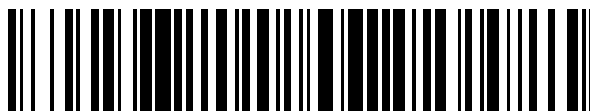


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 805**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12M 1/113 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12M 1/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010 E 10726601 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2435483**

54 Título: **Producción fotocatalítica de hidrógeno en cianobacterias**

30 Prioridad:

26.05.2009 US 213289 P

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

30.12.2014

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
P.O. Box 39296
61392 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**NELSON, NATHAN;
YACOBY, IFTACH;
GAZIT, EHUD y
BENHAR, ITAI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 525 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción fotocatalítica de hidrógeno en cianobacterias

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la generación de hidrógeno en cianobacterias y a polinucleótidos aislados para lo mismo.

10 El desarrollo de un aporte energético limpio, económicamente viable y sostenible, para el futuro es uno de los retos más urgentes de nuestra generación. Se espera que la producción de petróleo aumente en un futuro próximo y que las reservas de petróleo económicamente viables se agoten en gran medida en el 2050. Un ahorro de hidrógeno requiere formas limpias, económicas y sostenibles para generar hidrógeno. La producción actual de hidrógeno depende casi por completo del uso de fuentes no renovables (es decir reformatión de vapor de gas natural, 15 gasificación de carbón y electrolisis de agua accionada por energía nuclear). Aunque inicialmente estas estrategias probablemente impulsan una transición hacia un ahorro de hidrógeno, el hidrógeno producido es más caro y contiene menos energía que la fuente de energía no renovable de la que procede. Además el uso de combustibles fósiles y de energía nuclear es insostenible. Por lo tanto, existe una clara necesidad de establecer medios de producción de hidrógeno que sean económicamente viables.

20 Dado que la fuente de energía principal es la energía solar, una opción particularmente deseable es la producción de hidrógeno usando maquinaria fotosintética. Los dos núcleos de la maquinaria fotosintética en plantas, algas y cianobacterias son los dos centros de reacción fotoquímicos conocidos como Fotosistema I (FSI) y Fotosistema II (FSII). El FSII impulsa la reacción más altamente oxidante que se sabe que se produce en la biología, la división del 25 agua en oxígeno, protones y electrones. El oxígeno se libera a la atmósfera y es el responsable de la conservación de la vida aerobia en la Tierra. Los electrones derivados pasan a lo largo de la cadena de transporte de electrones fotosintética desde el FSII mediante la Plastoquinona (PQ) al Citocromo b_{6f} (cit b_{6f}) y al Fotosistema I (FSI). A partir del FSI, la mayoría del potencial redox negativo se estabiliza en forma de ferredoxina (Fd) reducida que sirve como un donador de electrones para la enzima ferredoxin-NADP⁺-reductasa (FNR). En condiciones fisiológicas normales la Fd reduce el NADP⁺ a NADPH mediante el complejo Fd-FNR. En un proceso paralelo (fotofosforilación), los H⁺ se liberan en el lumen tilacoidal donde generan un gradiente de H⁺ que se usa para impulsar la producción de ATP mediante la ATP sintasa. Posteriormente, la NADPH y el ATP se usan para producir almidón y otras formas de biomasa de almacenamiento energético.

35 Algunas algas verdes y cianobacterias han desarrollado la capacidad de canalizar los protones y los electrones almacenados en el almidón en la producción de hidrógeno en condiciones anaerobias expresando una enzima hidrogenasa. [Wunschiers, Stangier et al. 2001, Curr Microbiol 42(5): 353-60; Happe y Kaminski 2002, Eur J Biochem 269(3): 1022-32]. La enzima hidrogenasa se localiza en el estroma del cloroplasto y obtiene electrones de la ferredoxina o flavodoxina que reduce el Fotosistema I y por tanto compite con la FNR por los electrones 40 generados por el FSI. Sin embargo, el oxígeno es un fuerte inhibidor de la enzima hidrogenasa y por tanto, la generación de hidrógeno en estos organismos es solo transitoria. El reto más importante en la producción de hidrógeno fotosintético es su separación espacial y/o temporal de la producción de oxígeno.

45 Intentos realizados para generar hidrogenasas de algas tolerantes al oxígeno no han tenido mucho éxito [Seibert et al. 2001, Strategies for improving oxygen tolerance of algal hydrogen production. Biohydrogen II. J. M. Miyake, T.; San Pietro, A., eds, Oxford, RU: Pergamon 67-77]. McTavish et al [J Bacteriol 177(14): 3960-4, 1995] han mostrado que la mutagénesis dirigida de la hidrogenasa de *Azotobacter vinelandii* puede hacer que la producción de hidrógeno sea insensible a la inhibición de oxígeno, pero con una pérdida sustancial (78 %) de la actividad de la evolución de hidrógeno.

50 Los cloroplastos de plantas y algas y las membranas de cianobacterias fotosintéticas contienen dos fotosistemas: el FSII que actúa como mediador en la transferencia de electrones a partir del agua (el donador inicial de electrones) al grupo de plastoquinona y el FSI que actúa como mediador en la transferencia de electrones de la plastocianina a la ferredoxina, generando de esta manera la energía reductora necesaria para la fijación del CO₂ en forma de NADPH. Aunque ahora se sabe que el FSII es sensible a fotolesión, se considera que el FSI es más estable que el FSII. Por lo tanto, es concebible que la prevención del ensamblaje del FSII debería dar como resultado su rápida inactivación a la luz del sol y el cese de la disociación del agua (y de la generación de oxígeno). Melis (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2001/005343) explica un proceso en el que la inhibición de la actividad hidrogenasa se elevaba separando temporalmente la reacción de disociación de agua generadora de oxígeno, catalizada por el FSII, de la 55 producción de hidrógeno sensible a oxígeno catalizada por la Hidrogenasa (HidA) de los cloroplastos. Esta separación se realizó cultivando primero algas verdes en presencia de azufre para construir reservas de un sustrato endógeno y después en ausencia de azufre. La eliminación del azufre da como resultado la inactivación del Fotosistema II de tal manera que la respiración celular conduce a anaerobiosis, a la inducción de hidrogenasa y a una evolución de hidrógeno sostenida en la luz.

65 Sin embargo, el proceso de Melis está sujeto a limitaciones prácticas considerables. La tasa real de acumulación de

gas hidrógeno es como máximo del 15 al 20 % de la capacidad fotosintética de las células [Melis y Happe 2001, Plant Physiol. Nov; 127(3): 740-8] y sufre la limitación intrínseca de que la producción de hidrógeno por privación de azufre de las algas no puede continuar indefinidamente. El rendimiento comienza a nivelarse y disminuye después de aproximadamente 40-70 horas de privación de azufre. Después de aproximadamente 100 horas de privación de azufre la algas necesitan volver a una fase de fotosíntesis normal para restablecer los sustratos endógenos.

La Publicación Internacional Nº WO 03/067213 describe un proceso para la producción de hidrógeno usando *Chlamydomonas reinhardtii* en el cual las algas se han modificado genéticamente para regular negativamente la expresión de una sulfato permeasa, CrpSulP, a través de la inserción de una secuencia antisentido. Se dice que esto hace que las técnicas de privación de azufre de la técnica anterior sean obsoletas, dado que obvia la necesidad de eliminar físicamente los nutrientes de azufre del medio de crecimiento para inducir la producción de hidrógeno. La captación de azufre reducida por las células usando esa técnica no sólo da como resultado una disminución sustancial de los niveles de las principales proteínas de los cloroplastos, tales como Rubisco, D1 y LHCII, sino que también priva a la célula de azufre para su uso en la biosíntesis de otras proteínas.

Ihara et al (Ihara, Nakamoto et al. 2006; Ihara, Nishihara et al. 2006) muestran una proteína de fusión que comprende una hidrogenasa [NiFe] unida a membrana (de la β -proteobacteria *Ralstonia eutropha* H16) y la subunidad periférica del FSI, la PsaE de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* como un sistema de conversión directa de luz a hidrógeno. El complejo hidrogenasa aislada-FSI aislado presentó una producción de hidrógeno accionada por la luz a una tasa de [0,58 μ mol de H₂]/[mg de clorofila] h *in vitro*. Se piensa que la ineficacia de este sistema deriva de la mala capacidad de la hidrogenasa para aceptar electrones en comparación con la capacidad del FSI para donar electrones.

