCGAAAAGCCACTTTCGGTGATGGCCTTCAGCCTCATCCCCGGCCGCAAGACCTTTGCCGGC
 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3


GCTGAAACGCGATGGCGCGCTGGTGCAGGTGGGCGCGCCGAAAAGCCACTTTCGGTGATGGCCTTCAGCCTCATCCCCGGCCGCAAGACCTTTGCCGGC
 aligned sequence _DEHR2_T7

TCGATGATCGGCGGTATTCCCGAGACTCAGGAAATGCTGGATTTCTGCGCCGAAAAGGCATCGCCGGCGAAATCGAGATGATCGATATCGATCAGATCA
 consensus sequence Untitled Consensus

TCGATGATCGGCGGTATTCCCGAGACTCAGGAAATGCTGGATTTCTGCGCCGAAAAGGCATCGCCGGCGAAATCGAGATGATCGATATCGATCAGATCA
 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3

TCGATGATCGGCGGTATTCCCGAGACTCAGGAAATGCTGGATTTCTGCGCCGAAAAGGCATCGCCGGCGAAATCGAGATGATCGATATCGATCAGATCA
 aligned sequence _DEHR2_T7



 ATGACGCTTATGAACGCATGATAAAAAGCGATGTGCGTTATCGTTTCGTCATTGATATGAAGAGCCTGCCGCGCCAGAAGGCCGCCTGAGATTAATATAA

 consensus sequence Untitled Consensus

ATGACGCTTATGAACGCATGATAAAAAGCGATGTGCGTTATCGTTTCGTCATTGATATGAAGAGCCTGCCGCGCCAGAAGGCCGCCTGAGATTAATATAA

 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3

ATGACGCTTATGAACGCATGATAAAAAGCGATGTGCGTTATCGTTTCGTCATTGATATGAAGAGCCTGCCGCGCCAGAAGGCCGCCTGAGATTAATATAA

 aligned sequence _DEHR2_T7



 TTATATAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAAAATAAATTGATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTCATTCTGA

 consensus sequence Untitled Consensus

TTATATAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAAAATAAATTGATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTCATTCTGA

 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3

TTATATAAAAATATTATCTTCTTTTCTTTATATCTAGTGTTATGTAAAATAAATTGATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATTGTTTCTTTTTCATTCTGA

 aligned sequence _DEHR2_T7



 GCCACTTAAATTTTCGTGAATGTTCTTGTAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATACAACAAAAGCAAGGCGCTTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATT

 consensus sequence Untitled Consensus

GCCACTTAAATTTTCGTGAATGTTCTTGTAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATACAACAAAAGCAAGGCGCTTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATT

 aligned sequence pBS-DehR

 aligned sequence DEHR2_T3

GCCACTTAAATTTTCGTGAATGTTCTTGTAAGGGACGGTAGATTTACAAGTGATACAACAAAAGCAAGGCGCTTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATT

 aligned sequence _DEHR2_T7



 TAACAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAATATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGAAAATGTGTACGATCTCTATATGGGTTACTCATAAGTGTACCG

 consensus sequence Untitled Consensus


TAACAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAATATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGAAAATGTGTACGATCTCTATATGGGTTACTCATAAGTGTACCG

 aligned sequence pBS-DehR

aligned sequence DEHR2_T3

TAACAATTGAACACCTCTATATCAACGAAGAATATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGAAAATGTGTACGATCTCTATATGGGTTACTCATAAGTGTACCG

 aligned sequence _DEHR2_T7



 AAGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTTCCTGGAGGCGTCATTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCAACTGTTATATA

 consensus sequence Untitled Consensus

AAGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTTCCTGGAGGCGTCATTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCAACTGTTATATA

 aligned sequence pBS-DehR

aligned sequence DEHR2_T3

AAGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTTCCTGGAGGCGTCATTTTCGCGTT-----

 aligned sequence _DEHR2_T7

Consensus Alignment: KDGK_template, KDGK_T7_promoter, Untitled...

TTTTAGGCTGGTATCTTGATTCTAAATCGATTTTGCAAGACTAGAGGAATATGTATTAATTCCTGAATGCAAGTAAATATTAAGTAAAAGAAAGCA
 consensus sequence Untitled Consensus

TTTTAGGCTGGTATCTTGATTCTAAATCGATTTTGCAAGACTAGAGGAATATGTATTAATTCCTGAATGCAAGTAAATATTAAGTAAAAGAAAGCA
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter

 aligned sequence KDGK_T3_promoter

TTGATTATGAAGAAAGGACCTTTTTAAGATATGAGAACAATGAGAAAAGGAAAAATGGGACGAAACAAATAGGGAAAATTCGTCTGTAAAACCAATTGT
 consensus sequence Untitled Consensus

TTGATTATGAAGAAAGGACCTTTTTAAGATATGAGAACAATGAGAAAAGGAAAAATGGGACGAAACAAATAGGGAAAATTCGTCTGTAAAACCAATTGT
 aligned sequence KDGK_template

-----ATATGAGAACAATGAGAAAAGGAAAAATGGGACGAAACAAATAGGGAAAATTCGTCTGTAAAACCAATTGT
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

 aligned sequence KDGK_T3_promoter

AGTAACAAAAACGCTCATTTC AATAGCAAAAAATAGAATACCGTCAATGGATATATATAGACACGGGACATTATAACAACGTGCAGATGGTGATGATT
 consensus sequence Untitled Consensus

AGTAACAAAAACGCTCATTTC AATAGCAAAAAATAGAATACCGTCAATGGATATATATAGACACGGGACATTATAACAACGTGCAGATGGTGATGATT
 aligned sequence KDGK_template

AGTAACAAAAACGCTCATTTC AATAGCAAAAAATAGAATACCGTCAATGGATATATATAGACACGGGACATTATAACAACGTGCAGATGGTGATGATT
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

 aligned sequence KDGK_T3_promoter

GCAAACCCAAAAAATTACCAGCTTCCTGTAATTCCAGGTTGAGCGCGTGGCTTCCTATAATCCAATACACCCACACCCACCCAGATCGTGATTTTTGTTA
 consensus sequence Untitled Consensus

GCAAACCCAAAAAATTACCAGCTTCCTGTAATTCCAGGTTGAGCGCGTGGCTTCCTATAATCCAATACACCCACACCCACCCAGATCGTGATTTTTGTTA
 aligned sequence KDGK_template

GCAAACCCAAAAAATTACCAGCTTCCTGTAATTCCAGGTTGAGCGCGTGGCTTCCTATAATCCAATACACCCACACCCACCCAGATCGTGATTTTTGTTA
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

 aligned sequence KDGK_T3_promoter

TTACGCTGGCATCGCCTCACGCGGGATAATCGCGCCGCGATACTGAATAACGGTACTTGCGGTCAGGTGCCACGTTTCGCCGCGTCTTCCGCGCTGCCG
 consensus sequence Untitled Consensus

TTACGCTGGCATCGCCTCACGCGGGATAATCGCGCCGCGATACTGAATAACGGTACTTGCGGTCAGGTGCCACGTTTCGCCGCGTCTTCCGCGCTGCCG
 aligned sequence KDGK_template

TTACGCTGGCATCGCCTCACGCGGGATAATCGCGCCGCGATACTGAATAACGGTACTTGCGGTCAGGTGCCACGTTTCGCCGCGTCTTCCGCGCTGCCG
 aligned sequence KDGK_T7_promoter


 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 CCTGTCAGACGTACCGCCAGATAACCGGCACTGAAAGAGTCGCCAGCTGCGGTGGTATCGATCACTTTTTCTTTCGGCAGTTTCACCGCCGGAACATCCA
 consensus sequence Untitled Consensus

CCTGTCAGACGTACCGCCAGATAACCGGCACTGAAAGAGTCGCCAGCTGCGGTGGTATCGATCACTTTTTCTTTCGGCAGTTTCACCGCCGGAACATCCA
 aligned sequence KDGK_template

CCTGTCAGACGTACCGCCAGATAACCGGCACTGAAAGAGTCGCCAGCTGCGGTGGTATCGATCACTTTTTCTTTCGGCAGTTTCACCGCCGGAACATCCA
 aligned sequence KDGK_T7_promoter


 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 CTAACCCTTCGCCAGCAATGGACACCAGGCAAGAATCCGCCCCGCGTTTACCACCACTTCTTTCACGCCCGCGTTATGGGTGCGCGCAATGACGTCTTC
 consensus sequence Untitled Consensus

CTAACCCTTCGCCAGCAATGGACACCAGGCAAGAATCCGCCCCGCGTTTACCACCACTTCTTTCACGCCCGCGTTATGGGTGCGCGCAATGACGTCTTC
 aligned sequence KDGK_template

CTAACCCTTCGCCAGCAATGGACACCAGGCAAGAATCCGCCCCGCGTTTACCACCACTTCTTTCACGCCCGCGTTATGGGTGCGCGCAATGACGTCTTC
 aligned sequence KDGK_T7_promoter


-----GCGTTTACCACCACTTCTTTCACGCCCGCGTTATGGGTGCGCGCAATGACGTCTTC
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 CACCGGCTGTTGACCCACAGCGCGTCTTCGTCGTCCAGCGTCAGGAAGGCGATATCCGTGCATTCCAGCATTTGTTGGTACACCTGCTGTGTCTCTTCT
 consensus sequence Untitled Consensus

CACCGGCTGTTGACCCACAGCGCGTCTTCGTCGTCCAGCGTCAGGAAGGCGATATCCGTGCATTCCAGCATTTGTTGGTACACCTGCTGTGTCTCTTCT
 aligned sequence KDGK_template

CACCGGCTGTTGACCCACAGCGCGTCTTCGTCGTCCAGCGTCAGGAAGGCGATATCCGTGCATTCCAGCATTTGTTGGTACACCTGCTGTGTCTCTTCT
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

CACCGGCTGTTGACCCACAGCGCGTCTTCGTCGTCCAGCGTCAGGAAGGCGATATCCGTGCATTCCAGCATTTGTTGGTACACCTGCTGTGTCTCTTCT
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 TTGCTGGCCCACAGGCGCGGACGATAGTTATTGTGCGAAAATCACTTTTCCGCCGTTGGCGCGGCATTTCGCGCAGCAGGGAAAGCAGCTTTTCGCGGCTGG
 consensus sequence Untitled Consensus

TTGCTGGCCCACAGGCGCGGACGATAGTTATTGTGCGAAAATCACTTTTCCGCCGTTGGCGCGGCATTTCGCGCAGCAGGGAAAGCAGCTTTTCGCGGCTGG
 aligned sequence KDGK_template

TTGCTGGCCCACAGGCGCGGACGATAGTTATTGTGCGAAAATCACTTTTCCGCCGTTGGCGCGGCATTTCGCGCAGCAGGGAAAGCAGCTTTTCGCGGCTGG
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

TTGCTGGCCCACAGGCGCGGACGATAGTTATTGTGCGAAAATCACTTTTCCGCCGTTGGCGCGGCATTTCGCGCAGCAGGGAAAGCAGCTTTTCGCGGCTGG
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 TCGGGCTTAAGATCGCCAGGCTAATCCCGCTCAGGTAGAGATAATCGAAATTCGCCAGCTCTTCGCAAATCGCCGCAGACTGCTCACTCTCCAGCCAGAA
 consensus sequence Untitled Consensus

TCGGGCTTAAGATCGCCAGGCTAATCCCGCTCAGGTAGAGATAATCGAAATTCGCCAGCTCTTCGCAAATCGCCGCAGACTGCTCACTCTCCAGCCAGAA
 aligned sequence KDGK_template

TCGGGCTTAAGATCGCCAGGCTAATCCCGCTCAGGTAGAGATAATCGAAATTCGCCAGCTCTTCGCAAATCGCCGCAGACTGCTCACTCTCCAGCCAGAA
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

TCGGGCTTAAGATCGCCAGGCTAATCCCGCTCAGGTAGAGATAATCGAAATTCGCCAGCTCTTCGCAAATCGCCGCAGACTGCTCACTCTCCAGCCAGAA
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 TTTGGCGGCGGCTTCGTTCCGCCAGTAGTAGAACGTACGCTCGCCCGGTGCTGTTCGGTTTCAATGTAGTAAAGGCCCGGCAGACGGTTTTCCATCCGTTG
 consensus sequence Untitled Consensus

TTTGGCGGCGGCTTCGTTCCGCCAGTAGTAGAACGTACGCTCG-CCGGTGCTGTTCGGTTTCAATGTAGTAAAGGCCCGGCAGACGGTTTTCCATCCGTTG
 aligned sequence KDGK_template

TTTGGCGGCGGCTTCGTTCCGCCAGTAGTAGAACGTACGCTCGCCCGGTGCTGTTCGGTT-----
 aligned sequence KDGK_T7_promoter

TTTGGCGGCGGCTTCGTTCCGCCAGTAGTAGAACGTACGCTCG-CCGGTGCTGTTCGGTTTCAATGTAGTAAAGGCCCGGCAGACGGTTTTCCATCCGTTG
 aligned sequence KDGK_T3_promoter

GGTCAGGGAAGTATCAACGTTCTCGCCGTGCCAGGCGTCCAGCATCTGCTGGCTAAAAGTGTCCGTTCCCAGCGCCGTTACGTAATGAACGGTTAATGCC
 consensus sequence Untitled Consensus

GGTCAGGGAAGTATCAACGTTCTCGCCGTGCCAGGCGTCCAGCATCTGCTGGCTAAAAGTGTCCGTTCCCAGCGCCGTTACGTAATGAACGGTTAATGCC
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter

GGTCAGGGAAGTATCAACGTTCTCGCCGTGCCAGGCGTCCAGCATCTGCTGGCTAAAAGTGTCCGTTCCCAGCGCCGTTACGTAATGAACGGTTAATGCC
 aligned sequence KDGK_T3_promoter

GCAGGATCGACCTGACGGGCGATATAGACGGAAGTGTTTCAGGGTATCGCCGCCGAAACCGCGCTTAACGTCCGCGCCTTTCTCGGAAAGCTCAATCATGC
 consensus sequence Untitled Consensus

GCAGGATCGACCTGACGGGCGATATAGACGGAAGTGTTTCAGGGTATCGCCGCCGAAACCGCGCTTAACGTCCGCGCCTTTCTCGGAAAGCTCAATCATGC
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter

GCAGGATCGACCTGACGGGCGATATAGACGGAAGTGTTTCAGGGTATCGCCGCCGAAACCGCGCTTAACGTCCGCGCCTTTCTCGGAAAGCTCAATCATGC
 aligned sequence KDGK_T3_promoter

ATTCGCCAATCACGGCAATCTTTTTGGACATTTTTTGATTAAAATTAATAAACTTTTTGTTTTGTGTTTATTCTTTGTTCTTAGAAAAGACAAGTTGA
 consensus sequence Untitled Consensus

ATTCGCCAATCACGGCAATCTTTTTGGACATTTTTTGATTAAAATTAATAAACTTTTTGTTTTGTGTTTATTCTTTGTTCTTAGAAAAGACAAGTTGA
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter


ATTCGCCAATCACGGCAATCTTTTTGGACATTTTTTGATTAAAATTAATAAACTTTTTGTTTTGTGTTTATTCTTTGTTCTTAGAAAAGACAAGTTGA
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 GCTTGTTTGTTCCTTGATGTTTTATTATTTTACAATAGCTGCAAATGAAGAATAGATTCGAACATTGTGAAGTATTGGCATATATCGTCTCTATTTATACT
 consensus sequence Untitled Consensus

GCTTGTTTGTTCCTTGATGTTTTATTATTTTACAATAGCTGCAAATGAAGAATAGATTCGAACATTGTGAAGTATTGGCATATATCGTCTCTATTTATAC-
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter


GCTTGTTTGTTCCTTGATGTTTTATTATTTTACAATAGCTGCAAATGAAGAATAGATTCGAACATTGTGAAGTATTGGCATATATCGTCTCTATTTATACT
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 TTTTTTTTTTTCAGTTCTAGTATATTTTGTATTTTCTCCTTTTCATTCTTTCAGTTGCCAATAAGTTACAGGGGATCTCGAAAGATGGTGGGGATTTTT
 consensus sequence Untitled Consensus

TTTTTTTTTTTTCAGTTCTAGTATATTTTGTATTTTCTCCTTTTCATTCTTTCAGTTGCCAATAAGTTACAGGGGATCTCGAAAGATGGTGGGGATTTTT
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter

TTTTTTTTTTTTCAGTTCTAGTATATTTTGTATTTTCTCCTTTTCATTCTTTCAGTTGCCAATAAGTTACAGGGGATCTCGAAAGATGGTGGGGATTTTT
 aligned sequence KDGK_T3_promoter


 CCTTGAAAGACGACTTTTTGCCATCTAATTTTCTTGTTCCTCTGAAAATTATCCAGCAGAAGCAAATGTAAAAGATGAACCTCAGAAGAACACGCAG
 consensus sequence Untitled Consensus

CCTTGAAAGACGACTTTTTGCCATCTAATTTTCTTGTTCCTCTGAAAATTATCCAGCAGAAGCAAATGTAAAAGATGAACCTCAGAAGAACACGCAG
 aligned sequence KDGK_template

 aligned sequence KDGK_T7_promoter

CCTTGAAAGACGACT-----
 aligned sequence KDGK_T3_promoter



GGGCCCGAAATTGTTCTACGAGAAGT
consensus sequence Untitled Consensus

GGGCCCGAAATTGTTCTACGAGAAGT
aligned sequence KDGK_template

aligned sequence KDGK_T7_promoter

aligned sequence KDGK_T3_promoter

Consensus Alignment: pSV-KDGPA, KDGPA1_T7, KDGPA1_T3, Untitled...