Peters et al [Science, 282, 4 Dec, 1998] muestran el aislamiento de una hidrogenasa solo de Fe de *Clostridium pasteurianum* que naturalmente comprende estructuras similares a la ferredoxina. Aunque esta hidrogenasa es posiblemente capaz de generar directamente hidrógeno en condiciones iluminadas, aún está inhibida por el oxígeno.

Existe por tanto una necesidad ampliamente reconocida para, y sería muy ventajoso tener, un proceso sostenible y eficaz para la producción fotosintética de hidrógeno que no tuviese las limitaciones anteriores.

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una célula cianobacteriana que comprende una proteína de fusión de la subunidad IX del centro de reacción del Fotosistema I (PsaJ) y un precursor de la subunidad III del centro de reacción del Fotosistema I (PsaF), en el que dicho PsaF está truncado por al menos diez aminoácidos en su extremo N y en el que dicho complejo FSI acepta electrones de al menos un citocromo respiratorio, comprendiendo la célula adicionalmente una enzima hidrogenasa unida a una ferredoxina heteróloga.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula es termófila.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión es al menos 80 % idéntica a la expuesta en la SEC ID Nº: 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la secuencia de aminoácidos de dicha fusión es como se expone en la SEC ID Nº: 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la secuencia de aminoácidos de dicha subunidad PsaF se expone en la SEC ID Nº: 14.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión se inserta en el genoma de la célula.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula produce hidrógeno a una temperatura por encima de aproximadamente 55 °C.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido como se expone en la SEC ID Nº: 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polinucleótido aislado es como se expone en la SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 6.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el al menos un citocromo respiratorio es el citocromo C o el citocromo M.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proteína de fusión es una proteína recombinante.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la secuencia como se expone en la SEC ID N°: 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 1.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención se proporciona un biorreactor para la producción de hidrógeno que comprende:

- (i) una tubería que comprende las células de la presente invención, en el que una primera selección de dicha tubería se coloca en un primer depósito que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C y una segunda sección de dicha tubería que se coloca en un segundo depósito que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 30-50 °C;
- (ii) una bomba de recirculación configurada de tal manera que dichas células circulan a través de dicha tubería.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, se proporciona un método que comprende cultivar la célula cianobacteriana de la presente invención en condiciones que generen gas hidrógeno en la célula cianobacteriana produciendo de este modo gas hidrógeno.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos científicos y/o técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque los métodos y los materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la realización práctica o ensayo de las realizaciones de la invención, más adelante se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, se controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En el presente documento se describe la invención, solo como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, cabe destacar que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y solo con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención y se presentan para proporcionar lo que se considera que es lo más útil y fácil de entender de la descripción de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intentan mostrar detalles estructurales de la invención con más detalles de los necesarios para un entendimiento fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos pone de manifiesto, para los expertos en la técnica, como pueden llevarse a la práctica las diversas formas de la invención.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-B son diagramas esquemáticos que ilustran el proceso global de la producción de hidrógeno dependiente de luz en cianobacterias. La Figura 1A muestra el proceso global asociado a membrana que inicia el FSII (fotosistema II). Al inicio, el FSII disocia el agua en oxígeno, protones y electrones. Los electrones generados se transfieren al grupo PQ (plastoquinona) desde el cual la mayoría de los electrones se transfieren al FSI. Sin embargo, una pequeña parte puede transferirse a la hidrogenasa cianobacteriana nativa y el complejo IV también puede respirar algo. En el FSI (fotosistema I), los electrones entrantes se recargan con energía fotónica. A continuación, los electrones cargados se transfieren a la Fd (ferredoxina) que los transporta a la FNR (Ferredoxina NADPH reductasa) usando los electrones y protones para producir NADPH. La NADPH es un bloque de construcción básico para la asimilación del dióxido de carbono en azúcares, inicialmente en forma de glucosa y finalmente en forma de glucógeno superior. La Figura 1B muestra una vista esquemática de una célula cianobacteriana mostrando los compartimentos intracelulares de la membrana en los que se realiza la fotosíntesis.

Las FIG. 2A-B son una representación esquemática de un sistema para producir hidrógeno de acuerdo con una realización de la presente invención. Figura 2A: siempre y cuando el sistema se mantenga a baja temperatura (30-50 °C), el proceso fotosintético natural se produce como se describe en la Figura 1. Figura 2B: el paso a una temperatura elevada (60-70 °C), produce un FSII termosensible que detiene el funcionamiento. Esto viene acompañado por la transformación de la célula en una fase anaerobia en la que puede expresarse la quimera Fd-hidrogenasa. Una combinación de transferencia de electrones elevada al FSI, como se describe en el presente documento y la interferencia con la donación/aceptación de electrones naturales de la Fd conduce a un transporte de electrones global desviado a la quimera Fd-hidrogenasa dando como resultado una elevación global de la producción de hidrógeno.

Las FIG. 3A-C son modelos de las cianobacterias y virus que codifican el FSI y consecuencias estructurales para el sitio de unión al donante de electrones. Figura 3A: FSI cianobacteriano compuesto por las subunidades codificadas por el operón viral. PsaF (magenta), PsaJ (azul). Figura 3B: El FSI viral está compuesto por las

mismas subunidades que las de la Figura 3A excepto que PsaF y PsaJ se sustituyeron por la proteína de fusión PsaJF (rojo). Figura 3C: superposición de los dos modelos mostrando la pérdida del extremo N de la PsaF y el bucle en PsaA en las subunidades virales en relación con P700. El bucle corto viral en la PsaA está en color rojo y el bucle extendido en la PsaA cianobacteriana está en color gris. Las proteínas de fusión PsaJF virales están

5 en color magenta, la PsaJ cianobacteriana está en color azul y la PsaF en color amarillo.
La FIG. 4 es una representación esquemática de los principales elementos del biorreactor de hidrógeno de acuerdo con una realización de la presente invención. Varios miles de tubos circulares de aproximadamente 2 mm de diámetro (uno de ellos se muestra en color cian) se colocarán en una instalación que contiene cuatro

10 cámaras. El cultivo de cianobacterias termófilas sensibles a temperatura circulará en la dirección mostrada por la flecha. En la cámara con la temperatura permisiva de 30-50 °C, las cianobacterias fijarán el CO₂ en materia orgánica produciendo oxígeno como un producto secundario. El flujo llevará al cultivo a la cámara de aclimatación de 70 °C donde el FSII se inactivará. En este momento, el cultivo se transportará a la cámara anaerobia de 60-70 °C donde la materia orgánica se convertirá fotosintéticamente en hidrógeno. Después, el flujo

15 llevará el cultivo a la cámara de aclimatación de 30-50 °C (opcional) para reactivar el FSII. Finalmente, retornará a la cámara de producción de materia orgánica. El caudal de las diversas cámaras transparentes se modificará para maximizar la producción de hidrógeno.

Las FIG. 5A-C son representaciones esquemáticas y fotografías que ilustran la expresión y purificación de un FSI mutante de *Synechocystis* sp. PCC 6803: Figura 5A. Representación del orden del gen nativo y mutante en el

20 genoma de *Synechocystis*. La proteína de fusión JF está bajo el control del promotor de PsaF (cuadro negro) e incluye toda la proteína PsaJ (40aa) y los últimos 121 aminoácidos de PsaF. El gen de resistencia a Kan se usó para seleccionar sucesos de transformación, que se confirmaron usando PCR. Figura 5B. Gradientes de sacarosa del FSI nativo y mutante mostrando que, en la cepa mutante, el FSI está en su forma trimérica. Figura

25 5C. SDS PAGE de la composición subunitaria del FSI de tipo silvestre y mutante como aparece en las fracciones triméricas recogidas del gradiente de glucosa. El peso molecular esperado de la proteína de fusión es de 14 Kda.

La FIGURA 6 es una fotografía de los cristales del FSI de PsaJF mutante.

La FIGURA 7 es un gráfico que ilustra cinéticas de oxidación aceleradas del citocromo c por un FSI que contiene la fusión JF. La oxidación del citocromo c (de corazón de caballo) se realizó después usando la diferencia de

30 absorbancia entre las longitudes de onda de 550 nm y 540 nm en un espectrofotómetro de longitud de onda dual. La solución de 1 ml consistía en Bis-Tris 10 mM pH 7, FSI de tipo silvestre que contenía clorofila 40 µg o FSI mutante fusión JF que contenía 22 µg de clorofila, citocromo c 2 nmoles y acrobat 10 nmoles. Los cambios de absorbancia inducidos por luz se registraron a 550-540 nm.