 GTAAGCTACTATGAAAGACTTTACAAAGAACTCGAAGAGTTCCAGAATGAAATAAAAATTAAAACAGTTGTGAATAACAGAAGACAATCGCGAACTCCAA

 consensus sequence Untitled Consensus

GTAAAGCTACTATGAAAGACTTTACAAAGAACTCGAAGAGTTCCAGAATGAAATAAAAATTAAAACAGTTGTGAATAACAGAAGACAATCGCGAACTCCAA

 aligned sequence pSV-KDGPA

F-----TTTACAAAGAACTCGAAGAGTTCCAGAATGAAATAAAAATTAAAACAGTTGTGAATAACAGAAGACAATCGCGAACTCCAA

 aligned sequence KDGPA1_T7

F-----

 aligned sequence KDGPA1_T3



 AATGAGCTATCAAAAACGATAGATCGATTAGGATGACTTTGAAATGACTCCGCAGTGGACTGGCCGTTAATTTCAAGCGTGAGTAAAATAGTGCATGACA

 consensus sequence Untitled Consensus

AATGAGCTATCAAAAACGATAGATCGATTAGGATGACTTTGAAATGACTCCGCAGTGGACTGGCCGTTAATTTCAAGCGTGAGTAAAATAGTGCATGACA

 aligned sequence pSV-KDGPA

AATGAGCTATCAAAAACGATAGATCGATTAGGATGACTTTGAAATGACTCCGCAGTGGACTGGCCGTTAATTTCAAGCGTGAGTAAAATAGTGCATGACA

 aligned sequence KDGPA1_T7

 aligned sequence KDGPA1_T3

AAAGATGAGCTAGGCTTTTGTAAAAATATCTTACGTTGTAAAATTTTAGAAATCATTATTTCTTCATATCATTTTGTTCATTGACCTTCAGAAGAAAAGA
 consensus sequence Untitled Consensus

AAAGATGAGCTAGGCTTTTGTAAAAATATCTTACGTTGTAAAATTTTAGAAATCATTATTTCTTCATATCATTTTGTTCATTGACCTTCAGAAGAAAAGA
 aligned sequence pSV-KDGPA

AAAGATGAGCTAGGCTTTTGTAAAAATATCTTACGTTGTAAAATTTTAGAAATCATTATTTCTTCATATCATTTTGTTCATTGACCTTCAGAAGAAAAGA
 aligned sequence KDGPA1_T7

 aligned sequence KDGPA1_T3

GCCGACCAATAATATAAATAAATAAATAAATAAATAATATTCCATTATTTCTAACAGATTCAATACTCATTAAAAACTATATCAATTAATTTGAATTAAC
 consensus sequence Untitled Consensus

GCCGACCAATAATATAAATAAATAAATAAATAAATAATATTCCATTATTTCTAACAGATTCAATACTCATTAAAAACTATATCAATTAATTTGAATTAAC
 aligned sequence pSV-KDGPA

GCCGACCAATAATATAAATAAATAAATAAATAAATAATATTCCATTATTTCTAACAGATTCAATACTCATTAAAAACTATATCAATTAATTTGAATTAAC
 aligned sequence KDGPA1_T7

 aligned sequence KDGPA1_T3

TTACTTGGAAAACAGCCTGCAAATCCTCTTTTGAACAGCTGCCAACTGGCTGCCGACTCCGACGGCACCAGCTCCGGCTCTAAGCCAATCAGGCACT
 consensus sequence Untitled Consensus

TTACTTGGAAAACAGCCTGCAAATCCTCTTTTGAACAGCTGCCAACTGGCTGCCGACTCCGACGGCACCAGCTCCGGCTCTAAGCCAATCAGGCACT
 aligned sequence pSV-KDGPA

TTACTTGGAAAACAGCCTGCAAATCCTCTTTTGAACAGCTGCCAACTGGCTGCCGACTCCGACGGCACCAGCTCCGGCTCTAAGCCAATCAGGCACT
 aligned sequence KDGPA1_T7

 aligned sequence KDGPA1_T3

TCAGACGGATGTATCCCGCCTGTCGGAATAAAGGTCACCTGCGGGAAAGGACCCGCTAAATTTTTTCATAAACGGAATGCCAAACACACCGCTTGGGAACA
consensus sequence Untitled Consensus

TCAGACGGATGTATCCCGCCTGTCGGAATAAAGGTCACCTGCGGGAAAGGACCCGCTAAATTTTTTCATAAACGGAATGCCAAACACACCGCTTGGGAACA
aligned sequence pSV-KDGPA

TCAGACGGATGTATCCCGCCTGTCGGAATAAAGGTCACCTGCGGGAAAGGACCCGCTAAATTTTTTCATAAACGGAATGCCAAACACACCGCTTGGGAACA
aligned sequence KDGPA1_T7

aligned sequence KDGPA1_T3

GCTTTAATGTCGTAAAACCGAATGTCAGCGCTTCATAATTTGCTCGGAGTCAAGACGCCGGGGATATAATGTGTCTTTACAAAAGATAGATGTTTCAGC
consensus sequence Untitled Consensus

GCTTTAATGTCGTAAAACCGAATGTCAGCGCTTCATAATTTGCTCGGAGTCAAGACGCCGGGGATATAATGTGTCTTTACAAAAGATAGATGTTTCAGC
aligned sequence pSV-KDGPA

GCTTTAATGTCGTAAAACCGAATGTCAGCGCTTCATAATTTGCTCGGAGTCAAGACGCCGGGGATATAATGTGTCTTTACAAAAGATAGATGTTTCAGC
aligned sequence KDGPA1_T7

aligned sequence KDGPA1_T3

AAGATCAGCTGAAAAACCCGACTGACAATAAACTGCGCGCCAGCCTTAGCAGCTTCCCAGCTTGCTGCGCGCTGATGACCGTACCCGCGCCAATTA
consensus sequence Untitled Consensus

AAGATCAGCTGAAAAACCCGACTGACAATAAACTGCGCGCCAGCCTTAGCAGCTTCCCAGCTTGCTGCGCGCTGATGACCGTACCCGCGCCAATTA
aligned sequence pSV-KDGPA

AAGATCAGCTGAAAAACCCGACTGACAATAAACTGCGCGCCAGCCTTAGCAGCTTCCCAGCTTGCTGCGCGCTGATGACCGTACCCGCGCCAATTA
aligned sequence KDGPA1_T7

aligned sequence KDGPA1_T3




ATATCTTCCCTATTACGGAAGGATTGATAATATCTGATGCCCCGGGGTCTGATACGTCACTTCAACTGCACGAATCCCTTTATCTAATAAACTCTCAA
 consensus sequence Untitled Consensus

ATATCTTCCCTATTACGGAAGGATTGATAATATCTGATGCCCCGGGGTCTGATACGTCACTTCAACTGCACGAATCCCTTTATCTAATAAACTCTCAA
 aligned sequence pSV-KDGPA

ATATCTTCCCTATTACGGAAGGATTGATAATATCTGATGCCCCGGGGTCTGATACGTCACTTCAACTGCACGAATCCCTTTATCTAATAAACTCTCAA
 aligned sequence KDGPA1_T7

-----ATCCCTTTATCTAATAAACTCTCAA
 aligned sequence KDGPA1_T3



TCTGCTGACAGGCCTCCTGCTTATCCTTTGAACGAATGACTGCAATCAGCTTTGCTTCTTTCAGACGGTTTTCAACGACTTTGGACTCCATTTTGAATAT
 consensus sequence Untitled Consensus

TCTGCTGACAGGCCTCCTGCTTATCCTTTGAACGAATGACTGCAATCAGCTTTGCTTCTTTCAGACGGTTTTCAACGACTTTGGACTCCATTTTGAATAT
 aligned sequence pSV-KDGPA

TCTGCTGACAGGCCTCCTGCTTATCCTTTGAACGAATGACTGCAATCAGCTTTGCTTCTTTCAGACGGTTTTCAACGACTTTGGACTCCATTTTGAATAT
 aligned sequence KDGPA1_T7

TCTGCTGACAGGCCTCCTGCTTATCCTTTGAACGAATGACTGCAATCAGCTTTGCTTCTTTCAGACGGTTTTCAACGACTTTGGACTCCATTTTGAATAT
 aligned sequence KDGPA1_T3



GTATTACTTGGGTTATGGTTATATATGACAAAAGAAAAAGAAGAACAGAAGAATAACGCAAGGAAGAACAATAACTGAAATTGATAGAGAAGTATTATGT
 consensus sequence Untitled Consensus

GTATTACTTGGGTTATGGTTATATATGACAAAAGAAAAAGAAGAACAGAAGAATAACGCAAGGAAGAACAATAACTGAAATTGATAGAGAAGTATTATGT
 aligned sequence pSV-KDGPA

GTATTACTTGGGTTATGGTTATATATGACAAAAGAAAAAGAAGAACAGAAGAATAACGCC-----
 aligned sequence KDGPA1_T7

GTATTACTTGGGTTATGGTTATATATGACAAAAGAAAAAGAAGAACAGAAGAATAACGCAAGGAAGAACAATAACTGAAATTGATAGAGAAGTATTATGT
 aligned sequence KDGPA1_T3

CTTTGTCTTTTTATAATAAATCAAGTGCAGAAATCCGTTAGACAACATGAGGGATAAAATTTAACGTGGGCGAAGAAGAAGGAAAAAAGTTTTTTGTGAGG
 consensus sequence Untitled Consensus

CTTTGTCTTTTTATAATAAATCAAGTGCAGAAATCCGTTAGACAACATGAGGGATAAAATTTAACGTGGGCGAAGAAGAAGGAAAAAAGTTTTTTGTGAGG
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

CTTTGTCTTTTTATAATAAATCAAGTGCAGAAATCCGTTAGACAACATGAGGGATAAAATTTAACGTGGGCGAAGAAGAAGGAAAAAAGTTTTTTGTGAGG
 aligned sequence KDGPA1_T3

GCGTAATTGAAGCGATCTGTTGATTGTAGATTTTTTTTTTTTTGAGGAGTCAAAGTCAGAAGAGAACAGACAAATGGTATTAACCATCCAATACTTTTTTG
 consensus sequence Untitled Consensus

GCGTAATTGAAGCGATCTGTTGATTGTAGATTTTTTTTTTTTTGAGGAGTCAAAGTCAGAAGAGAACAGACAAATGGTATTAACCATCCAATACTTTTTTG
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

GCGTAATTGAAGCGATCTGTTGATTGTAGATTTT-----TTTTTTTTTTTTGAGGAGTCAAAGTCAGAAGAGAACAGACAAATGGTATTAACCATCCAATACTTTTTTG
 aligned sequence KDGPA1_T3

GAGCAACGCTAAGCTCATGCTTTTTCCATTGGTTACGTGCTCAGTTGTTAGATATGGAAAGAGAGGATGCTCACGGCAGCGTGACTCCAATTGAGCCCGAA
 consensus sequence Untitled Consensus

GAGCAACGCTAAGCTCATGCTTTTTCCATTGGTTACGTGCTCAGTTGTTAGATATGGAAAGAGAGGATGCTCACGGCAGCGTGACTCCAATTGAGCCCGAA
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

GAGCAACGCTAAGCTCATGCTTTTTCCATTGGTTACGTGCTCAGTTGTTAGATATGGAAAGAGAGGATGCTCACGGCAGCGTGACTCCAATTGAGCCCGAA
 aligned sequence KDGPA1_T3

AGAGAGGATGCCACGTTTTCCCGACGGCTGCTAGAATGGAAAAAGGAAAAATAGAAGAATCCCATTCTATCATTATTTACGTAATGACCCACACATTTT
 consensus sequence Untitled Consensus

AGAGAGGATGCCACGTTTTCCCGACGGCTGCTAGAATGGAAAAAGGAAAAATAGAAGAATCCCATTCTATCATTATTTACGTAATGACCCACACATTTT
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

AGAGAGGATGCCACGTTTTCCCGACGGCTGCTAGAATGGAAAAAGGAAAAATAGAAGAATCCCATTCTATCATTATTTACGTAATGACCCACACATTTT
 aligned sequence KDGPA1_T3

TGAGATTTTCAACTATTACGTATTACGATAATCCTGCTGTCATTATCATTATTATCTATATCGACGTATGCAACGTATGTGAAGCCAAGTAGGCAATTAT
 consensus sequence Untitled Consensus

TGAGATTTTCAACTATTACGTATTACGATAATCCTGCTGTCATTATCATTATTATCTATATCGACGTATGCAACGTATGTGAAGCCAAGTAGGCAATTAT
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

TGAGATTTTCAACTATTACGTATTACGATAATCCTGCTGTCATTATCATTATTATCTATATCGACGTATGCAACGTATGTGAAGCCAAGTAGGCAATTAT
 aligned sequence KDGPA1_T3

TTAGTACTGTCAGTATTGTTATTCATTTCTTAGGGCTTGCGTCAGCTTGATGAGGATTTGTGATAGTAGCCGTTGGAGGCATGAAGGGCATTGGAAACAT
 consensus sequence Untitled Consensus

TTAGTACTGTCAGTATTGTTATTCATTTCTTAGGGCTTGCGTCAGCTTGATGAGGATTTGTGATAGTAGCCGTTGGAGGCATGAAGGGCATTGGAAACAT
 aligned sequence pSV-KDGPA

 aligned sequence KDGPA1_T7

TTAGTACTGTCAGTATTGTTATTCATTTCTTAGGGCTTGCGTCAGCTTGATGAGGATTTGTGATAGTAGCCGTTGGAGGCATGAAGGGCATTGGAAACAT
 aligned sequence KDGPA1_T3

GGGGAAAGGAGGTATACCGAAAGGTAACGGTACTGGTGGCACTGGCGTACCGCCGTTATTTACAGAAGTTGGAAGGCTGGTATTGTTGTTCAAGCCAGCG
consensus sequence Untitled Consensus

GGGGAAAGGAGGTATACCGAAAGGTAACGGTACTGGTGGCACTGGCGTACCGCCGTTATTTACAGAAGTTGGAAGGCTGGTATTGTTGTTCAAGCCAGCG
aligned sequence pSV-KDGPA

aligned sequence KDGPA1_T7

GGGGAAAGGAGGTATACCGAAAGGTAACGGTACTGGTGGCACTGGCGTACCGCCGTTATTTACAGAAGTTGGAAGGCTGGTATTGTTGTTCAAGCCAGC-
aligned sequence KDGPA1_T3


GTGCCAGTTGGA
consensus sequence Untitled Consensus

GTGCCAGTTGGA
aligned sequence pSV-KDGPA

aligned sequence KDGPA1_T7

aligned sequence KDGPA1_T3

Consensus Alignment: quTD_T7_promoter(OK), quTD_Template, quTD...




g t a t c g a t a a g c t t g a t C A T G C G A C T G G G T G A G C A T A T G T T C C G C T G A T G T G A T G T G C A A G A T A A C A A G C A A G G C A G A A A C T A A C T T C T T C T T C A T G T A
 consensus sequence Untitled Consensus

g t a t c g a t a a g c t t g a t C A T G C G A C T G G G T G A G C A T A T G T T C C G C T G A T G T G A T G T G C A A G A T A A C A A G C A A G G C A G A A A C T A A C T T C T T C T T C A T G T A
 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

F ----- C A T G C G A C T G G G T G A G C A T A T G T T C C G C T G A T G T G A T G T G C A A G A T A A C A A G C A A G G C A G A A A C T A A C T T C T T C T T C A T G T A
 aligned sequence quTD_Template

F -----
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



A T A A A C A C A C C C C G C G T T T A T T T A C C T A T C T C T A A A C T T C A A C A C C T T A T A T C A T A A C T A A T A T T T C T T G A G A T A A G C A C A C T G C A C C C A T A C T T C C T T
 consensus sequence Untitled Consensus

A T A A A C A C A C C C C G C G T T T A T T T A C C T A T C T C T A A A C T T C A A C A C C T T A T A T C A T A A C T A A T A T T T C T T G A G A T A A G C A C A C T G C A C C C A T A C T T C C T T
 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

A T A A A C A C A C C C C G C G T T T A T T T A C C T A T C T C T A A A C T T C A A C A C C T T A T A T C A T A A C T A A T A T T T C T T G A G A T A A G C A C A C T G C A C C C A T A C T T C C T T
 aligned sequence quTD_Template

 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



AAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCTTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAATGCATAA
consensus sequence Untitled Consensus

AAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCTTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAATGCATAA
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

AAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCTTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCATATTTTTGTTGCCTGGTGGCATTGCAAAATGCATAA
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTGTGTT
consensus sequence Untitled Consensus

CCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTGTGTT
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCGTGTGATGAGGCTCGTGGAAAAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTGTGTT
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



GTTACGGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTTGAGTACTTTTCTTCATAATTG
consensus sequence Untitled Consensus

GTTACGGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTTGAGTACTTTTCTTCATAATTG
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GTTACGGTATTTTACTATGGAATAATCAATCAATTGAGGATTTTATGCAAATATCGTTTGAATATTTTTCCGACCCTTTGAGTACTTTTCTTCATAATTG
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CATAATATTGTCGCGTGCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCTC
consensus sequence Untitled Consensus

CATAATATTGTCGCGTGCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCTC
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CATAATATTGTCGCGTGCCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGTTCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTTAGCTC
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



ATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCACTCTC
consensus sequence Untitled Consensus

ATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCACTCTC
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

ATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAACATAGGAAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCACTCTC
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCCTTTATTTTCATATTTCTTGTCATATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACA
consensus sequence Untitled Consensus

CTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCCTTTATTTTCATATTTCTTGTCATATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACA
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCCTTTATTTTCATATTTCTTGTCATATTCCTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACA
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CAGTCAAATCAATCAAATGTCCATCCTCGCCTTGGTCGAAGACCGCCCAACTCCCCGCGAGGTTTACAACCTGGCGCGTCTACCTCCTGGCCGCAGTCGC
consensus sequence Untitled Consensus

CAGTCAAATCAATCAAATGTCCATCCTCGCCTTGGTCGAAGACCGCCCAACTCCCCGCGAGGTTTACAACCTGGCGCGTCTACCTCCTGGCCGCAGTCGC
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CAGTCAAATCAATCAAATGTCCATCCTCGCCTTGGTCGAAGACCGCCCAACTCCCCGCGAGGTTTACAACCTGGCGCGTCTACCTCCTGGCCGCAGTCGC
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CTCCTTCACATCATGCATGATCGGCTACGACAGCGCCTTCATCGGCACAACGCTGTCTCTGCAATCCTTTCAAATGAATTTAATTGGGAATCGCTCAAT
consensus sequence Untitled Consensus

CTCCTTCACATCATGCATGATCGGCTACGACAGCGCCTTCATCGGCACAACGCTGTCTCTGCAATCCTTTCAAATGAATTTAATTGGGAATCGCTCAAT
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CTCCTTCACATCATGCATGATCGGCTACGACAGCGCCTTCATCGGCACAACGCTGTCTCTGCAATCCTTTCAAATGAATTTAATTGGGAATCGCTCAAT
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



ACGGATCTCATCAGCGCGAATATCGTCTCGCTATATCAAGCAGGTGCCTTCTTCGGCGCTCTTTTCGCGTACCCCATCGGCCACTTCTGGGGCCGCCGT
consensus sequence Untitled Consensus

ACGGATCTCATCAGCGCGAATATCGTCTCGCTATATCAAGCAGGTGCCTTCTTCGGCGCTCTTTTCGCGTACCCCATCGGCCACTTCTGGGGCCGCCGT
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

ACGGATCTCATCAGCGCGAATATCGTCTCGCTATATCAAGCAGGTGCCTTCTTCGGCGCTCTTTTCGCGTACCCCATCGGCCACTTCTGGGGCCGCCGT
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



GGGGTCTTATGTTCTCTGCTCTTATTTTCTTCCTTGGTGCCGGCATGATGCTCGGTGCGAATGGGGATCGAGGGCTAGGGCTGATCTATGGTGGCCGAGT
consensus sequence Untitled Consensus

GGGGTCTTATGTTCTCTGCTCTTATTTTCTTCCTTGGTGCCGGCATGATGCTCGGTGCGAATGGGGATCGAGGGCTAGGGCTGATCTATGGTGGCCGAGT
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GGGGTCTTATGTTCTCTGCTCTTATTTTCTTCCTTGGTGCCGGCATGATGCTCGGTGCGAATGGGGATCGAGGGCTAGGGCTGATCTATGGTGGCCGAGT
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



GCTTGCGGGCATTGGCGTCGGCGCCGGGTCGAACATCTGTCTTCTACATCTCAGAAATGGCACCTCCCGCTATTCGGGGTCGCCTTGTTGGGGTTTAT
consensus sequence Untitled Consensus

GCTTGCGGGCATTGGCGTCGGCGCCGGGTCGAACATCTGTCTTCTACATCTCAGAAATGGCACCTCCCGCTATTCGGGGTCGCCTTGTTGGGGTTTAT
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GCTTGCGGGCATTGGCGTCGGCGCCGGGTCGAACATCTGTCTTCTACATCTCAGAAATGGCACCTCCCGCTATTCGGGGTCGCCTTGTTGGGGTTTAT
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



GAGCTGGGTTGGCAGATTGGTGGCGTCGTTGGGTTCTGGATCAATGTA CTTCCCCTTATTTTCTCTGGTTTTCCAGGTTTGCTAACAGAATAGTACGGC
consensus sequence Untitled Consensus

GAGC-----
aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GAGCTGGGTTGGCAGATTGGTGGCGTCGTTGGGTTCTGGATCAATGTA CTTCCCCTTATTTTCTCTGGTTTTCCAGGTTTGCTAACAGAATAGTACGGC
aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



 GTGGACGAAACCCTTGCCCAAGCCACAAACAATGGATCATCCCCTTTGCCGTGCAATTGATTCCTGCTGGCCTGCTCATTATCGGCGCCCTCTTGATCC

 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GTGGACGAAACCCTTGCCCAAGCCACAAACAATGGATCATCCCCTTTGCCGTGCAATTGATTCCTGCTGGCCTGCTCATTATCGGCGCCCTCTTGATCC

 aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



 GCGAATCTCCTCGTTGGCTCTTCCTCCGCGGTAACCGTGAAAAGGGCATTGAGACCCTGGCCTGGATCCGCAACCTGCCAGCCGACCATATCTATATGGT

 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GCGAATCTCCTCGTTGGCTCTTCCTCCGCGGTAACCGTGAAAAGGGCATTGAGACCCTGGCCTGGATCCGCAACCTGCCAGCCGACCATATCTATATGGT

 aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



 CGAGGAAATCAACATGATCGAGCAGTCGCTCGAACAACAGCGTGTCAAATTGGGCTTGGTTTCTGGAAACCCTTTAAAGCAGCCTGGACGAACAAGCGT

 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CGAGGAAATCAACATGATCGAGCAGTCGCTCGAACAACAGCGTGTCAAATTGGGCTTGGTTTCTGGAAACCCTTTAAAGCAGCCTGGACGAACAAGCGT

 aligned sequence quTD_Template

aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)

-----TGATCGAGCAGTCGCTCGAACAACAGCGTGTCAAATTGGGCTTGGTTTCTGGAAACCCTTTAAAGCAGCCTGGACGAACAAGCGT

ATTCTCTACCGCCTCTTTTTGGGGTCTATGTTGTTCTCTGGCAGAACGGGTCAGGCATCAATGCGATCAACTATTACAGCCC GCGCGTCTTCAAGAGTA
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

ATTCTCTACCGCCTCTTTTTGGGGTCTATGTTGTTCTCTGGCAGAACGGGTCAGGCATCAATGCGATCAACTATTACAGCCC GCGCGTCTTCAAGAGTA
aligned sequence quTD_Template

ATTCTCTACCGCCTCTTTTTGGGGTCTATGTTGTTCTCTGGCAGAACGGGTCAGGCATCAATGCGATCAACTATTACAGCCC GCGCGTCTTCAAGAGTA
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)

TTGGCGTATCGGGTGGCAATACCTCACTCTTGACAACGGGCATTTTCGGTGTCGTCAAGGCGGTCATTACCTTTGTTTGGCTGTTGTATTTGATCGATCA
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

TTGGCGTATCGGGTGGCAATACCTCACTCTTGACAACGGGCATTTTCGGTGTCGTCAAGGCGGTCATTACCTTTGTTTGGCTGTTGTATTTGATCGATCA
aligned sequence quTD_Template

TTGGCGTATCGGGTGGCAATACCTCACTCTTGACAACGGGCATTTTCGGTGTCGTCAAGGCGGTCATTACCTTTGTTTGGCTGTTGTATTTGATCGATCA
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)

TTTTGGACGACGGAAGCTTGCTGCTTGTTGGTGC GGCGGGCGGTT CAGTCTGCCTTTGGATTGTGGGCGGATACATCAAGATCGCGAAGCCAGAGAACAAC
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

TTTTGGACGACGGAAGCTTGCTGCTTGTTGGTGC GGCGGGCGGTT CAGTCTGCCTTTGGATTGTGGGCGGATACATCAAGATCGCGAAGCCAGAGAACAAC
aligned sequence quTD_Template

TTTTGGACGACGGAAGCTTGCTGCTTGTTGGTGC GGCGGGCGGTT CAGTCTGCCTTTGGATTGTGGGCGGATACATCAAGATCGCGAAGCCAGAGAACAAC
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CCCGAGGGAACGCAGCTTGATAGCGGTGGCATTGCGGCTATATTCTTCTTCTACCTGTGGACGGCCTTCTATACACCATCTTGGAACGGCACGCCTTGGG
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CCCGAGGGAACGCAGCTTGATAGCGGTGGCATTGCGGCTATATTCTTCTTCTACCTGTGGACGGCCTTCTATACACCATCTTGGAACGGCACGCCTTGGG
 aligned sequence quTD_Template

CCCGAGGGAACGCAGCTTGATAGCGGTGGCATTGCGGCTATATTCTTCTTCTACCTGTGGACGGCCTTCTATACACCATCTTGGAACGGCACGCCTTGGG
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



TCATCAACTCGGTAAGTCCTCCTTCGTGGCCTTCAAAGAAAGCACATATTAACAGTGTCCGCAGGAAATGTTTCGATCCCACCGTCCGCTCCCTTGCACA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

TCATCAACTCGGTAAGTCCTCCTTCGTGGCCTTCAAAGAAAGCACATATTAACAGTGTCCGCAGGAAATGTTTCGATCCCACCGTCCGCTCCCTTGCACA
 aligned sequence quTD_Template

TCATCAACTCGGTAAGTCCTCCTTCGTGGCCTTCAAAGAAAGCACATATTAACAGTGTCCGCAGGAAATGTTTCGATCCCACCGTCCGCTCCCTTGCACA
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



AGCCTGTGCTGCCGCCTCAAACCTGGCTCTGGAACCTTCTGATCTCTCGCTTTACGCCCCAGATGTTTCACGTCCATGGGATACGGAGTCTACTTCTTCTTT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

AGCCTGTGCTGCCGCCTCAAACCTGGCTCTGGAACCTTCTGATCTCTCGCTTTACGCCCCAGATGTTTCACGTCCATGGGATACGGAGTCTACTTCTTCTTT
 aligned sequence quTD_Template

AGCCTGTGCTGCCGCCTCAAACCTGGCTCTGGAACCTTCTGATCTCTCGCTTTACGCCCCAGATGTTTCACGTCCATGGGATACGGAGTCTACTTCTTCTTT
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



GCATCGTTGATGATCCTCTCGATCGTGTGTTTCTTCCTCATTCCCGAGACGAAGGGCGTGCCGCTGGAGAGCATGGAGACTCTATTTGACAAGAAAC
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GCATCGTTGATGATCCTCTCGATCGTGTGTTTCTTCCTCATTCCCGAGACGAAGGGCGTGCCGCTGGAGAGCATGGAGACTCTATTTGACAAGAAAC
aligned sequence quTD_Template

GCATCGTTGATGATCCTCTCGATCGTGTGTTTCTTCCTCATTCCCGAGACGAAGGGCGTGCCGCTGGAGAGCATGGAGACTCTATTTGACAAGAAAC
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



CGGTTTGGCACGCCCATTCGCAGCTAATCAGGGAGCTGAGGGAGAATGAGGAGGCGTTCGGGCGGATATGGGTGCGAGTGGAAGGGAGGTGTGACGAA
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

CGGTTTGGCACGCCCATTCGCAGCTAATCAGGGAGCTGAGGGAGAATGAGGAGGCGTTCGGGCGGATATGGGTGCGAGTGGAAGGGAGGTGTGACGAA
aligned sequence quTD_Template

CGGTTTGGCACGCCCATTCGCAGCTAATCAGGGAGCTGAGGGAGAATGAGGAGGCGTTCGGGCGGATATGGGTGCGAGTGGAAGGGAGGTGTGACGAA
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)




GGAGTATGTCGAGGAGGCTTAAAGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATA
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GGAGTATGTCGAGGAGGCTTAAAGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATA
aligned sequence quTD_Template


GGAGTATGTCGAGGAGGCTTAAAGTGCTTTTAACTAAGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATA
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)


 GTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAGTTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

GTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAGTTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAA
 aligned sequence quTD_Template


GTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAGTTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAA
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)


 AAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCAGTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

AAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCAGTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAA
 aligned sequence quTD_Template

AAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCAGTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAA
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)


 TCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAAAAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCAT
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

TCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAAAAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCAT
 aligned sequence quTD_Template

TCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAAAAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCAT
 aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)



ATGGGAGATGGAGATGATACCTatcgaatt
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence quTD_T7_promoter(OK)

ATGGGAGATGGAGATGATACCT-----
aligned sequence quTD_Template

ATGGGAGATGGAGATGATACCTatcgaatt
aligned sequence quTD_T3-promoter(OK)

Consensus Alignment: GAT-1_T7_promoter, GAT-1_template, GAT-1_...

cggtatcgataagcttgatGAGTACTTTTCTTCATAATTGCATAATATTGTCCGCTGCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGT
 consensus sequence Untitled Consensus

cggtatcgataagcttgatGAGTACTTTTCTTCATAATTGCATAATATTGTCCGCTGCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGT
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

-----GAGTACTTTTCTTCATAATTGCATAATATTGTCCGCTGCCCTTTTTCTGTTAGACGGTGTCTTGATCTACTTGCTATCGT
 aligned sequence GAT-1_template


 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

TCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTAGCTCATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAAC
 consensus sequence Untitled Consensus

TCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTAGCTCATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAAC
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

TCAACACCACCTTATTTTCTAACTATTTTTTTTTAGCTCATTTGAATCAGCTTATGGTGATGGCACATTTTGCATAAACCTAGCTGTCCTCGTTGAAC
 aligned sequence GAT-1_template


 aligned sequence GAT-1_T3_promoter


 ATAGGAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCCTTCACTCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTCCCTTATTTTCATATTTCTTGCATATTCCTTTCT
 consensus sequence Untitled Consensus

ATAGGAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCCTTCACTCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTCCCTTATTTTCATATTTCTTGCATATTCCTTTCT
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

ATAGGAAAAAAAAATATATAACAAGGCTCTTTCCTTCACTCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTCCCTTATTTTCATATTTCTTGCATATTCCTTTCT
 aligned sequence GAT-1_template


 aligned sequence GAT-1_T3_promoter


 CAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACACAGTCAAATCAATCAAAatgggtctttcgataggaaataggatcctccgaaaattgtca
 consensus sequence Untitled Consensus

CAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACACAGTCAAATCAATCAAAatgggtctttcgataggaaataggatcctccgaaaattgtca
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

CAATTATTATTTTCTACTCATAACCTCACGCAAATAACACAGTCAAATCAATCAAAatgggtctttcgataggaaataggatcctccgaaaattgtca
 aligned sequence GAT-1_template


 aligned sequence GAT-1_T3_promoter


 aaaatgaggccatggcagaagatccccagagatctatggctggcgtgtctatctcctagcgtgctctgcctgcttcggcgccatgtctttcggctggga
 consensus sequence Untitled Consensus

aaaatgaggccatggcagaagatccccagagatctatggctggcgtgtctatctcctagcgtgctctgcctgcttcggcgccatgtctttcggctggga
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

aaaatgaggccatggcagaagatccccagagatctatggctggcgtgtctatctcctagcgtgctctgcctgcttcggcgccatgtctttcggctggga
 aligned sequence GAT-1_template

 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




ttcctccgtcatcggcggcgtcatcgaactcgaaccctttaaacacgactttggcttcatcggcaacgataaagccaaggccaacctgggcgccaatc
 consensus sequence Untitled Consensus

ttcctccgtcatcggcggcgtcatcgaactcgaaccctttaaacacgactttggcttcatcggcaacgataaagccaaggccaacctgggcgccaatc
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

ttcctccgtcatcggcggcgtcatcgaactcgaaccctttaaacacgactttggcttcatcggcaacgataaagccaaggccaacctgggcgccaatc
 aligned sequence GAT-1_template