La FIGURA 8 es una representación esquemática de un biorreactor de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 La FIGURA 9 es una representación esquemática que ilustra la expresión de un FSI mutante de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

40 La presente invención se refiere a la generación de hidrógeno en cianobacterias y a polinucleótidos aislados para generar lo mismo.

45 Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la aplicación de la invención no se limita necesariamente a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras.

50 El hidrógeno molecular es un candidato para reemplazar o suplementar combustibles fósiles como una fuente de energía limpia. La producción biológica natural de hidrógeno se basa en la presencia de enzimas hidrogenasas presentes en determinadas algas verdes y en bacterias fotosintéticas que pueden aceptar electrones del fotosistema I (FSI) y su conversión en gas hidrógeno. El rendimiento de hidrógeno molecular a partir de este proceso está limitado por diversas razones, siendo una de ellas que el FSI solo puede aceptar electrones de la plastoquinona.

55 Los autores de la presente invención supusieron que el rendimiento de hidrógeno podría aumentarse si los organismos fotosintéticos estuviesen dotados de un FSI que tuviese la posibilidad de aceptar electrones de otras fuentes.

60 En un reciente estudio, se configuraron las posibles consecuencias estructurales de proteínas de ensamblaje codificadas por fagos en un complejo de FSI cianobacteriano en relación con la estructura del FSI de 2,5 Å de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus*. La proteína de fusión PsaJF viral (en la que el extremo C de PsaJ está fusionado con el extremo N de PsaF) en la posición 210 de la subunidad F del FSI, se configuró usando el programa COOT. El análisis mostró que la proteína de fusión PsaJF viral se ajustaba perfectamente en la posición de las subunidades J y F en la estructura FSI. El único cambio notable que se observó fue la ausencia del extremo N de la subunidad F, que es responsable de la unión específica del donante de electrones natural (plastocianina) del FSI (Nelson, N. y Yocum, C. Structure and function of photosystems I and II. Annu Rev Plant Biol 57, 521-565 (2006); Amunts, A., Drory, O. & Nelson, N. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. Nature 447, 58-63 (2007). En los cloroplastos de algas verdes y plantas, esta parte de subunidad F se prolonga,

dando como resultado una mayor afinidad de la plastocianina por el FSI del cloroplasto (Hippler, M., Drepper, F., Farah, J. y Rochaix, J.D. Fast electron transfer from cytochrome c6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* requires PsaF. *Biochemistry* 36, 6343-6349 (1997)). Aunque tanto la plastocianina como el citocromo c6 pueden donar electrones al FSI en *Chlamydomonas reinhardtii*, en plantas superiores este sitio es específico para la plastocianina. Sin embargo, la donación de electrones al FSI en cianobacterias no es del todo promiscua, y diversos citocromos solubles, incluyendo el citocromo c respiratorio, no pueden donar electrones al FSI (Kerfeld, C. A. y Krogmann, D. W. Photosynthetic cytochromes c in cyanobacteria, algae and plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 470 397-425 (1998)).

Por lo tanto, los autores de la presente invención sugieren que el reemplazo de PsaJ y PsaF con la proteína de fusión PsaJF viral permitiría la donación de electrones a través de transportadores de electrones adicionales, incluyendo citocromos que normalmente actúan como donadores de electrones a la citocromo oxidasa.

Los dos núcleos de la maquinaria fotosintética en plantas, algas y cianobacterias son los dos centros de reacción fotoquímicos conocidos como Fotosistema I (FSI) y Fotosistema II (FSII). Dado que el FSI puede producir hidrógeno y que el FSII produce oxígeno, otro reto importante en la producción de hidrógeno fotosintético es su separación espacial y/o temporal de la producción de hidrógeno. Los autores de la presente invención proponen una solución holística al obstáculo anterior usando cianobacterias termófilas que están modificadas por ingeniería genética para separar los dos sistemas para la producción de hidrógeno.

Por consiguiente, los autores de la presente invención también proponen modificar por ingeniería genética las cianobacterias de tal manera que el Fotosistema II (FSII) se vuelva sensible a la temperatura (es decir que, no funcione en la temperatura no permisiva de 60 °C, pero que funcione a temperaturas permisivas de aproximadamente 50 °C).

Por tanto, en las temperaturas no permisivas cuando FSII se deshabilite (y se inhiba la producción de oxígeno) los citocromos donarán los electrones al FSI y el hidrógeno se producirá sin obstáculos por los efectos debilitantes del oxígeno en la hidrogenasa. Estos periodos se alternarán con los periodos de temperatura permisiva en los que se producirá la recuperación del FSI y continuará el crecimiento y la propagación regular de las cianobacterias.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una célula cianobacteriana que comprende un complejo FSI que acepta electrones de al menos un citocromo respiratorio.

La expresión "célula cianobacteriana" se refiere a una célula bacteriana que obtiene su energía a través de la fotosíntesis.

De acuerdo con una realización, la cianobacteria es termófila, por ejemplo, *Synechococcus elongatus* o *Mastigocladus laminosus*.

El FSI es un complejo de proteína-clorofila, presente en plantas verdes y en cianobacterias, que forma parte de la maquinaria fotosintética dentro de la membrana tilacoidal. Tiene forma de elipse y mide aproximadamente de 9 a 15 nanómetros. El complejo FSI comprende típicamente moléculas de clorofila que sirven como una antena que absorbe fotones y transfiere la energía fotónica al P700, donde esta energía se captura y se utiliza para activar reacciones fotoquímicas. Además de las clorofilas del P700 y de la antena, el complejo FSI contiene diversos aceptores de electrones. Un electrón liberado de P700 se transfiere a un aceptor terminal en el extremo reductor de FSI a través de aceptores intermedios y el electrón se transporta a través de la membrana tilacoidal.

Típicamente el FSI acepta electrones de citocromos o plastocianina especializados. La presente invención contempla la modificación del FSI de tal manera que es capaz de aceptar electrones de fuentes adicionales tales como citocromos respiratorios.

Como se usa en el presente documento, la frase "citocromos respiratorios" se refiere a citocromos solubles de la cadena de transporte de electrones respiratoria, tales como el citocromo c y el citocromo M (CitcM; Bernroither M, et al., (2009) *Biochim Biophys Acta*. 1787, 135-143).

De acuerdo con una realización, las subunidades PsaJ y PsaF de FSI se modifican para generar una subunidad de fusión PsaJF que permite que el FSI se vuelva promiscuo y acepte electrones de donantes de citocromos respiratorios conservando al mismo tiempo la capacidad del FSI para donar los electrones a la ferredoxina.

El término "PsaJ" se refiere a una subunidad (IX) del complejo proteína-clorofila del fotosistema I (FSI), presente en plantas verdes y en cianobacterias, que forma parte de la maquinaria fotosintética dentro de la membrana tilacoidal.

En la siguiente Tabla 1 del presente documento se proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de PsaJ.

Tabla 1

Número de acceso	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Organismo	Longitud
NP_441427 (N_000911.1)	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	40
B0LNU9	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene sordida</i>	44
B0LNS9	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene cryptoneura</i>	44
P0A429	Subunidad IX del centro de reacción Fotosistema I	psaJ tsr2412	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (cepa BP-1)	41
B0LNI1	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene zawadskii</i> (colleja de Zawadskii)	44
B0LP54	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene atocioides</i>	44
B0LND2	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene littorea</i>	44
B0LNIJ2	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene sorensenis</i>	44
B0LNQ7	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene latifolia</i> (colleja Blanca) (colleja de Ampolla)	44
B0LNE0	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene uniflora</i>	44
B0LP33	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene aegyptiaca</i>	44
B0LNZ4	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene pseudoatocion</i>	44
B0LN84	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Lychnis chalconica</i> (lychnis Escarlata) (cruz Maltesa)	44
B0LNX0	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene fruticosa</i>	44
B0LP12	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene schafta</i>	42
B0LNL5	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene integripetala</i>	42
B0LNP3	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene conica</i> (atrapamoscas de maíz rallado)	44
B0LNA0	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Silene samia</i>	44
C3KEK5	Subunidad IX del centro de reacción FSI	psaJ	<i>Ceratophyllum demersum</i> (hepática Rígida) (Cola de zorro)	44

En la SEC ID N°: 3 se expone una secuencia de aminoácidos ejemplar de PsaJ.

5 El término "PsaF" se refiere a una subunidad (III) del FSI. En su forma no modificada, PsaF es una proteína de acoplamiento a la plastocianina que contribuye a la asociación específica de la plastocianina con el FSI.

En la SEC ID N°: 4 se expone una secuencia de aminoácidos ejemplar de PsaF.

10 En la siguiente Tabla 2 del presente documento se proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de PsaF.

Tabla 2

Número de acceso	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Organismo	Longitud
P29256	Subunidad III del centro de reacción Fotosistema I	psaF	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	165

Número de acceso	Nombre de la proteína	Nombre del gen	Organismo	Longitud
P0A401	Subunidad III del centro de reacción Fotosistema I	psaF tlr2411	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (cepa BP-1)	164

De acuerdo con una realización, la subunidad PsaF se modifica (por ejemplo, se trunca) en el extremo N de tal manera que reduce la afinidad de la plastocianina por el FSI del cloroplasto. Los truncamientos contemplados incluyen la eliminación de los diez primeros aminoácidos, más preferentemente los 20 primeros aminoácidos, más preferentemente los 30 primeros aminoácidos, más preferentemente los 40 primeros aminoácidos e incluso más preferentemente los 43 primeros aminoácidos. En la SEC ID N°: 14 se expone una secuencia de aminoácidos ejemplar de una subunidad PsaF modificada.

De acuerdo con una realización específica, la subunidad PsaF truncada se une a la subunidad PsaJ para formar una proteína de fusión de una manera similar a la encontrada en cianófagos.

La unión puede realizarse mediante un péptido enlazador o directamente.

Por tanto, la presente invención contempla células cianobacterianas que comprenden proteínas de fusión PsaJF que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la expuesta en la SEC ID N°: 1.

Un porcentaje de identidad de una proteína de fusión de esta realización de la presente invención con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1, puede determinarse de cualquiera de las diversas maneras. Preferentemente, el porcentaje de identidad entre polipéptidos se determina usando el programa informático BLAST [blastp] proteína-proteína convencional del NCBI.

El gen que codifica las proteínas PsaJF modificadas puede introducirse en la célula e insertarse por recombinación homóloga en PsaA o PsaB o en cualquier otra localización en el genoma cianobacteriano. Para hacer esto, típicamente en cada lado de la región codificante de PsaJF se añaden cien pares de bases adicionales que son complementarios a los del genoma cianobacteriano. Por lo tanto, una secuencia de polinucleótidos, por ejemplo, como se expone en la SEC ID N°: 6, puede introducirse en la célula de tal manera que se inserte en genoma cianobacteriano por recombinación homóloga. De manera alternativa o adicional, las subunidades nativas tales como PsaJ y PsaF pueden modificarse por ingeniería genética de acuerdo con el virus (es decir, pueden modificarse por ingeniería genética para expresar una proteína de fusión) y sustituirse por las subunidades originales usando técnicas recombinantes.

Dichas técnicas recombinantes las describen Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310: 511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463.

Para producir polipéptidos de la presente invención usando tecnología recombinante, un polinucleótido que codifica los polipéptidos de la presente invención se liga en un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia de polinucleótidos bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, una secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica de tejido, o inducible de los polipéptidos de la presente invención en las células hospedadoras.

Una secuencia promotora contemplada que puede usarse en las construcciones de ácido nucleico de la presente invención es el promotor de PsaF que comprende la secuencia de ácidos nucleicos como se expone en la SEC ID N°: 5.

Por tanto, la presente invención contempla polinucleótidos aislados que codifican la proteína de fusión de la presente invención.

La frase "un polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenario que está aislada y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótidos complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótidos genómica y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (por ejemplo, una combinación de lo anterior).

Como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos complementaria" se refiere a una secuencia, que se produce como resultado de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Dicha secuencia puede *amplificarse* posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa dependiente de ADN.

Como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos genómico" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y por tanto representa una parte contigua de un cromosoma.

5 Como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas necesarias para codificar el polipéptido de la presente invención así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre ambas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes y típicamente incluirán secuencias de señal de corte y empalme conservadas. Dichas secuencias intrónicas pueden incluir adicionalmente elemento reguladores de expresión que actúan en cis.

En la SEC ID N°: 2 se expone una secuencia de ácido nucleico ejemplar de los polinucleótidos de la presente invención.

15 Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. El vector de expresión de la presente invención puede incluir secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariontes, eucariotes o preferentemente en ambos (por ejemplo, vectores lanzadera). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de inicio de la transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

25 Como sistemas de expresión en hospedadores para expresar los polipéptidos de la presente invención puede usarse una diversidad de células procariontes o eucariotes. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión recombinante de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contiene la secuencia que codifica el polipéptido; levaduras transformadas con vectores de expresión recombinantes de levadura que contienen la secuencia que codifica el polipéptido; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes, tales como el plásmido Ti que contiene la secuencia que codifica el polipéptido.

30 De acuerdo con una realización de este aspecto de la presente invención, los polinucleótidos de la presente invención se expresan directamente en las cianobacterias.

35 De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, los polinucleótidos de la presente invención se expresan en sistemas celulares heterólogos.

40 Se apreciará que la construcción de expresión de la presente invención también puede incluir otras secuencias modificadas por ingeniería genética distintas que contengan los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificada insertada (que codifica el polipéptido) para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado, siendo particularmente relevante cuando se expresa en un sistema heterólogo.

45 Para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema de la célula hospedadora pueden usarse diversos métodos. Dichos métodos se describen en líneas generales en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véanse las Patentes de Estados Unidos Nos 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positivos-negativos.

55 Las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permiten la expresión de cantidades elevadas del polipéptido recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitación, medios, biorreactores, temperatura, pH y condiciones de oxígeno eficaces que permitan la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que una célula se cultiva para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. Dicho medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. Las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación, matraces agitadores, tubos de ensayo, placas de microtitulación y de Petri convencionales. El cultivo puede realizarse a una temperatura, a un pH y a un contenido de oxígeno apropiado para una célula recombinante. Además, las células de la presente invención pueden cultivarse en condiciones de campo, tales como estanques abiertos, cubiertos, bolsas de plástico (véase, por ejemplo, "A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae, julio de 1998, U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, incorporado en este documento por referencia). Un experto habitual en la técnica conoce dichas condiciones de cultivo.

Se apreciará que, para estudiar las propiedades del polipéptido puede desearse su aislamiento (y opcionalmente su cristalización). Por tanto, después de un tiempo en cultivo predeterminado, se efectúa la recuperación del polipéptido recombinante.

5 La frase “recuperación del polipéptido recombinante”, como se usa en el presente documento, se refiere a recoger todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no implica que sea necesario realizar etapas de separación o purificación adicionales.

10 Por tanto, los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse usando diversas técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero sin limitación, desalinización (tal como en precipitación con sulfato de amonio), cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

15 Para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente invención y el resto escindible fusionado. Dicha proteína de fusión puede diseñarse de tal manera que el polipéptido pueda aislarse fácilmente por cromatografía de afinidad, por ejemplo, por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. Cuando un sitio de escisión se modifica por ingeniería genética entre el polipéptido y el resto escindible, el polipéptido puede liberarse de la columna
20 cromatográfica por tratamiento con una enzima apropiada o con un agente que escinda específicamente la proteína de fusión en este sitio [véase, por ejemplo, Booth et al., Immunol. Lett. 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., J. Biol. Chem. 265: 15854-15859 (1990)].

25 El polipéptido de la presente invención puede recuperarse en forma “sustancialmente pura”.

Como se usa en el presente documento, la frase “sustancialmente pura” se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en el presente documento.

30 Las células cianobacterianas de la presente invención pueden modificarse de otras maneras para potenciar la producción de hidrógeno.

Por tanto, de acuerdo con una realización, las células cianobacterianas se modifican genéticamente para expresar un fotosistema II sensible a temperatura. De esta manera, la producción de hidrógeno fotosintético puede separarse temporalmente de la producción de oxígeno. De acuerdo con una realización, el Fotosistema II (FSII) se modifica de
35 tal manera que no funcione en la temperatura no permisiva de aproximadamente 60 °C, pero funcione a temperaturas permisivas de aproximadamente 50 °C.