 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




gtctctaccctccaagccggctgcttcctcggcgcgctgatcgcctcacctataaccgatcgcttcggccgcaagtgggtgtctcatcgtgtctccctgg
 consensus sequence Untitled Consensus

gtctctaccctccaagccggctgcttcctcggcgcgctgatcgcctcacctataaccgatcgcttcggccgcaagtgggtgtctcatcgtgtctccctgg
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

gtctctaccctccaagccggctgcttcctcggcgcgctgatcgcctcacctataaccgatcgcttcggccgcaagtgggtgtctcatcgtgtctccctgg
 aligned sequence GAT-1_template

 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




tcgtcatcatcggtatcatcatgcaagccgccgctcaggcaacctcgcacccatgtacattggccgtttcgtcgccggcgtgggcgctcggcgccgccag
 consensus sequence Untitled Consensus

tcgtcatcatcggtatcatcatgcaagccgccgctcaggcaacctcgcacccatgtacattggccgtttcgtcgccggcgtgggcgctcggcgccgccag
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

tcgtcatcatcggtatcatcatgcaagccgccgctcaggcaacctcgcacccatgtacattggccgtttcgtcgccggcgtgggcgctcggcgccgccag
 aligned sequence GAT-1_template

 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




ctgcatcaaccccgctctttgtgtctgagaacgctccccgctcgatccgcggtctgttgacgggcctctaccaactcttcattgtcaccggcggcatgatc
consensus sequence Untitled Consensus

ctgcatcaaccccgctctttgtgtctgagaacgctccccgctcgatccgcggtctgttgacgggcctctaccaactcttcattgtcaccggcggcatgatc
aligned sequence GAT-1_T7_promoter

ctgcatcaaccccgctctttgtgtctgagaacgctccccgctcgatccgcggtctgttgacgggcctctaccaactcttcattgtcaccggcggcatgatc
aligned sequence GAT-1_template

aligned sequence GAT-1_T3_promoter




gcattctggatcaactactccgtctctctgcacttcaagggaatccatgtacatcttcccgcctcgccatccaaggcttcccgcggccttttgtgcg
consensus sequence Untitled Consensus

gcattctggatcaactactccgtctctctgcacttcaagggaatccatgtacatcttcccgcctcgccatccaaggcttcccgcggccttttgtgcg
aligned sequence GAT-1_T7_promoter

gcattctggatcaactactccgtctctctgcacttcaagggaatccatgtacatcttcccgcctcgccatccaaggcttcccgcggccttttgtgcg
aligned sequence GAT-1_template

aligned sequence GAT-1_T3_promoter




tctgcatgctcctctgccacgaaagcccgcgctggctggcccgtcgtgaccgatgggaagaatgcaagtctgtgctggcgcgcatccgcaacctcccc
consensus sequence Untitled Consensus

tctgcatgctcctctgccacgaaagcccgcgctggctggcccgtcgtgaccgatgggaagaatgcaagtctgtgctggcgcgcatccgcaacctcccc
aligned sequence GAT-1_T7_promoter

tctgcatgctcctctgccacgaaagcccgcgctggctggcccgtcgtgaccgatgggaagaatgcaagtctgtgctggcgcgcatccgcaacctcccc
aligned sequence GAT-1_template

aligned sequence GAT-1_T3_promoter



agaccacccgtacatcgtcgacgagttccgcgagatccaggaccagctcgaacaggagcgtcgtctccagggcgacgccacttactgggacttgaccgc
 consensus sequence Untitled Consensus

agaccacccgtacatcgtcgacgagttccgcgagatccaggaccagctcgaacaggagcgtcgtctccagggcgacgccacttactgggacttgaccgc
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

agaccacccgtacatcgtcgacgagttccgcgagatccaggaccagctcgaacaggagcgtcgtctccagggcgacgccacttactgggacttgaccgc
 aligned sequence GAT-1_template

-----acgccacttactgggacttgaccgc
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




gatatgtggaccgtcgccggcaaccgcaagcgcgccctgattagtagtattttcttgatgatctgccagcaaatacggggaccaacgccatcaacacgtacg
 consensus sequence Untitled Consensus

gatatgtggaccgtcgccggcaaccgcaagcgcgccctgattagtagtatttt-----
 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

gatatgtggaccgtcgccggcaaccgcaagcgcgccctgattagtagtattttcttgatgatctgccagcaaatacggggaccaacgccatcaacacgtacg
 aligned sequence GAT-1_template

gatatgtggaccgtcgccggcaaccgcaagcgcgccctgattagtagtattttcttgatgatctgccagcaaatacggggaccaacgccatcaacacgtacg
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter



cgctaccatcttcaagaacttgggtatcaccggcacgtcgactagcttgtttagtaccggcatctatgggtattgtcaaggctgtagctgcgtcatttt
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

cgctaccatcttcaagaacttgggtatcaccggcacgtcgactagcttgtttagtaccggcatctatgggtattgtcaaggctgtagctgcgtcatttt
 aligned sequence GAT-1_template

cgctaccatcttcaagaacttgggtatcaccggcacgtcgactagcttgtttagtaccggcatctatgggtattgtcaaggctgtagctgcgtcatttt
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

cttgctgttcttggccgactcgctgggctcgtagacgttcgctgctgtggacgtcgattgcgccagggtcttgctatgttttatattggcctttatgtccgc
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

cttgctgttcttggccgactcgctgggctcgtagacgttcgctgctgtggacgtcgattgcgccagggtcttgctatgttttatattggcctttatgtccgc
 aligned sequence GAT-1_template

cttgctgttcttggccgactcgctgggctcgtagacgttcgctgctgtggacgtcgattgcgccagggtcttgctatgttttatattggcctttatgtccgc
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

atctcgccgccgattgatggccagccgggtgccgcctgcccgggtatgtagcgttggtgtgcatatctctgtttgctgctttcttccaatttggctggggctc
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

atctcgccgccgattgatggccagccgggtgccgcctgcccgggtatgtagcgttggtgtgcatatctctgtttgctgctttcttccaatttggctggggctc
 aligned sequence GAT-1_template


atctcgccgccgattgatggccagccgggtgccgcctgcccgggtatgtagcgttggtgtgcatatctctgtttgctgctttcttccaatttggctggggctc
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

ctgcctgctggatctacgctcggaaatccccgccgccgctgcgctccctcaacgtgtcctacgccgccgacgcagtggtgctgttcaatttcgtcgt
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

ctgcctgctggatctacgctcggaaatccccgccgccgctgcgctccctcaacgtgtcctacgccgccgacgcagtggtgctgttcaatttcgtcgt
 aligned sequence GAT-1_template

ctgcctgctggatctacgctcggaaatccccgccgccgctgcgctccctcaacgtgtcctacgccgccgacgcagtggtgctgttcaatttcgtcgt
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




ggcccgcgccgtgcctactatgctggtcacggtcggccccacggttacggcacctacctcatcttggcagcttctgcctcagcatgtttgtctttgtc
 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence GAT-1_T7_promoter

ggcccgcgccgtgcctactatgctggtcacggtcggccccacggttacggcacctacctcatcttggcagcttctgcctcagcatgtttgtctttgtc
 aligned sequence GAT-1_template

ggcccgcgccgtgcctactatgctggtcacggtcggccccacggttacggcacctacctcatcttggcagcttctgcctcagcatgtttgtctttgtc
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter




tggttcttcgtgcccagacaaagggtatctcgcttgagcacatggatgagctgtttggcggtactgatgggcctgccgctgagaagtcgtcgggtcatg
 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence GAT-1_T7_promoter

tggttcttcgtgcccagacaaagggtatctcgcttgagcacatggatgagctgtttggcggtactgatgggcctgccgctgagaagtcgtcgggtcatg
 aligned sequence GAT-1_template

tggttcttcgtgcccagacaaagggtatctcgcttgagcacatggatgagctgtttggcggtactgatgggcctgccgctgagaagtcgtcgggtcatg
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter



gtggagatgatgtcgggtcggagatggggaaggggatcagaagtcgaagcatgtggaggtttatgttatcgatggtagtggttagtAGTGCTTTTAACTA
 consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence GAT-1_T7_promoter

gtggagatgatgtcgggtcggagatggggaaggggatcagaagtcgaagcatgtggaggtttatgttatcgatggtagtggttagtAGTGCTTTTAACTA
 aligned sequence GAT-1_template

gtggagatgatgtcgggtcggagatggggaaggggatcagaagtcgaagcatgtggaggtttatgttatcgatggtagtggttagtAGTGCTTTTAACTA
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

 AGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATAGTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAG
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

AGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATAGTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAG
 aligned sequence GAT-1_template

AGAATTATTAGTCTTTTCTGCTTATTTTTTCATCATAGTTTAGAACACTTTATATTAACGAATAGTTTATGAATCTATTTAGGTTTAAAAATTGATACAG
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

 TTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAAAAAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

TTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAAAAAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCA
 aligned sequence GAT-1_template


TTTTATAAGTTACTTTTTCAAAGACTCGTGCTGTCTATTGCATAATGCACTGGAAGGGGAAAAAAAAAGGTGCACACGCGTGGCTTTTTCTTGAATTTGCA
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter

 GTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAATCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAA
 consensus sequence Untitled Consensus

 aligned sequence GAT-1_T7_promoter

GTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAATCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAA
 aligned sequence GAT-1_template

GTTTGAAAAATAACTACATGGATGATAAGAAAACATGGAGTACAGTCACTTTGAGAACCTTCAATCAGCTGGTAACGTCTTCGTTAATTGGATACTCAA
 aligned sequence GAT-1_T3_promoter


AAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCATATGGGAGATGGAGATGATACCTatcgaattcctgca
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence GAT-1_T7_promoter

AAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCATATGGGAGATGGAGATGATACCT-----
aligned sequence GAT-1_template

AAAGATGGATAGCATGAATCACAAGATGGAAGGAAATGCGGGCCACGACCACAGTGATATGCATATGGGAGATGGAGATGATACCTatcgaattcctgca
aligned sequence GAT-1_T3_promoter

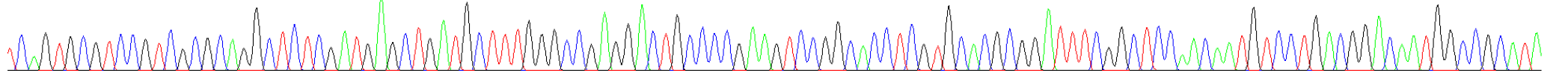
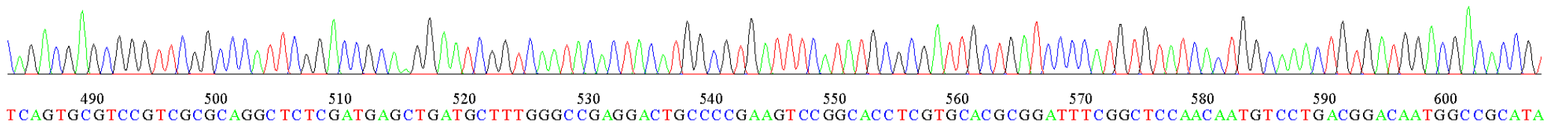
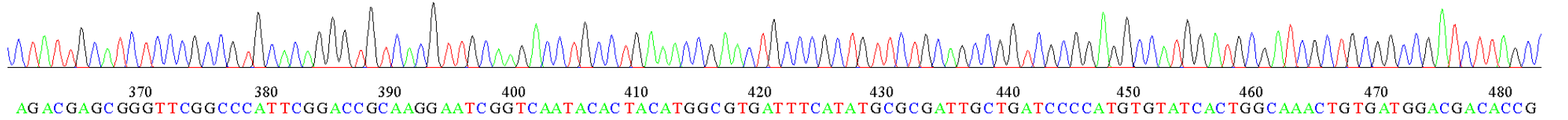
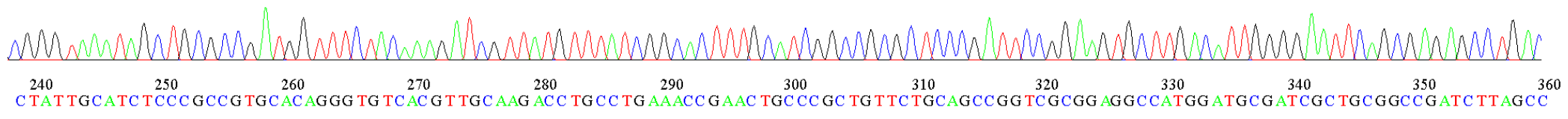
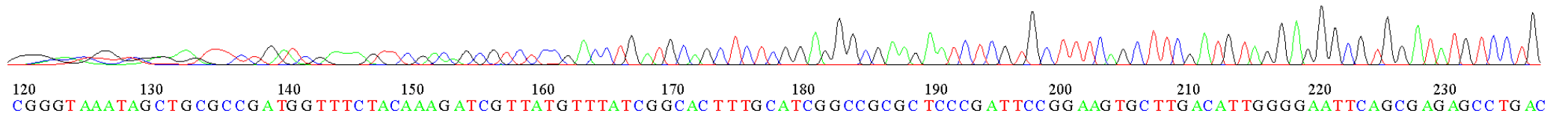

gcccgggggatccact
consensus sequence Untitled Consensus

aligned sequence GAT-1_T7_promoter

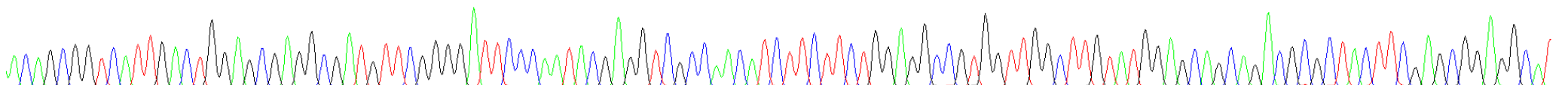
aligned sequence GAT-1_template

gcccgggggatccact
aligned sequence GAT-1_T3_promoter

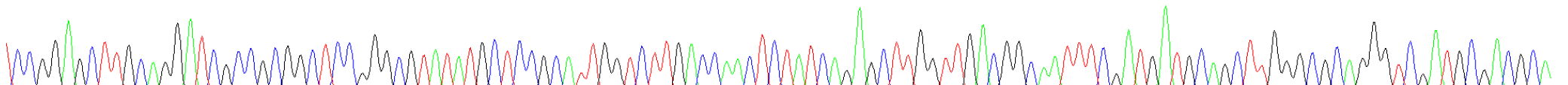
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
GGGGCACTGG TCGGG AG TT CT GATCGA A GTTC GACA GC GTCTCCG ACCTG ATGCAGC TC TCGG AGGGCG AAG AATC TCG TGC TTT CAGC TTCG ATG TAGG AGG GCG TGG ATATG TCC TGG



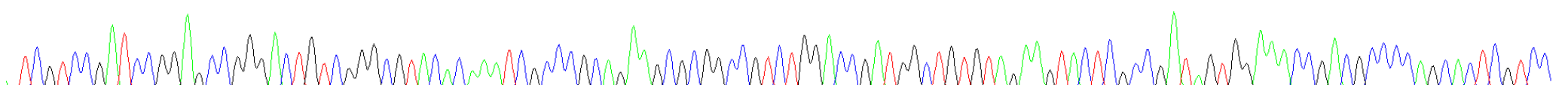
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730
ACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCAT



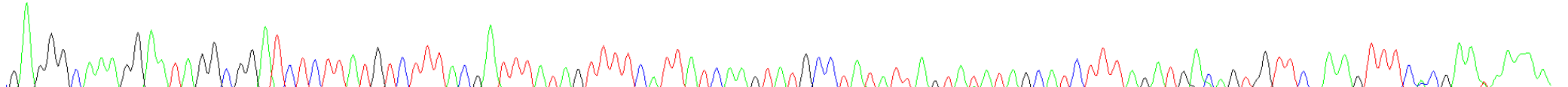
740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
CCGGAGCTTGCAAGGATCGCCGCGGGTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGCACAAGGTCGATGCGACGCA



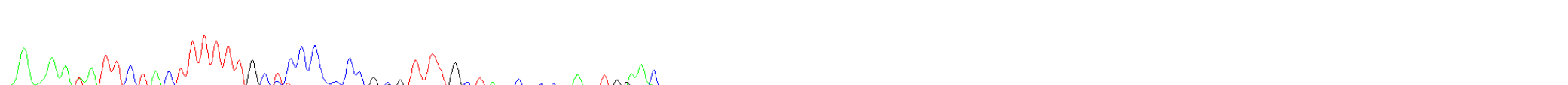
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
ATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCC

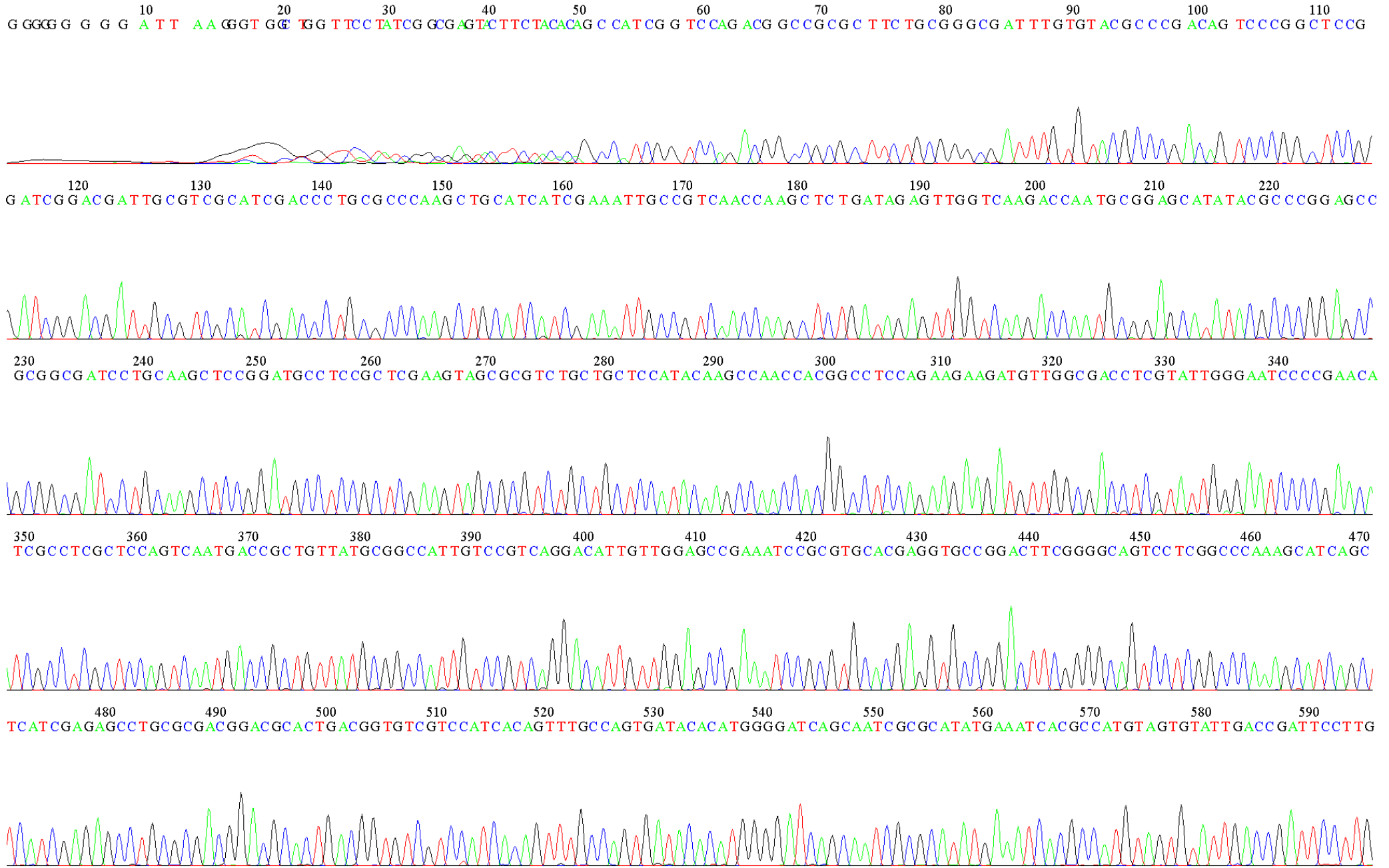


990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
GAGGGCAAAAGGAA TAGGC GGATCTCTTATGTC TTTACGATTTATAGTTTTCA TTATCAA GTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGT GTTCGAAAGTTTCACGAATAAAAA

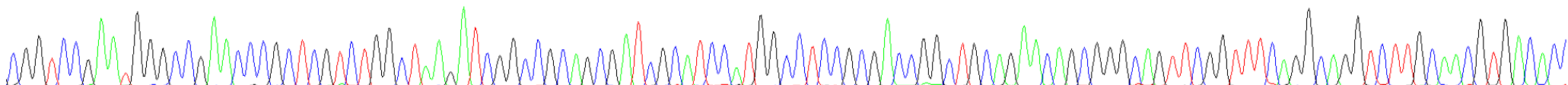


1110 1120 1130 1140 1150 1160
GATAATA TTCTACTTTTTTGTCCACCCGCGTTTGGCTAGCCCCGAGTGAACA

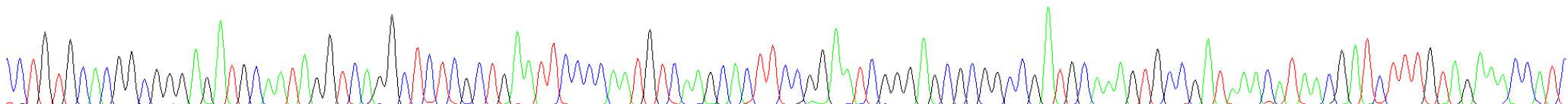




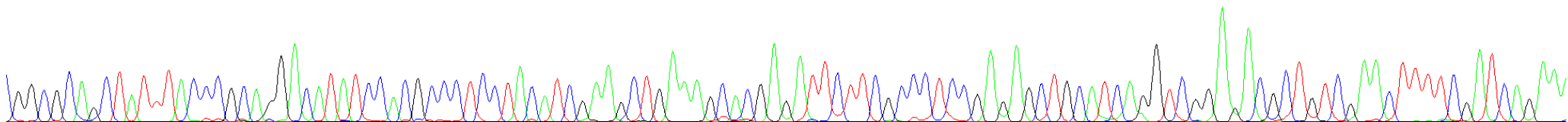
600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
CGGTCCGAAATGGGCGCAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGCAGCGATCGCATCCATGGCCCTCCGCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTCAGGCAGGCTTTGCAACGTGACAC



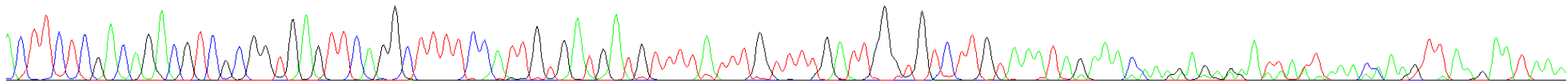
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
CCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAAGGCTCTCGCTGAAATCCCCAATGTCAAACGACATTCGGAAATCGGGAGCGCGCCGATGCAAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATC



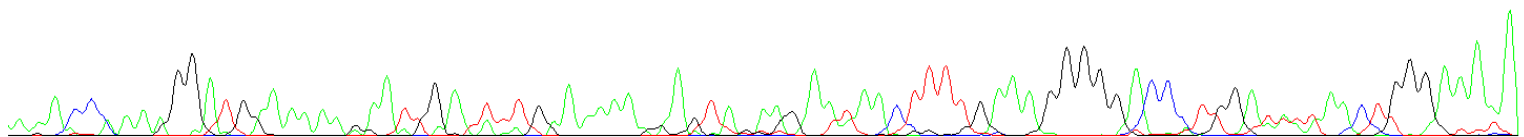
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970
GGCGCAGCTATTTACCCGCAAGACATATCCACGCCCTCTACATCGAAGCTGAAAACGAGATTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTCGGAGACGCTGTCGAACCTTTTCGATCAGAA



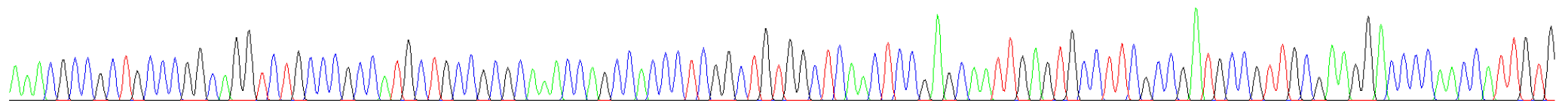
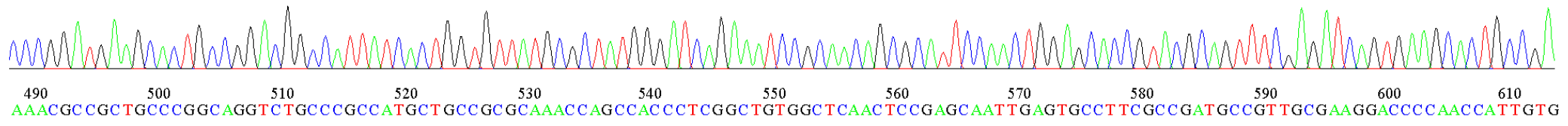
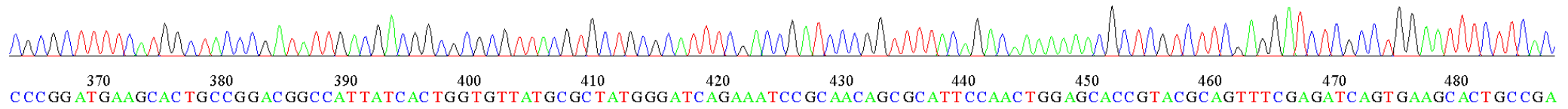
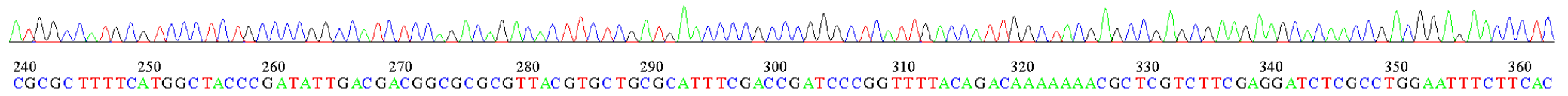
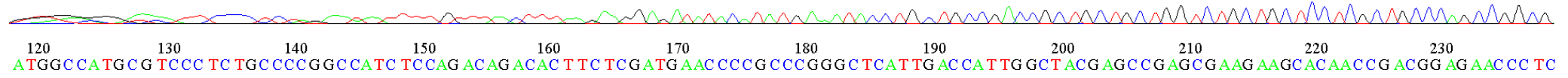
980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090
ACTTCTCGACAGACGTCGCCGGTGAAGTTCAGGCTTTTCCAATTGTGATGATGTTTTATTTGTTTTGATTGGTGTCTTGTAAATAGAAACAAAGAGAGAAATTATTAAACAAAGTTAAGAATAAA



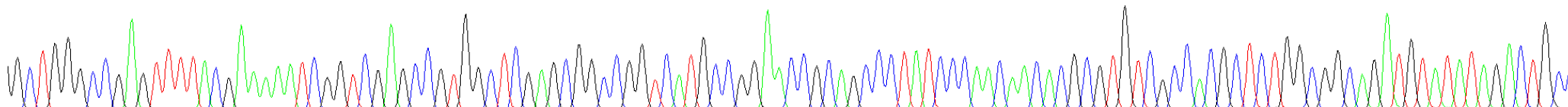
1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180
AAACCAAAAGGATGAAAAAGAAATGGATATTGAAAAAGGAGTAGAAGAAATAACTTTTTGAAA GGGGGACCCCTGGATATTAACTGGGAAAT



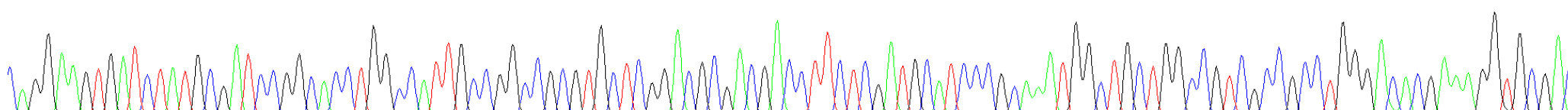
T GT GAC G 10 T C A T T C C C T C 20 T A G A A T A A T T T T 30 G T T T A C T T T T A A 40 G A A G G A G A T A T A C A T A T G 50 A A A T A C C T G C T G C C G A C C G C T G C T G C T G G T C T G C T G C T C C T C G C T G C C C A G C C G G C G 60 70 80 90 100 110



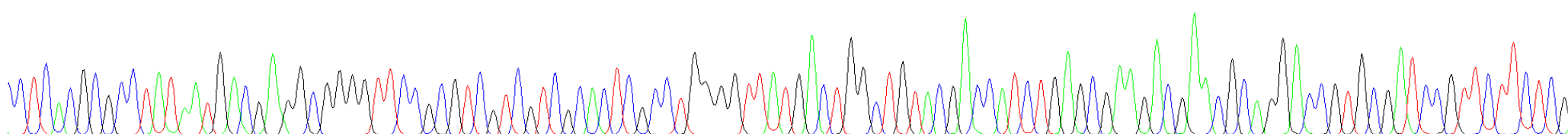
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730
GCTGGGCGAGTTTTACGAAAAATCGGTTCGAGCCGTGGCTCGAGCGGCCGGTTCATGCCGGAACCGCAGCCCTATCCCAACAACACGC GTGTCCGACGCTCTGGCGGCAGATGTATATAGACTGC



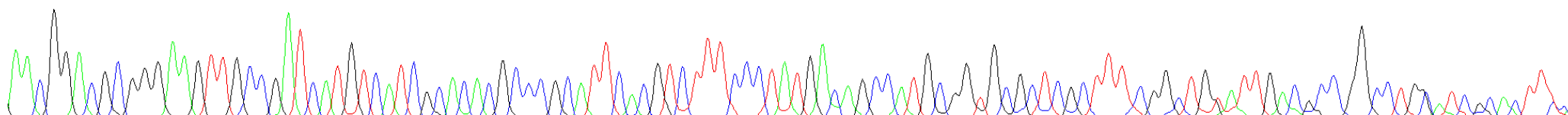
740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
CAGGAAGTGATCTATGC GATCCGGCACCTGGCCATTGCCGGCCGCGTGCTCGGACGCGACGACCTTCTCGATGCATCCCGCAAATGGCTGCTGGCCGTCGCCGCCCTGGGACACGAAAAGGTGCGA



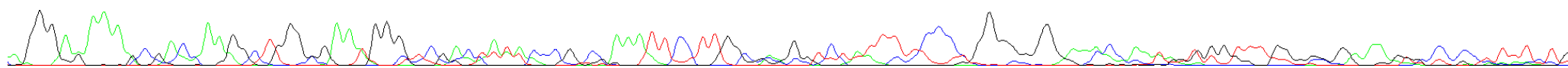
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
CCTCACGCGCCTATAATGACGAGGCGGGGTTCCGCTCGTTCGTCGACTCGCCTGGGGTTATGACTGGCTGTACGACCATCTGAGCGAAGACGAACGCAAGGCCGTGCATCCGTTCTTCTCG



990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
AACGGACGC GGGAAAGTTGCCGATCATGTTCATCGCACACGCCCGCATTCACGTCTTTCCCTATGACAGCCATGC GGTCGCTCGCTTTCGGCTGTATTGACGCCGGCCTGGATCGCACTTCC



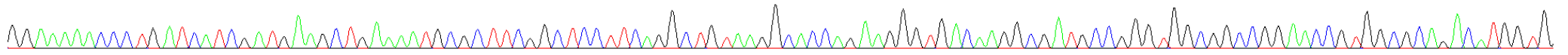
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
AGGGAGAAAGCGACCAAGGCTGGCGAATGGGTCGACTATACCCGCGAAATTCCTTGCGAAGGTCTATTTTCCCTGGGGGGAAACC AATATGTGTTTGGGGCGAAAAGTGC CCCTTTTCTG



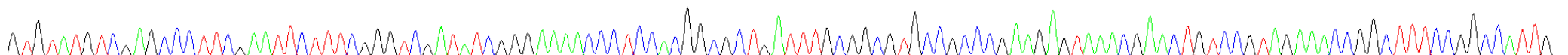
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
G GG CT TCG C T CC TT TCG GGCTTTGTTAGCAGCCGGACTCTCAGTGGTGGTGGTGGAACTGCTTGGGAAGGGAGAGCTTGAACGC TCGTCATCGACA TCAC TG AAGTAGATGTCGGT



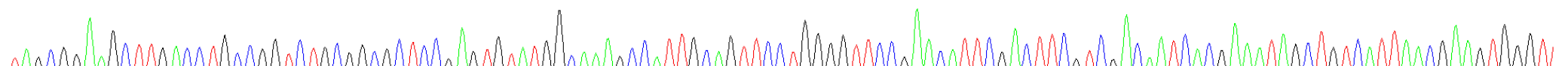
120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230
GGAAAAACCCTGATCATCGATGAAAGCTGAAAATGCGCTTCGGCTCCCTCAGGC TGTAAAGGCACCAG AAGGGTGAACAGGCATGCCGGGTGGCCGGCCGGAACCGTGGCCGACACATGGTGT



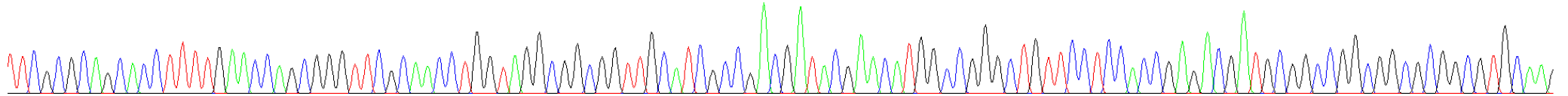
240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
GTGTATGTCGAGCCCTTCGAATTCTTTCGGGTGATATCGGGAAAACCC TCCACGGCGCTGATTTGCGGGCTGCCGCCCGAAGAGTAAACGAAC TGTCCGTAGAAACGGCTTTCGGCCATTG