Se contemplan polipéptidos que pueden modificarse en el sistema FSII que incluyen, pero sin limitación, D1, D2, PsbO o CP43. En *Physiologia Plantarum*, volumen 49, tema 2, páginas 135 -140, 28 de abril de 2006, se desvelan dos mutantes del fotosistema II sensibles a temperatura del guisante.

45 Las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse de acuerdo con la estructura disponible del FSII. Las subunidades modificadas pueden generarse por mutagénesis dirigida. El ADN resultante puede introducirse en el genoma cianobacteriano por técnicas conocidas, tales como recombinación homóloga o mediante una construcción de expresión.

Los sistemas que pueden utilizar dichos polipéptidos se describen adicionalmente más adelante en el presente documento.

50 Como se ha mencionado, las enzimas hidrogenasas presentes en cianobacterias pueden aceptar electrones del fotosistema I (FSI) y su conversión en gas hidrógeno. Una limitación de este proceso es que los transportadores de electrones endógenos donan sus electrones a destinatarios que no son hidrogenasas. Por ejemplo, los transportadores de electrones reducidos, tales como ferredoxina, también donan electrones a la enzima ferredoxin-NADP⁺-reductasa (FNR).

55 Para aumentar la producción de hidrógeno, los electrones pueden estimularse para transportarse hacia la hidrogenasa a expensas de procesos contrarios. La solicitud de Patente Internacional WO2009/013745 muestra nuevos polipéptidos de hidrogenasa que están unidos artificialmente a una ferredoxina heteróloga. En principio, dicho polipéptido impulsa el flujo de electrones desde un donador de electrones, tal como el fotosistema I (FSI),
60 directamente a la hidrogenasa a expensas de la FNR.

Por tanto, otra modificación contemplada de las células cianobacterianas de la presente invención es la expresión de proteínas de fusión Ferredoxina-hidrogenasa modificadas por ingeniería genética, como se describe en la solicitud de Patente Internacional WO2009/013745, para reforzar adicionalmente la capacidad del organismo modificado por ingeniería genética para producir hidrógeno.

65

Como se usa en el presente documento, la frase "enzima hidrogenasa" se refiere a una secuencia de aminoácidos de una enzima hidrogenasa que tienen la capacidad de catalizar la oxidación/reducción de hidrógeno. Por tanto la presente invención contempla hidrogenasas de longitud completa así como fragmentos activos de las mismas. De acuerdo con una realización, la enzima hidrogenasa es una hidrogenasa solo de Fe. De acuerdo con otra realización, la hidrogenasa es una hidrogenasa Ni-Fe. De acuerdo con otra realización adicional, la hidrogenasa es una hidrogenasa no metálica. Son enzimas hidrogenasas ejemplares que pueden usarse de acuerdo con la presente invención las clasificadas como EC 1.12.1.2, EC 1.12.1.3, EC 1.12.2.1, EC 1.12.7.2, EC 1.12.98.1, EC 1.12.99.6, EC 1.12.5.1, EC 1.12.98.2 y EC 1.12.98.3.

Como se usa en el presente documento, el término "ferrodoxina" se refiere a una secuencia de aminoácidos de la proteína con azufre e hierro que es capaz de mediar la transferencia de electrones a la hidrogenasa. Por tanto la presente invención contempla ferrodoxinas de longitud completa así como sus fragmentos activos. De acuerdo con una realización preferida de este aspecto de la presente invención, la ferrodoxina es una ferrodoxina de tipo vegetal.

Los ejemplos de polipéptidos de ferrodoxina que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, ferrodoxinas cianobacterianas, ferrodoxinas de algas y ferrodoxinas de organismos no fotosintéticos.

El calificador "heterólogo", cuando se refiere a la ferrodoxina, indica que la ferrodoxina no está asociada de manera natural (es decir, es endógena a) con la hidrogenasa de la presente invención. Por tanto, por ejemplo, la frase "hidrogenasa unida a una ferrodoxina heteróloga" no comprende la hidrogenasa solo de Fe de *Clostridium pasteurianum*.

En las SEC ID Nos: 15-20 se exponen secuencias de aminoácidos de polipéptidos de hidrogenasa-ferrodoxina ejemplares.

En las SEC ID Nos: 21-26 se exponen secuencias de ácidos nucleicos ejemplares que pueden usarse para expresar los polipéptidos de hidrogenasa-ferrodoxina.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el sistema de transporte de electrones endógeno en todos los organismos fotosintéticos comprende la donación de electrones de la ferrodoxina a la ferrodoxin-NADP⁺-reductasa (FNR). Para desviar el flujo de electrones lejos de esta enzima competidora, la presente invención contempla la regulación negativa de la misma.

La frase "ferrodoxin-NADP⁺-reductasa" como se usa en el presente documento se refiere a la enzima clasificada como EC 1.18.1.2. que está presente en organismos fotosintéticos.

La regulación negativa de la FNR puede efectuarse a nivel genómico (usando estrategias genéticas clásicas) y/o a nivel de transcripción. Esto puede realizarse usando diversas moléculas que interfieran con la transcripción y/o traducción (por ejemplo, antisentido, ARNip, Ribozima, ADNzima). Otros ejemplos de agentes que pueden usarse para regular negativamente la FNR se proporcionan en la solicitud de Patente Internacional WO2009/013745, incorporada en el presente documento por referencia.

Las células cianobacterianas modificadas de la presente invención pueden colocarse (cultivarse) en un reactor que esté adecuadamente adaptado para recoger el gas hidrógeno.

La Figura 8 es una ilustración esquemática en un reactor 100 para producir hidrógeno de acuerdo con una realización en la invención. El reactor 100 comprende un recipiente 102, que contiene las células cianobacterianas 104 modificadas de las realizaciones de la presente invención. Las células cianobacterianas 104 modificadas comprenden el FSII sensible a temperatura modificado genéticamente, de tal manera que el FSII se desactiva a altas temperaturas (entre 60-70 °C). El recipiente 102 también puede comprender otros componentes tales como medio celular 106 para garantizar la viabilidad de las células. El reactor 100 y el recipiente 102 se fabrican preferentemente con materiales transparentes para permitir que entre la luz del sol.

De acuerdo con una realización, el recipiente el recipiente 102 es un tubo dispuesto en un circuito. El recipiente 102 comprende una bomba de recirculación 114 que garantiza el flujo de las células cianobacterianas a través del recipiente 102. Típicamente la velocidad de rotación se establece a aproximadamente 20 cm por minuto. Una parte del recipiente se coloca en un depósito 108 que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C. Se apreciará que la temperatura exacta se establece de acuerdo con el FSII sensible a temperatura expresado en las células cianobacterianas 104 y puede variar de 55 a 80 °C. El depósito 108 puede comprender un calentador 116 y un monitor 118 para mantener la temperatura. Otra parte del recipiente se coloca en un depósito 110 que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 30-50 °C. Se apreciará que la temperatura exacta se establece de acuerdo con el FSII sensible a temperatura expresado en las células cianobacterianas 104 y puede variar de 22 a 55 °C. El depósito 110 puede comprender un calentador 120 y un monitor 122 para mantener la temperatura. La fracción del recipiente mantenida en el depósito 108 a diferencia del depósito 110 puede ajustarse de acuerdo con el nivel de hidrógeno requerido. El depósito 108 se mantiene como un medio anaerobio (que contiene, por ejemplo, gas nitrógeno). El depósito 110 se mantiene como un medio aerobio. El depósito 110 puede comprender

adicionalmente materia orgánica 112. El recipiente 102 se fabrica de plástico permeable a hidrógeno y a oxígeno de tal manera que los gases pueden salir del recipiente y entrar en los depósitos 108 y 110 respectivamente.

El gas hidrógeno puede recuperarse del reactor por compresión del gas nitrógeno en el compartimento 108.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que se describen como aclaración en el contexto de realizaciones individuales, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por otro lado, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o según sea adecuada en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse que sean características esenciales de aquellas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin aquellos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como los definidos anteriormente en el presente documento y como se reivindican más adelante en la sección de reivindicaciones, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran, de manera no limitativa, algunas realizaciones de la invención.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley y Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds) "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todas ellas incorporadas por referencia como si se expusiesen en su totalidad en el presente documento. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se piensa que los procedimientos del presente documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan por comodidad del lector. Toda la información contenida en el presente documento se incorpora en el presente documento por referencia.