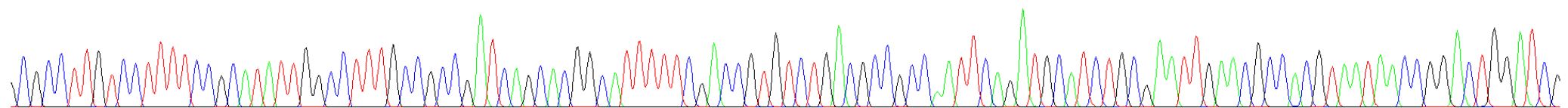
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
TAGCGGAAAGCTTGACCTGCCGGTCTGCGGCGCTCCGAGTGTATGGCAAAGCCATTGCAAGTTCCCTGGGGTTCCGAACATTCCGACTTCGTCCGACAATCACGAAATAGCTGTCAATTAACGAAGTGGGT



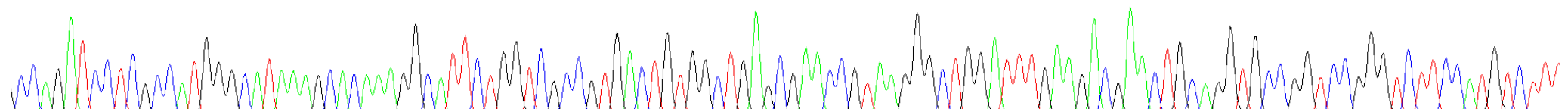
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610
TTCGCGCAGCACCTTTTGAACAGCGGGTTTCGCAACC TGGTAGGGCGCGGTTGCATCGCCGACGATACGAACATGGCCGGGCTGTTCCCTCCACCAGACGATGCGGCCGGCGGC GTGCAA



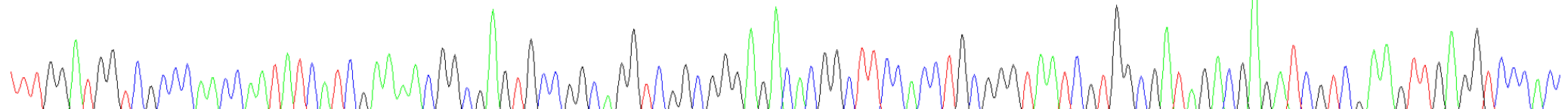
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730
GCGCC T T T T T C C G C A T A T T G G C C T T T G C C G C C G A T C A G C A C G G C A T T T T T C G A C C G T G T C T G A C G C C G C C A A T T C A G A T G C A T C T G C G A A T T G A A C G C C A C G T A A T A A C C G G A C T G G A T C G



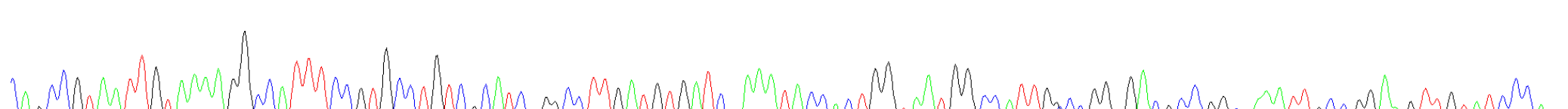
740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
C C A G A T C C T C G C C A T G G G C A T A A A G C A C A A A G G C A T T C T G G T C G C C G T G A C T G T G G C T G A G C G A A C C G T A A G G G C T G G A T T T G A A G A C G A A C T G C A G G T G C C G G T C C G G G T C T T C C A T G T C T T T



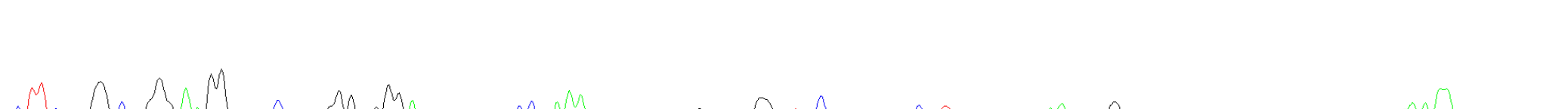
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
T T G G A T G G T C G C C C A A C C A A T A T C A T C G A A A A C G G C G A G T G C C G G C A G G T C G G C G G G A G A C A C G G C T T C C A C C T G C G G G T A A T C G T G G C G A T A G A C G A G A T C G T C G A A G T T G A G G T C C C A C

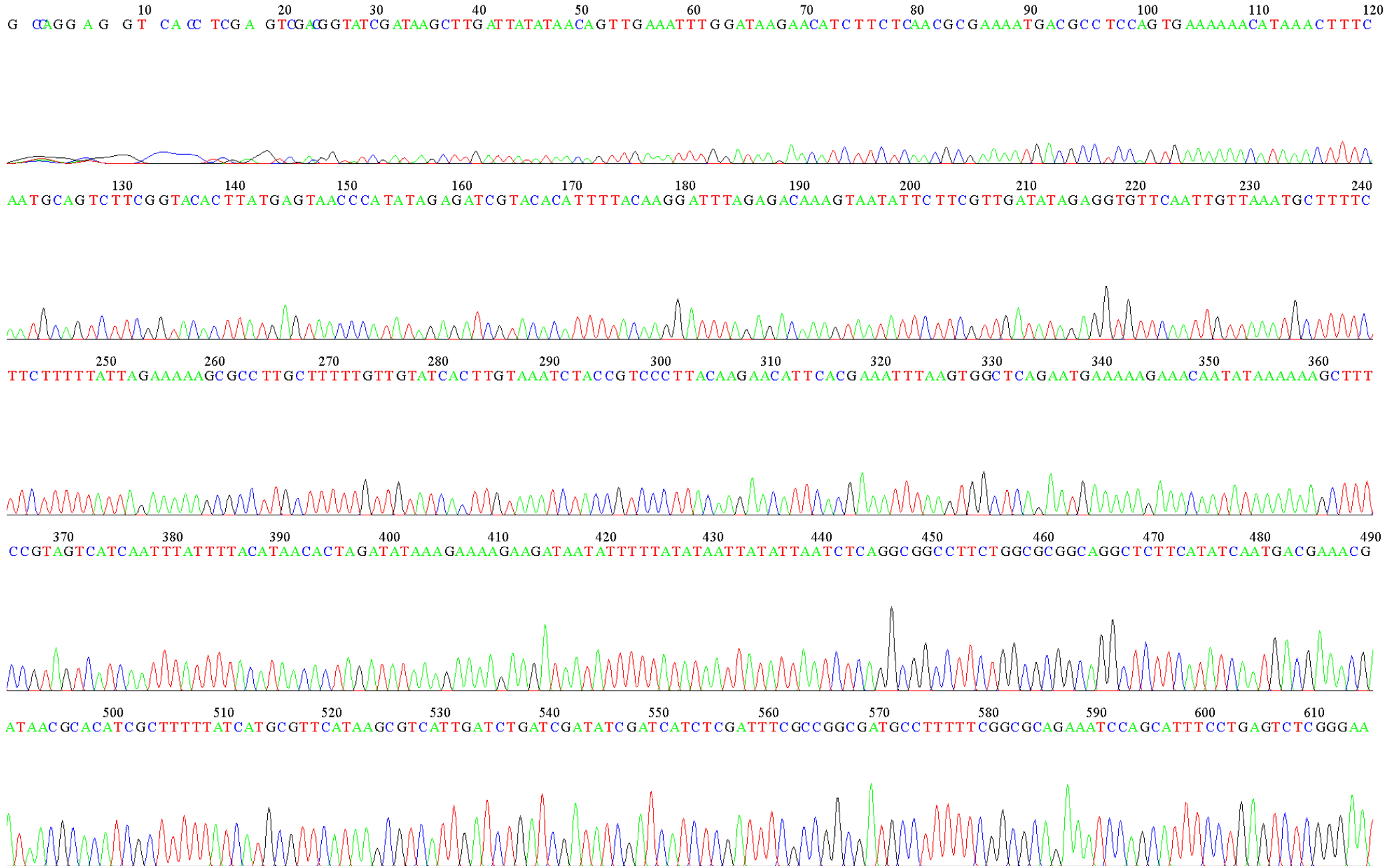


990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
C A G C C G T A A T T G T A A A A G G C C A T T T C C G T G C C T G T C G C A T C G G G C C T T G A T G T G A T C G A A A T A C C A C T G G T A A T G G C C A T T G C C G G T G A C G C C G G C A A A T T G C C G G A A G T T G T A T C C C A G

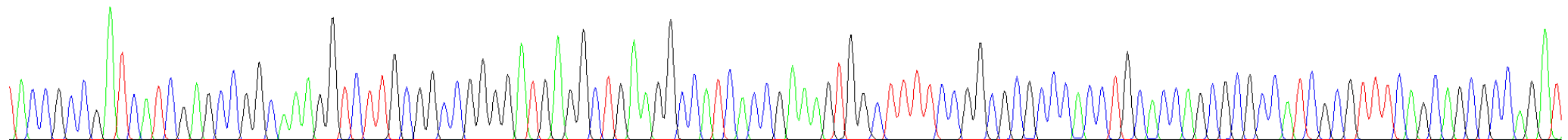


1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220
C T T C A G G C C C G G G A A G G T C C C C A A G G G T G G G A G T C C T C C C C C A A A T T T G G G C C G G C G G G T T T C C C G C G C C C T T G T T G T A A A A C G G A A A C A A A C C C G G G T T T C T T G G A A A A A C A G C C C G T

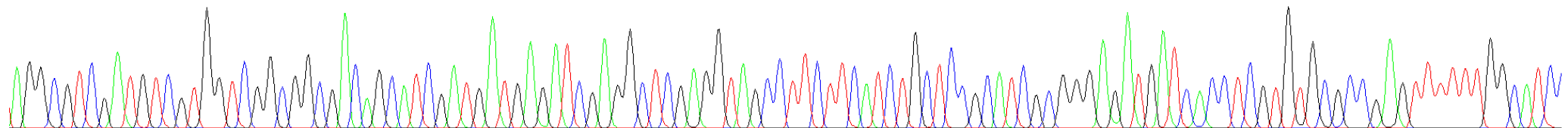




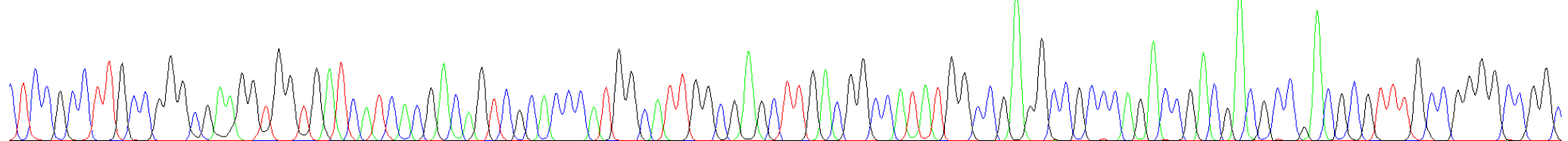
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
TACCGCCGATCATCGAGCCGGCAAAGGTC TTGCGGBCGGGGATGAGGCTGAAGGCCATCACCGAAAGTGGCTTTCCGGCGGCCACCTGCACCAGCGCGCCATCGCGT TTTCAAGCAGCGCCAGAT



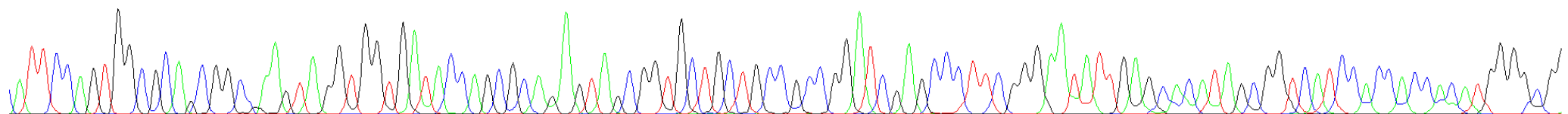
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
AGGCGTCGATGTCGTGGTCCGGCGACAGCATCGATGATGAGATCGAGGCTCGAGGTAGCCTTCTTCATCTGCTCCGCATCGCGGGAGATGATCACCTCGTGTGCGCCGAGTTTTTTGGCATC



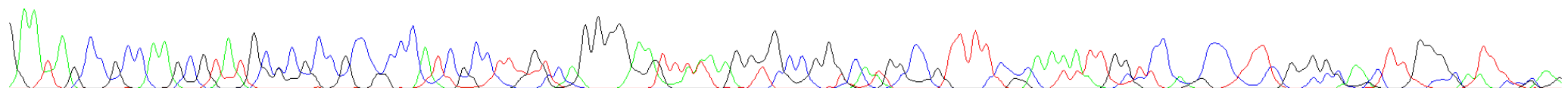
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
CTCCGCCTTGCCGGGCGAAGGTGGTGATCATCACGACAGTGCACCCATGGCATTGGCGAGCTTGACGGCCATATGGCCGAGGCCGCCAGACCACGACGACGCCGACGCGTTTGCCGGGGCCGGC



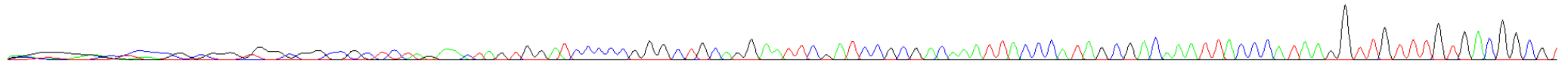
990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
ATTCCAGTGGCGCAGCGGCCAAGTAAGTGGTGGTGAACCAAGCGCAGAGTAGCGGTGCTGCTGCCGCCGGATCGAGCCCTTCTGGGAAATTAGACACATAGCGGTTCATCCACCACCACATGGGGCG



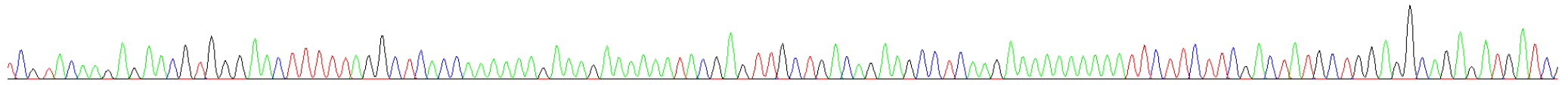
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
GAATAGCCGCAAAGCGTATGCGCGCCGCCGCCATCGCCTTTGTCAAGGGAGTTATAAGGTGCCGGGCATGGCGTTTTCGCAATATTGGTCCAGCC TTTCGGGGCAA CTTGGGCATTTTCGAG



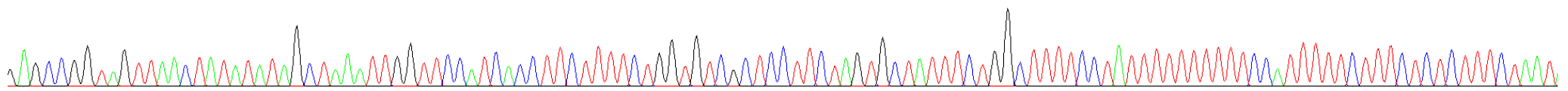
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
A CCGT GG AAC TC CC G CG G TG GC G GCC GC T C TAG AA CTAG TG G AT CCCC CG GG CTGC AG G AAT T CG AT CC GC G ACAA AT T ACC CA TAG CG ACAA TT ACC CA TAAG G TTG TTTG TGAC GG CG



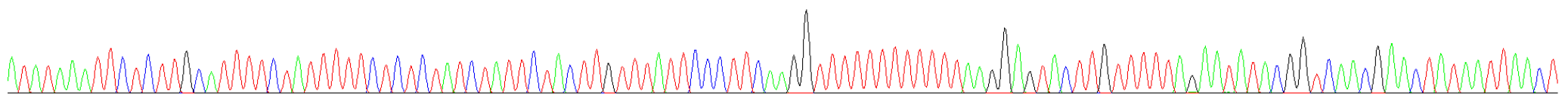
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
TCG TACAA GAG AACG TGGG AAC TTT TTA GGC TCACCA AAAAAA GAAAG AAAAAA TAC GAG TTGC TGACAG AAGCC TCAA GAAAAAAAAA ATTC TTCTTCGAC TATGC TGGAGGCAG AG ATGATC



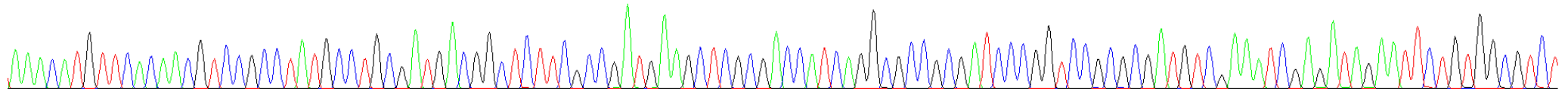
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
GAGCC GG TAG TTAAC TATATATAGC TAAATTGG TTCCATCACC TTC TTTTCTGG TGTCCG TCCTTCTAG TGC TATTTCTGGC TTTTCCAT TTTT TTTT TCCAT TTTTCTTCTCTCTTTCTAAT



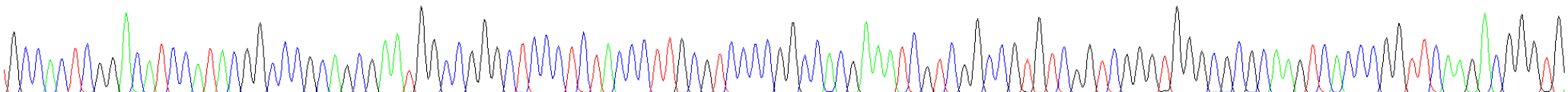
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
ATATAAA TTC TC TTGC ATTTTCTATTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGT TTAATTCCTTCAA GGT TTTT TTTT TAA GGAGTACTTGT TTTTGAATATAC GGTCAA C GAAC TATAATTAACT



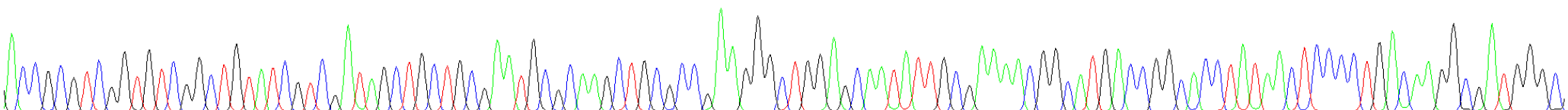
500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610
AAACATG TTCACAA CGTCCGCCTATGCCTGCGATGACGGCTCTTCGCCGATGAAGCTCGCACCATCAGGCGCCGC GATCCC GGTCCGCGCATGTCGAAATCGAGATAGAATTCTGTGGCGTCT



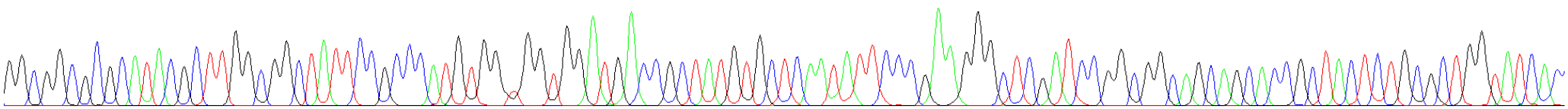
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GCCACTCGGACATCCATACGGCCCCGAGCGAATGGCCGGGCTCCCTCTACCCCTTGC GTCCCCGGCCACGAAATCGTCGGCCGTGTTCGGTTCGGGTGGGCBCGC AAGTCACCCGGTTCAAGACGGGTG



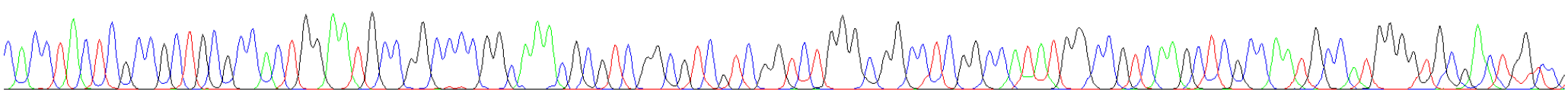
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
ACCGCGTTCGGTGTTCGGCTGTATCGTTCGATAGCTGCTGC GAATGC GCAAGCTGCC GAAGGGCTGGAGCAATATTGC GAAAACGGCATGACCGGCACCTATAACTCCCTTGACAAAGCGATGGGC



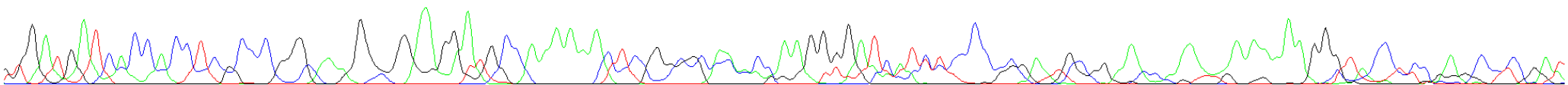
880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
GGCGGC GCGCATACGCTTGGCGGCTATTCGCCCATGTGGTGGTGGATGACC GCTATGTGCTCAATATTCCC GAA GGGCTCGATCCGGCGGCAGCAGCACC GCTACTCTGC GCTGGTATCAC



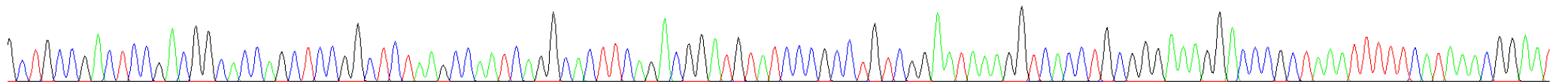
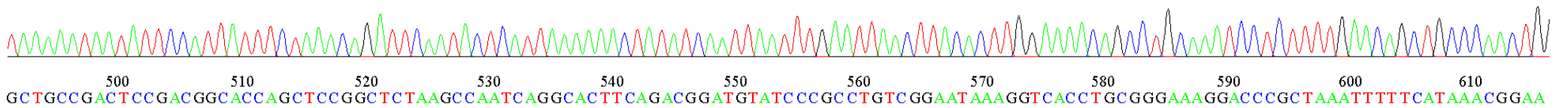
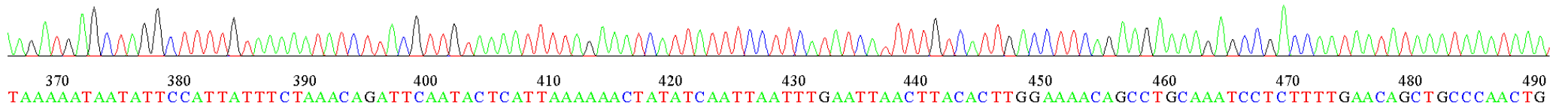
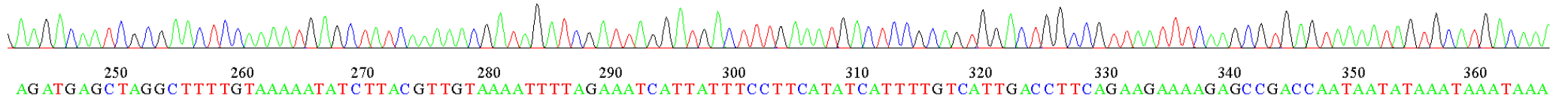
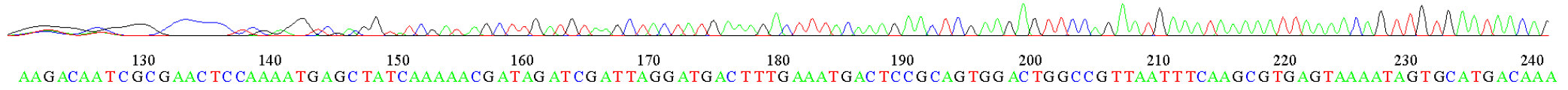
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
CACCTACTCGCCGCTGC GCCACTGG AATGCCGGCCCCGGCAAACGC GTC GGC GTCGTC GGTCTGGGC GGCCTCGGCCATATGG CCGTCAA GCTCGCC AATGCCATGGGGTGC GACTGGCC



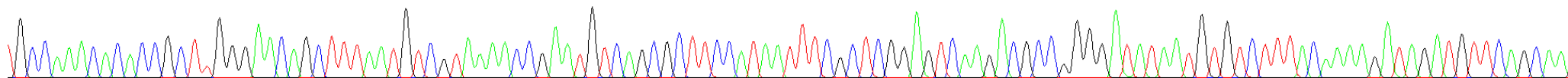
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
GGGATGATCA CCACCTCGCCCG GGAAGCCGG AAGGATGCC AAAAAACTCGGCG ACACC AAGGTGATCATCTCCCGCAATGC GGAACC AAT TGA AAAAA GGGTA CCTCCGAGGCTC GAT



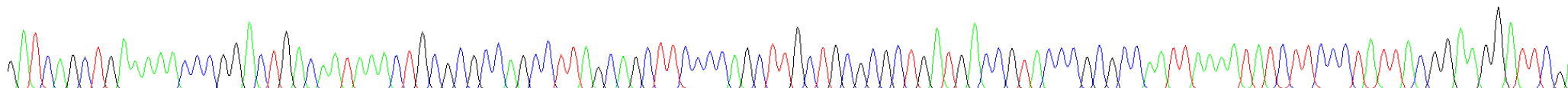
G G G T G G T C GC TCG A G TCG AG G TATCG ATAAGCTTG ATGTAAGCTAC TATG AAAGACTT TACAAAG AACTCG AAGAGTTCCAG AATG AAAATAAAAA TTA AAAACA GTTGTG AATAACA G



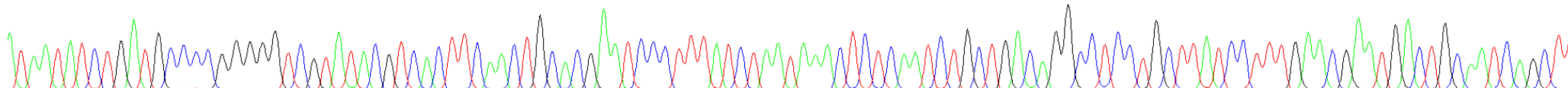
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
TGCCAAACACACCBCGCTTGGGAACAGCTTTAATGTCGTAAAACC GAATGTCAGCGCTTCCATAATTTTCGCTCGGAGTCAAGACGCCGGGATATAATGTGTCTTTACAAAAGATAGATGTTTCAGCAA



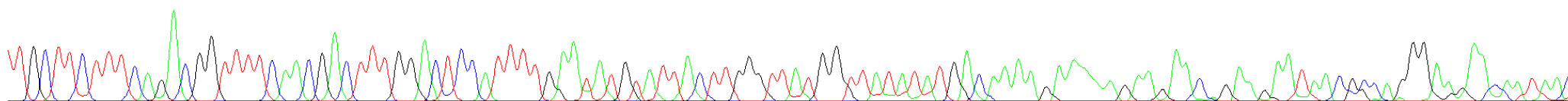
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
GATCAGCTGAAAAACCCGGACTGACAAATAAACTGCGCGCCAGCCTTAGCAGCTTCCCCAGCTTGCTGC GCGCTGATGACC GTACCCGCGCCAATTAATAATATCTTCCCTATTACGGAA GGATTTCG



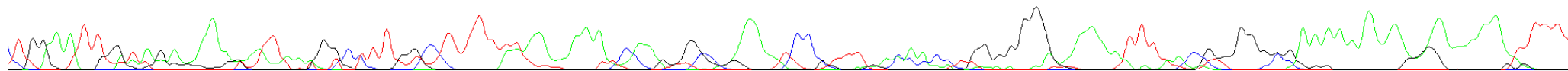
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
ATAATATCTGATGCCCCGGGGTTCGTATACGTCACTTCAACTGCACGAATCCCTTTATCTAATAAACTCTCAATCTGCTGACAGGCCCTCCTGCTTATCCTTTGAACGAATGACTGCAATCAGCTT



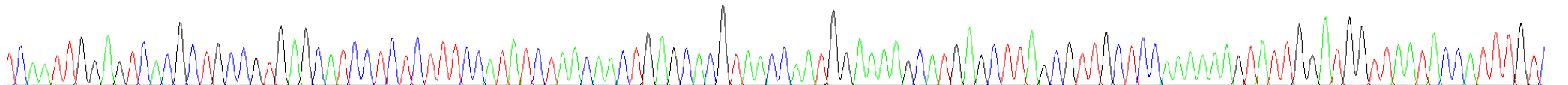
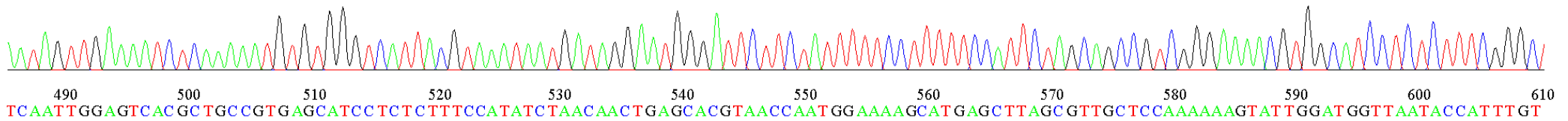
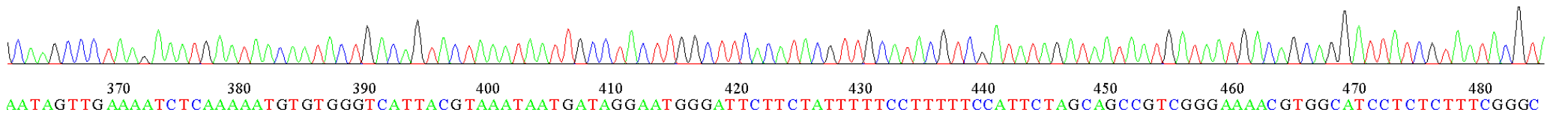
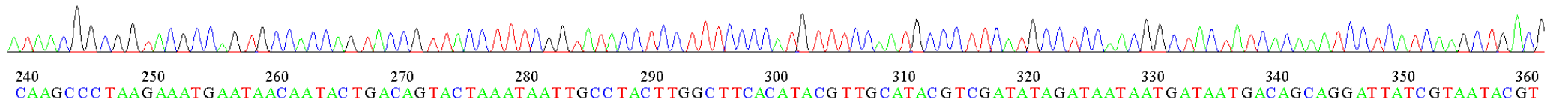
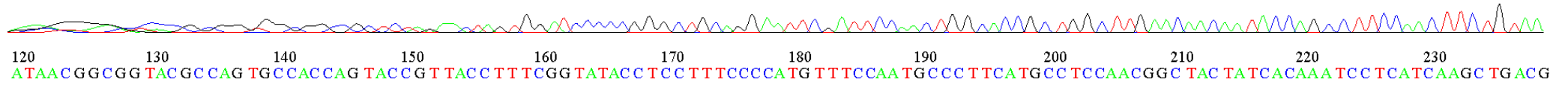
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
TGCTTCTTTCAGACGGT TTTCAACGAC TTTGGACTCCATTTTGAATATGTATTACTTGGGTTATGTTTATATATGACAAAA GA AAAA GAAGAACAGAA GAATAA C GCCA GGGAA GAACAAT AAC



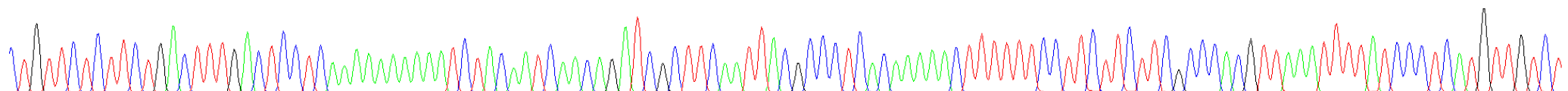
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
TGGAA TTTGTAGAGAAAGAA TAAAGGCTTTGGC TTTTATA TAAAATCAAGT GCA GAAATCCGTTT GACAACTGGGGGATAAAA TTTTA CGGGGGC GAAAAAAA A GGGAAAAAAT TTTT



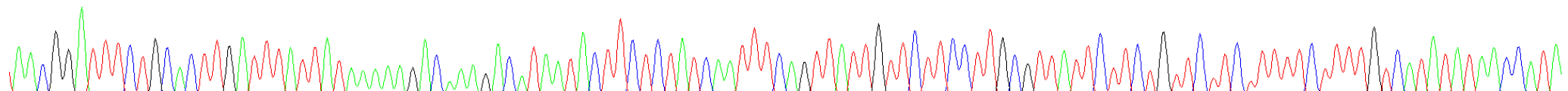
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
AGAC TTG G C T C A C G C G G T G G C G G C C G C T C T A G A A C T A G T G G A T C C C C C G G G C T G C A G G A A T T C G A T T C C A A C T G G C A C C G C T G G C T T G A A C A A C A A T A C C A G C C T T C C A A C T T C T G T A A



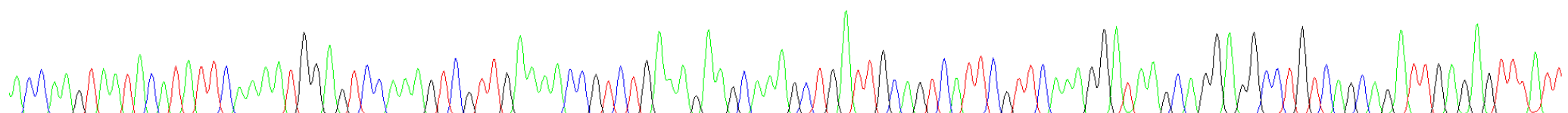
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730
CTGTTCTCTTCTGACTTTGACTCCCTCAAAAAAAAAAATCTACAATCAACAGATCGCTTCAATTACGCCCTCACAAAAACTTTTTTTCCTTCTTTCGCCACGTTAAATTTTATCCCTCATGTTGTCT