EJEMPLO 1

Sustitución de PsaF y PsaJ por la proteína de fusión PsaJF en Synechocystis sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de la construcción PsaJF: PsaJ se amplificó con los cebadores 5580 y 5581 y se fusionó al fragmento PsaF amplificado con los cebadores 5582 y 5583 (véase la Figura 9). El gen de fusión JF se amplificó por tanto usando secuencias de ~300 pb que contenían el promotor de PsaF y la homología negativa de PsaF para crear todo el casete génico. Este fragmento de 970 pb se clonó en el vector pGEM-Teasy. Finalmente, el fragmento se trasladó a un vector pET28 para introducir el gen de resistencia a Kan en un sitio PstI que se diseñó en el cebador 5584.

5578 - GTAAATGCTGGCGAGAGGCCAC - SEC ID N°: 7.

5579 - AAGAATCGTTTCCTTGGTTAAACA - SEC ID N°: 8.

5580 - TGTTTAACCAAGGAAACGATTCTTATGGACGGTTTGAATCCTTT - SEC ID N°: 9.

5581 - ACAGGGGTGAAAAAGATCG - SEC ID N°: 10.

5582 - CCCGATCTTCTTTTCCACCCCTGTCTTGTGCTGGTGACTTTTTGAT TCCTAGC - SEC ID N°: 11.

5583 - GTCCAGTCAATGCCCAACTGGTTAGCGG - SEC ID N°: 12.

5584 - CCGCTAATTAGTTGGGCATTGACTGCAGGTGAGATAAAAGATTG GTTGGGA - SEC ID Nº: 13.

Purificación de FSI que contiene PsaJF: en placas de Petri con agar, que contenía medio BG-11, se desarrollaron células de *Synechocystis* con luz fluorescente. Se inocularon colonias en 500 ml de medio de cultivo que contenía BG-11. Después de 6 días en desarrollo a 30 °C, el cultivo se diluyó en un frasco de 8 l y se desarrolló durante 6 días más (DO730 final - 1,6~1,8). Las células se recuperaron por centrifugación a 6000 x g durante 20 minutos, se resuspendieron en ~100 ml de STN1 frío (Tricina 30 mM pH8, NaCl 15 mM, sacarosa 0,4 M). Las células se sedimentaron por centrifugación a 25000 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en 50 ml de STN1 que contenían inhibidores de proteasa. La suspensión se descompuso 3 veces usando una prensa francesa y las células no lisadas y los restos celulares se retiraron por centrifugación a 25000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 150000 x g durante 2 horas y las membranas precipitadas se suspendieron en STN1 para proporcionar una concentración de clorofila de 3 mg/ml. Se añadió dodecil maltósido (DM) a partir de una solución madre del 10 % a una concentración final de 15 mg de DM por mg de clorofila. Después de la incubación en hielo durante 30 minutos, los materiales insolubles se retiraron por centrifugación a 150.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se aplicó en una columna de celulosa DEAE y se eluyó por un gradiente de NaCl de 15-350 mM (100 ml en cada cámara) en tampón que contenía DM al 0,2 %, Tricina 30 mM pH 8. A las fracciones verdes se añadió PEG 400 al 50 % para dar una concentración final del 10 %. La suspensión se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos y el sedimento se solubilizó en 2 ml de Tricina 30 mM, DM al 0,005 %, NaCl 15 mM. La solución se cargó en gradiente de sacarosa al 10-40 % en NaCl 15 mM, Tricina 30 mM, DM al 0,005 %, se centrifugó en un rotor SW40 a 32.000 rpm durante 16 horas. La banda del trímero de FSI aparente se recogió y el FSI se precipitó con PEG 6000 al 10 %. Después de la centrifugación un sedimento se suspendió en MES 2 mM pH 6,5, DM al 0,002 % para dar 3 mg de clor./ml y se sometió a cristalización.

Cristalización de la proteína de fusión PsaJF: se usó exploración PEG/Ion (Hampton) para exploración inicial y las siguientes condiciones produjeron cristales:

Dihidrato de cloruro de calcio 7 - 50 mM PEG 3350 al 5 %, pH 5,1
 Dihidrato de formato de magnesio 20 - 50 mM PEG 3350 al 5 %, pH 7
 Tetradihidrato de acetato de magnesio 25 - 50 mM PEG 3350 al 5 %, pH 7,9
 Tetrahidrato de tartrato sódico potásico 37 PEG 3350 al 5 %, pH 7,4
 Citrato de amonio dibásico 48 - 50 mM PEG 3350 al 5 %, pH 5,1
 Malonato sódico 4 - 50 mM pH 5, PEG 3350 al 5 %

Condiciones adicionales que produjeron cristales:

MemSys – diluido 1/3
 NaCl LiSO₄ 5 - 33 mM, NaCitrato 33 mM pH 5,5, PEG400 al 10 %.
 NaCl LiSO₄ 10 - 33 mM, MES 33 mM pH 6,5, PEG400 al 10 %.
 NaCl MgCl₂ 11 - 33 mM, MES 33 mM pH 6,5, PEG400 al 10 %.
 NaCl LiSO₄ 17 - 33 mM, HEPES 33 mM pH 7,5, PEG400 al 10 %.
 NaCl MgCl₂ 18 - 33 mM, HEPES 33 mM pH 7,5, PEG400 al 10 %.
 NaCl MgCl₂ 29 - 33 mM, NaCitrato 33 mM pH 5,5, PEG400 al 4,5 %.
 NaCl MgCl₂ 35 - 33 mM, MES 33 mM pH 6,5, PEG4000 al 4,5 %.
 NaCl LiSO₄ 41 - 33 mM, HEPES pH 7,5, PEG4000 al 4,5 %.
 NaCl MgCl₂ 46 - 33 mM, Tris 33 mM pH 8,5, PEG4000.
 MemStart – diluido 1/3
 Dihidrógeno fosfato de amonio 9 - 33 mM pH 6,5.
 NaCl 21 - 33 Mm, Na₃-Citrato pH 5,6, PEG400 al 10 %
 LiSO₄ 23 - 33 mM, ADA 33 mM pH 6,5, PEG400 al 10 %
 Na₃-Citrato 26 - 70 mM, Tris 33 mM pH 8,5, PEG400 al 10 %
 NaCl 33 - 33 mM, HEPES 33 mM pH 7,5, PEG4000 al 4,5 %
 Sulfato de amonio 34 - 33 mM, HEPES 33 mM pH 7,5, PEG4000 al 4,5 %.
 MgCl₂ 35 - 70 mM, Tris 33 mM pH 8,5, PEG4000 al 4,5 %.

Análisis de velocidades de donación de electrones por citocromos respiratorios El procedimiento se describe en la leyenda de la Figura 5.

RESULTADOS

Para fusionar las subunidades PsaJ y PsaF se construyó un plásmido, que contenía 300 pb de homología aguas abajo con respecto a PsaF y aguas arriba con respecto a PsaJ (Figura 5A). La ORF (fase de lectura abierta) de PsaJ se colocó bajo el control del promotor de PsaF y se fusionó con los aminoácidos 44-164 de PsaF. Esta proteína de fusión se asemeja bastante a la proteína de fusión JF encontrada en el genoma de fagos (Sharon, I., Alperovitch, A., Rohwer, F., Haynes, M. Glaser, F. Atamaa-Ismaeel, N., Pinter, R. Y., Partensky, F., Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nelson, N. y Oded Bèjà, O. (2009). Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. Nature 461, 258-262). Para facilitar el aislamiento de los transformantes, el gen de resistencia a Kan se clonó aguas abajo con

respecto a la proteína de fusión. Después de la transformación de *Synechocystis*, las colonias de resistencia a Kan se seleccionaron y se sembraron en estrías varias veces para garantizar la correcta segregación del alelo mutante. La correcta integración y el reemplazo de genes de tipo silvestre se verificaron por PCR usando cebadores que se sitúan fuera del segmento reemplazado.

5 Después de la construcción de la cepa, se analizaron los efectos de la proteína de fusión sobre estabilidad de y/o el ensamblaje del FSI.

10 Para investigar, este FSI se purificó de los cultivos de tipo silvestre y mutante usando cromatografía DEAE seguido de gradiente de sacarosa. Como se observa en la Figura 5B, no hay cambios en las cantidades relativas de las formas triméricas a monoméricas de la enzima. Cuando se aplicaron membranas solubles directamente al gradiente de sacarosa (datos no mostrados) se obtuvieron los mismos resultados. Esto demuestra que la proteína de fusión JF no afecta a la estabilidad de este supercomplejo trimérico.

15 La composición subunitaria del complejo se examinó por análisis SDS-PAGE de las fracciones triméricas recogidas del gradiente de sacarosa (Figura 5C). En el gel, puede observarse una banda clara en la localización esperada de la proteína de fusión que representa la integración satisfactoria de la proteína fusionada en el complejo FSI.

20 El FSI mutante purificado se cristalizó y diversas condiciones produjeron cristales. La Figura 6 representa uno de los pocillos que contiene cristales. Los cristales de este primer ensayo se analizaron en el sincrotrón SLS y difractaron a una resolución de 8 Å.

25 El FSI mutante con PsaJF aislado se analizó con respecto a las velocidades de donación de electrones por citocromos respiratorios. Como se muestra en la Figura 7, el citocromo c de corazón de caballo, donó electrones al FSI mutante con PsaJF 5 veces más rápido que lo hizo el FSI de tipo silvestre. Este experimento muestra que, como se propone, el FSI mutante con PsaJF es verdaderamente promiscuo para donantes de electrones. Dado que las células mutantes crecieron igual que las células de tipo silvestre el FSI promiscuo no es perjudicial para el proceso fotosintético global.

30 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de las mismas, para los expertos en la materia será obvio que pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones alternativas. Por consiguiente, se pretende abarcar todas dichas modificaciones y variaciones alternativas que se incluyen en el espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad, en la misma medida como si indicase que cada publicación, patente o solicitud de patente individual estuviese específica e individualmente incorporada en el presente documento por referencia. Además, en la presente solicitud, las citas o identificación de cualquier referencia no se interpretarán como una admisión de que dicha referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención. Si se usan los títulos de las secciones, estos no deben considerarse como necesariamente limitantes.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Ramot At Tel Aviv University Ltd.
Nelson, Nathan
Yacoby, Iftach
Gazit, Ehud
Benhar, Itai

50 <120> PRODUCCIÓN FOTOCATALÍTICA DE HIDRÓGENO EN CIANOBACTERIAS

<130> 48682

55 <150> US 61/213.289

<151> 26-05-2009

<160> 26

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 525 805 T3

<223> Proteína de fusión PsaJF

<400> 1

```

Met Asp Gly Leu Lys Ser Phe Leu Ser Thr Ala Pro Val Met Ile Met
1          5          10          15
Ala Leu Leu Thr Phe Thr Ala Gly Ile Leu Ile Glu Phe Asn Arg Phe
20          25          30
Tyr Pro Asp Leu Leu Phe His Pro Cys Ser Cys Ala Gly Asp Phe Leu
35          40          45
Ile Pro Ser Ile Leu Phe Leu Tyr Ile Ala Gly Trp Ile Gly Trp Val
50          55          60
Gly Arg Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Arg Glu Ser Lys Asn Pro Glu Met
65          70          75          80
Gln Glu Val Val Ile Asn Val Pro Leu Ala Ile Lys Lys Met Leu Gly
85          90          95
Gly Phe Leu Trp Pro Leu Ala Ala Val Gly Glu Tyr Thr Ser Gly Lys
100         105         110
Leu Val Met Lys Asp Ser Glu Ile Pro Thr Ser Pro Arg
115         120         125

```

5

<210> 2

<211> 378

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de la proteína de fusión PsaJF

15 <400> 2

```

atggacgggt tgaatcctt ttgtcaact gctccgggtca tgatcatggo tttgttgact      60
ttcaccgctg gtatttgat cgagtttaat cgtttttatc cggatcttct ttccacccc      120

tgttcttgtg ctggtgactt ttgattcct agcattttgt tcctgtacat tgctggttgg      180
atcggctggg ttggtcgttc taacctgatt gaaattcggg aaagcaaaaa tcctgaaatg      240
caggaagtgg ttattaatgt ccccctagcg atcaaaaaaa tgttgggtgg ttccctttgg      300
cccttggccg ccgttgggtg atacacctcc ggcaactggg tgatgaagga ttcagaaatc      360
cccacttccc cccgctaa                                     378

```

20

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos ejemplar de PsaJ

ES 2 525 805 T3

<400> 3

```

Met Asp Gly Leu Lys Ser Phe Leu Ser Thr Ala Pro Val Met Ile Met
1           5           10           15

Ala Leu Leu Thr Phe Thr Ala Gly Ile Leu Ile Glu Phe Asn Arg Phe
           20           25           30

Tyr Pro Asp Leu Leu Phe His Pro
           35           40
    
```

5 <210> 4
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos ejemplar de PsaF
 <400> 4

```

Met Lys His Leu Leu Ala Leu Leu Leu Ala Phe Thr Leu Trp Phe Asn
1           5           10           15

Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Asp Asp Phe Ala Asn Leu Thr Pro Cys
           20           25           30

Ser Glu Asn Pro Ala Tyr Leu Ala Lys Ser Lys Asn Phe Leu Asn Thr
           35           40           45

Thr Asn Asp Pro Asn Ser Gly Lys Ile Arg Ala Glu Arg Tyr Ala Ser
           50           55           60

Ala Leu Cys Gly Pro Glu Gly Tyr Pro His Leu Ile Val Asp Gly Arg
65           70           75           80

Phe Thr His Ala Gly Asp Phe Leu Ile Pro Ser Ile Leu Phe Leu Tyr
           85           90           95

Ile Ala Gly Trp Ile Gly Trp Val Gly Arg Ser Tyr Leu Ile Glu Ile
           100          105          110

Arg Glu Ser Lys Asn Pro Glu Met Gln Glu Val Val Ile Asn Val Pro
           115          120          125

Leu Ala Ile Lys Lys Met Leu Gly Gly Phe Leu Trp Pro Leu Ala Ala
           130          135          140

Val Gly Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Leu Val Met Lys Asp Ser Glu Ile
145          150          155          160

Pro Thr Ser Pro Arg
           165
    
```

15

ES 2 525 805 T3

<210> 5
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Promotor de PsaF

<400> 5
 cttatttatt tagccgcctt tttagtcctt tgtttaacca aggaaacgat tctt 54

<210> 6
 <211> 2378
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Región codificante de PsaJF flanqueando con regiones complementarias al genoma cianobacteriano para recombinación homóloga

20

<400> 6

```

    gggcgaattg ggccccgacgt cgcattgctcc cggccgccat ggcggccgcg ggaattcgat 60
    tgtaaatgct ggcgagaggc cacttccgggt actaccccgc cgaaaatttg atgggtttgt 120
    atttgggaag aaaccacatt actgcaaacg ttacgattat ttacaattgc caccgcagtt 180
    tcatcacaac ttgtttcaat tgctaaaatg attgccattc tctgctagtt tgagtttgat 240
    ccaaaagacg acggtttatt agcccagtct ttectattat cggctaacga tccccggatc 300
    acggtaacag gttgogaatc ttgcttattt atttagccgc ctttttagtc ttttgtttaa 360
    ccaaggaaac gattcttatg gacggtttga aatctttttt gtcaactgct ccggtcatga 420
    tcatggcttt gttgactttc accgctggta ttttgatcga gtttaatcgt ttttatcccg 480
    atcttctttt ccaccctgt tcttgtgctg gtgacttttt gattcctagc attttgttcc 540
    tgtacattgc tggttggatc ggctggggtg gtcgttctta cctgattgaa attcgggaaa 600
    gcaaaaatcc tgaaatgcag gaagtgggta ttaatgtccc cctagcgcgc aaaaaaatgt 660
    tgggtgggtt cctttggccc ttggccgcgc ttggtgaata caoctccggc aaactggtga 720
    tgaaggattc agaaatcccc acttcccccc gctaattagt tgggcattga ctgcaggggg 780
    gggggggcgc tgaggtotgc ctctggaaga aggtgttgct gactcatacc aggcctgaat 840
    cgccccatca tccagccaga aagtgaggga gccacgggtg atgagagctt tgtttaggtt 900
    ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggctctcgt tgcgggaaç 960
    atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa gcgcgcgtcc 1020
    cgtcaagtca gcgtaatgct ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc tgattagaaa 1080
    aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat caggattatc aataccatat 1140
  