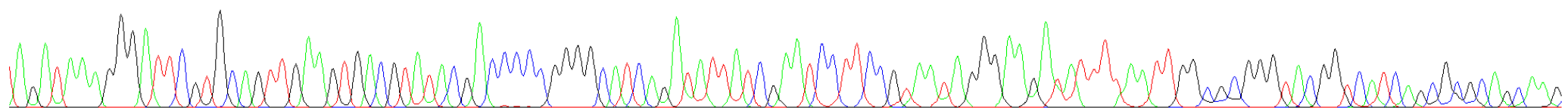
740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
AACGGATTTCTGCACTTGATTTATTATAAAAAACAAAAGACATAATACTTCTCTATCAATTTTCAAGTTATTGTTCTTCCCTTGCCTATTCTTCTGTTCTTCTTTTTCTTTTGTTCATATATAACCATA



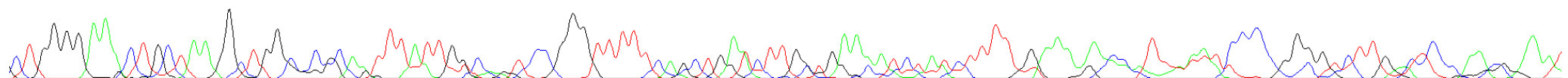
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
ACCAAATAATACATATTTCAAATGGAGTCCAAAGTCGTTGAAAACCGTCTGAAAGAAACAAAGCTGATTGCAGTCATTCTGTTCAAAGGATAAGCAAGGAGCCCTGTCAAGCAGATTGAGATTTATT



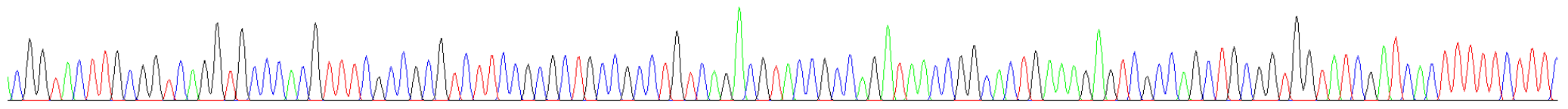
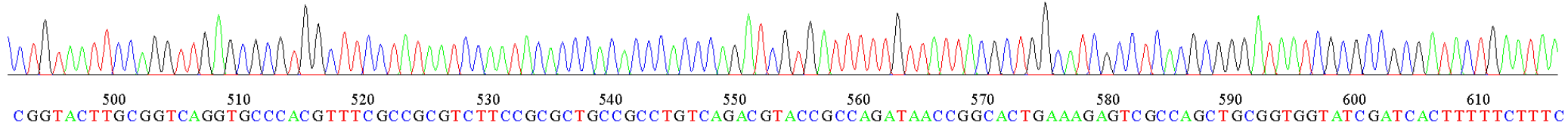
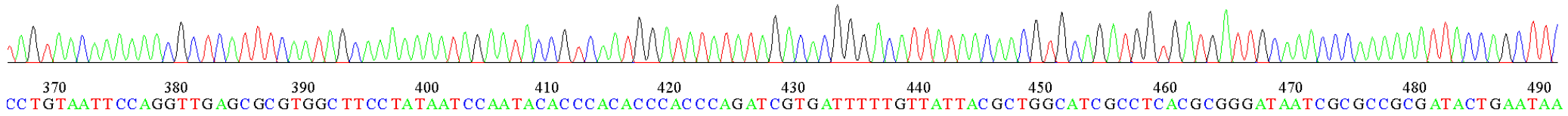
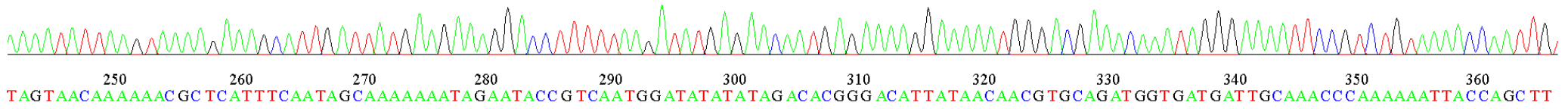
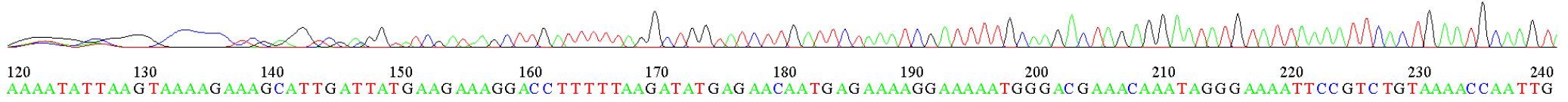
990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
AGATAAAGGGATTTCGTGCAGTTGAAGTGACGTATACGACCCCGGGGCATCAGATATTATCGAATCCTTCCGTAATAAGGAAAGATATTTAATTGGCGCGGGTACGGTCATCAGCGCGCAGCAAAG



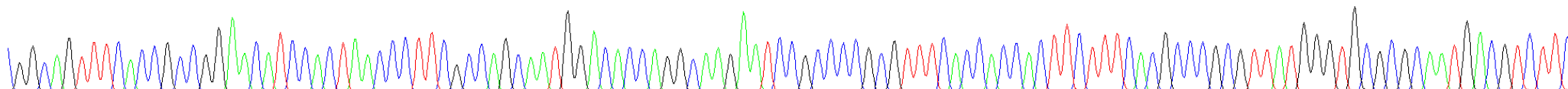
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
CTGGGGAAACTGCTAAAGCTGGCCCGCAATTTATTGTCAATCCGGGTTTTTTCAGCTGAACTTGCTGAACATCTATCTTTTGGAAAGACAATTTATATCCCGCGCGTCTTGACTCCAAAGGA



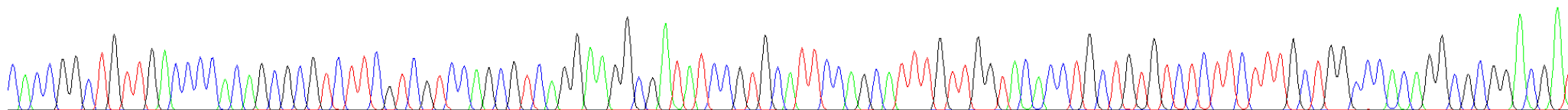
A GTG CAG G T C GCC TCG A G TCGAGG TATCGATAAGCTT GATTTTTAGGCTGGTATCTTGATTC TAAATCGATTTTGCAAGACTAGAGGAATATGTA TTTAAAATTCAC TGAATGCAAG T



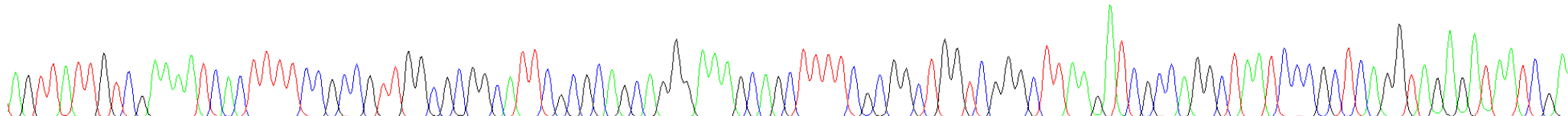
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GGCAGTTTCACCGCCGGAACATCCACTAACCC TTCGCCAGCAATGGACACCAGGCAAGAATCCGCCCCGCGTTTCACCACCACCTTC TTTACGCCCGCGTTATGGGTGC GC GCAATGACGTCTTC



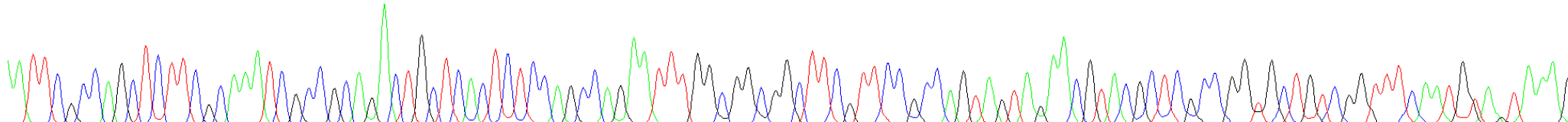
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
CACCGGCTGTTGACCCCAACAGCGCGTCTTCGTCTCCAGCGTCCAGGAAAGGCATATCCGTGCATTCCAGCATTTGTTGGTACACCTGCTGTGTCTCTTCTTTGCTGGCCCAACAGGC GC GGACGAT



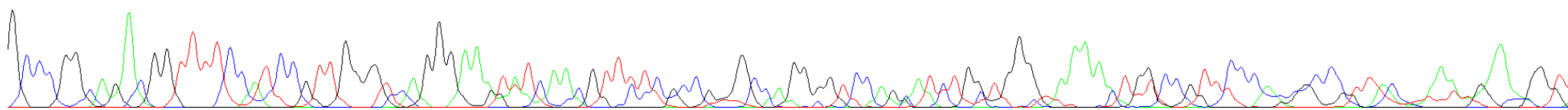
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
AGTTATTGTCGAAAATC ACTTTTCCGCCGTTGGCGCGGCATTTCGCAGCAGGAAAGCAGCTTTTTCGC GGCTGGTTCGGGCTTAA GATCGCCAGGCTAATCCC GCTCAGGTAGAGATAATCGAA



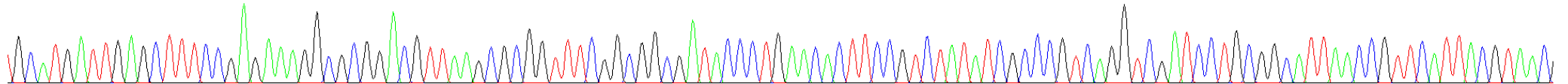
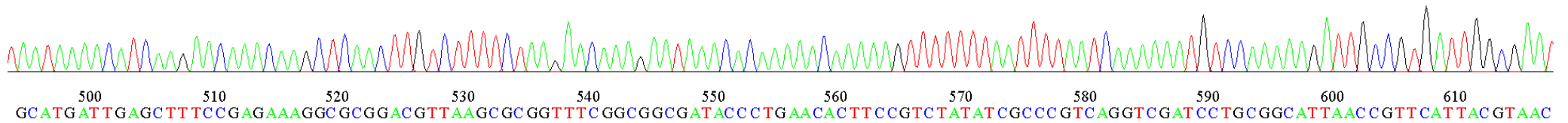
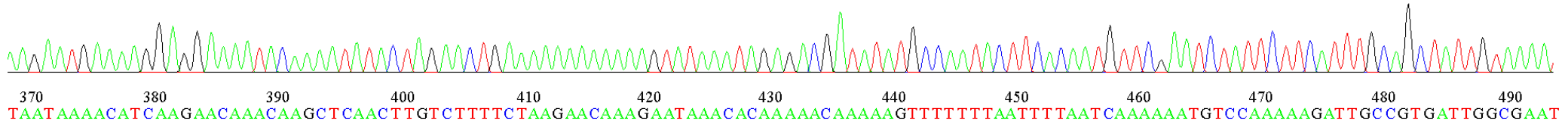
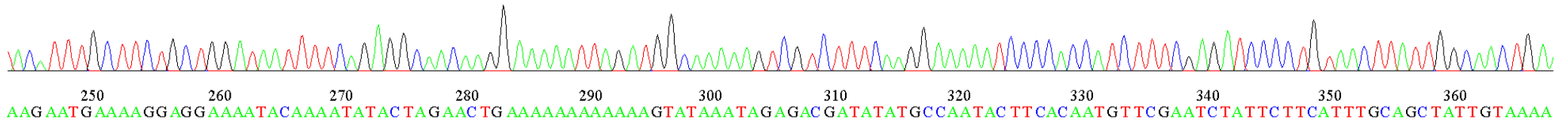
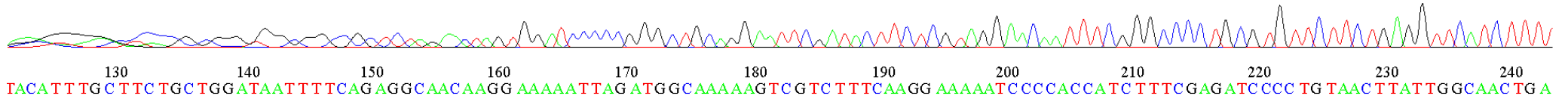
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110
ATTGCCAGCTCTTCGCAATCGCCGCAGACTGCTCACTCTCCAGCCAGAATTTGGCGGC GGCTTTCGTTCCGCCAGTAGTAGAACGTACGCTCGCCGGTGCTGTCTGGTTTCAATGTAGTAAAG



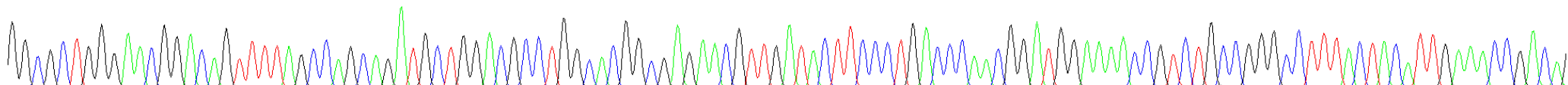
1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230
GCCCGGCGAGC GGTTTTCCATCCGTTGGGTCA GGGAAATATCAACGTTCTCGCCGTGCCAGGGTCCAGCATCTGGTGGGTAAA ACTGGCCGTTCCCA CCGCCCTTACCTTATTGACGGTT



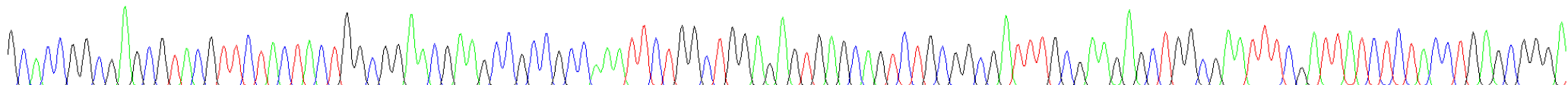
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
G ACC T GGC AC TCA C G CG G TG GCG GCC GC TCTAG AACTAG TGG ATCCCCCG GG CTGCAGG AATTCG ATACTTC TCG TAGG AACAAT TTCG GGCCCC TGC GTG TTC TTC TG AGG TTC ATC TTT



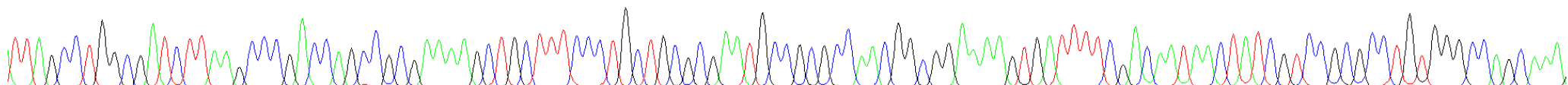
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GGCGCTGGG AACGGACAGTTT TAGCCAGCAGATGCTGGACGCC TGGCACGGCGAGAACGTTGATACTTCCCTGACCCAACGGATGGAAAACCGTCTGCCGGGCCTTTACTACATTGAAACCGACA



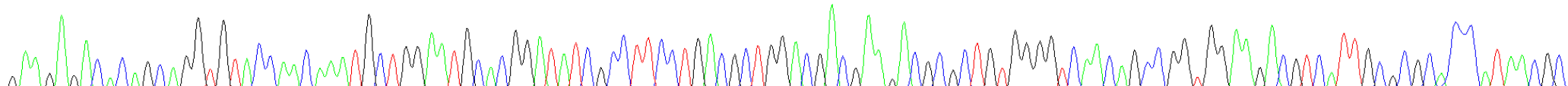
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
GCACCGGCAGCGTACGTTCTACTACTGGCGGAACGAAGCCGCCGCCAAATTCTGGCTGGAGAGTGAGCAGTCTGCGGC GATTTGCGAAGAGCTGGC GAATTTCTGATTATCTCTACCTGAGCGGGA



870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
TTAGCCTGGCGATCTTAAGCCCGACCAGCCGC GAAAAGCTGCTTTCCCTGCTGCGCAATGCCGCGCCAACGGCGAAAAAGTGATTTTCGACAATAACTATC GTCCGCGCCTGTGGGCCAGC AAA



1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
GAAAGAGACACAGCAGGTGTACCAACAAATGCTGGAAATGCACGGATATCGCCTT CCTGACGCTGGACGACGAAAGACGC GCTGTGGGGTCAACA GCCGGTGGAAAGACGTCATTGCGCGCAC CAT AACGC



1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
GGGCGTGAAGAA GTGGTGGTGAACGC GGGGCGGATTCTTGCCTGGTGC CATTGCTGGCGAAGGGTTAATGGATGTTCCGGCGG TGA AACTGCCGAAAGAAAATGATCGATACCACCGGAGCTG