```

ES 2 525 805 T3

ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg 1200
 gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtccaa catcaataca acctattaat 1260
 ttcccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac gactgaatcc 1320
 ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg ccagccatta 1380
 cgctcgtcat caaaatcact cgcacccaac aaaccggtat tcattcgtga ttgcgcctga 1440
 gcgagacgaa atacgcgac gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac 1500
 cggcgcagga acaactgccag cgcacccaac atattttcac ctgaatcagg atattcttct 1560
 aatacctgga atgctgtttt cccggggatc gcagtggtga gtaaccatgc atcatcagga 1620
 gtacggataa aatgcttgat ggtcggaga ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg 1680
 accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctacctttgc catgtttcag aacaactct 1740
 ggcgcacggt gcttcccata caatcgatag attgtcgcac ctgattgccc gacattatcg 1800
 cgagcccatt tatacccata taaatcagca tccatgttgg aatttaacg cggcctcgag 1860
 caagacgtt cccggtgaat atggctcata acacccttg tattactgtt tatgtaagca 1920
 gacagtttta ttgttcata tgatatattt ttatcttctg caatgtaaca tcagagattt 1980
 tgagacacaa cgtggcttcc ccccccccc ctgcagaggt gagataaaag attggttggg 2040
 atttgtaatt gagatcctag ccaatttttt ttggtaaaaa taactggatt aatcgggtaa 2100
 tttacctggg ttgagcaaat taaggggatc tacctggcgt ttaaaaatta attgggattc 2160
 tggcagaggt tgtaccgacc ctccggctaa actataggtg tggggattgg cgattctggc 2220
 ccctagattt tgggtggcgg ccatgatttc ttccaggcga tcaccgttga taaatcacta 2280
 gtgaattcgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag ctccaacgc gttggatgca 2340
 tagcttgagt attctatagt gtcacctaaa tagcttgg 2378

- 5 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- 15 <400> 7
 gtaaagctg gcgagaggcc ac 22
- 20 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- 30 <400> 8
 aagaatcgtt tccttggtta aaca 24
- 30 <210> 9
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>

ES 2 525 805 T3

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 9
 5 tgtttaacca aggaaacgat tcttatggac ggttgaaat ccttt 45
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 10
 15 acaggggtgg aaaagaagat cg 22
 <210> 11
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 11
 25 cccgatcttc tttccaccc ctgttctgt gctggtgact tttgattcc tagc 54
 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 12
 35 gtccagtcaa tgccaactg gttagcgg 28
 <210> 13
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 13
 45 ccgctaatta gttgggcatt gactgcaggt gagataaaag attggtggg a 51
 <210> 14
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de PSAF truncada
 <400> 14

ES 2 525 805 T3

Asn Phe Leu Asn Thr Thr Asn Asp Pro Asn Ser Gly Lys Ile Arg Ala
1 5 10 15
Glu Arg Tyr Ala Ser Ala Leu Cys Gly Pro Glu Gly Tyr Pro His Leu
20 25 30
Ile Val Asp Gly Arg Phe Thr His Ala Gly Asp Phe Leu Ile Pro Ser
35 40 45
Ile Leu Phe Leu Tyr Ile Ala Gly Trp Ile Gly Trp Val Gly Arg Ser
50 55 60
Tyr Leu Ile Glu Ile Arg Glu Ser Lys Asn Pro Glu Met Gln Glu Val
65 70 75 80
Val Ile Asn Val Pro Leu Ala Ile Lys Lys Met Leu Gly Gly Phe Leu
85 90 95
Trp Pro Leu Ala Ala Val Gly Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Leu Val Met
100 105 110
Lys Asp Ser Glu Ile Pro Thr Ser Pro Arg
115 120

<210> 15

<211> 558

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> 1HidFd: un producto recombinante del dúo pET Hid E + A Cr Fd sin enlazador

<400> 15

ES 2 525 805 T3

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
 20 25 30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
 35 40 45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
 50 55 60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
 85 90 95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu
 100 105 110

Thr Glu His Leu Glu Ala His Pro His Ser Asp Glu Pro Leu Pro Met
 115 120 125

Phe Thr Ser Cys Cys Pro Gly Trp Ile Ala Met Leu Glu Lys Ser Tyr
 130 135 140

Pro Asp Leu Ile Pro Tyr Val Ser Ser Cys Lys Ser Pro Gln Met Met
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Lys Lys Gly Ile Ala
 165 170 175

ES 2 525 805 T3

Pro Lys Asp Met Val Met Val Ser Ile Met Pro Cys Thr Arg Lys Gln
 180 185 190

Ser Glu Ala Asp Arg Asp Trp Phe Cys Val Asp Ala Asp Pro Thr Leu
 195 200 205

Arg Gln Leu Asp His Val Ile Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Ile Phe
 210 215 220

Lys Glu Arg Gly Ile Asn Leu Ala Glu Leu Pro Glu Gly Glu Trp Asp
 225 230 235 240

Asn Pro Met Gly Val Gly Ser Gly Ala Gly Val Leu Phe Gly Thr Thr
 245 250 255

Gly Gly Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Phe Thr
 260 265 270

Gly Thr Pro Leu Pro Arg Leu Ser Leu Ser Glu Val Arg Gly Met Asp
 275 280 285

Gly Ile Lys Glu Thr Asn Ile Thr Met Val Pro Ala Pro Gly Ser Lys
 290 295 300

Phe Glu Glu Leu Leu Lys His Arg Ala Ala Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320

Ala His Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ala Trp Asp Gly Gly Ala Gly Phe
 325 330 335

Thr Ser Glu Asp Gly Arg Gly Gly Ile Thr Leu Arg Val Ala Val Ala
 340 345 350

Asn Gly Leu Gly Asn Ala Lys Lys Leu Ile Thr Lys Met Gln Ala Gly
 355 360 365

Glu Ala Lys Tyr Asp Phe Val Glu Ile Met Ala Cys Pro Ala Gly Cys
 370 375 380

Val Gly Gly Gly Gly Gln Pro Arg Ser Thr Asp Lys Ala Ile Thr Gln
 385 390 395 400

Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg
 405 410 415

Arg Ser His Glu Asn Pro Ser Ile Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Tyr Leu
 420 425 430

Gly Glu Pro Leu Gly His Lys Ala His Glu Leu Leu His Thr His Tyr
 435 440 445

Val Ala Gly Gly Val Glu Glu Lys Asp Glu Lys Lys Met Ala Ser Tyr
 450 455 460

ES 2 525 805 T3

Thr Val Lys Leu Ile Thr Pro Asp Gly Glu Ser Ser Ile Glu Cys Ser
465 470 475 480

Asp Asp Thr Tyr Ile Leu Asp Ala Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asp Leu
485 490 495

Pro Tyr Ser Cys Arg Ala Gly Ala Cys Ser Thr Cys Ala Gly Lys Ile
500 505 510

Thr Ala Gly Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ser Phe Leu Asp Asp Asp
515 520 525

Gln Ile Glu Ala Gly Tyr Val Leu Thr Cys Val Ala Tyr Pro Thr Ser
530 535 540

Asp Cys Thr Ile Glu Thr His Lys Glu Glu Glu Leu Thr Ala
545 550 555

<210> 16

<211> 563

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 2HidFd: un producto recombinante del dúo pET Hid E + A Cr Fd con un enlazador pequeño

<400> 16

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
1 5 10 15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
20 25 30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
35 40 45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
50 55 60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
65 70 75 80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
85 90 95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu
100 105 110

Thr Glu His Leu Glu Ala His Pro His Ser Asp Glu Pro Leu Pro Met
115 120 125

Phe Thr Ser Cys Cys Pro Gly Trp Ile Ala Met Leu Glu Lys Ser Tyr
130 135 140

Pro Asp Leu Ile Pro Tyr Val Ser Ser Cys Lys Ser Pro Gln Met Met
145 150 155 160

5

10

ES 2 525 805 T3

Leu Ala Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Lys Lys Gly Ile Ala
 165 170 175
 Pro Lys Asp Met Val Met Val Ser Ile Met Pro Cys Thr Arg Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Ala Asp Arg Asp Trp Phe Cys Val Asp Ala Asp Pro Thr Leu
 195 200 205
 Arg Gln Leu Asp His Val Ile Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Ile Phe
 210 215 220
 Lys Glu Arg Gly Ile Asn Leu Ala Glu Leu Pro Glu Gly Glu Trp Asp
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Gly Val Gly Ser Gly Ala Gly Val Leu Phe Gly Thr Thr
 245 250 255
 Gly Gly Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Phe Thr
 260 265 270
 Gly Thr Pro Leu Pro Arg Leu Ser Leu Ser Glu Val Arg Gly Met Asp
 275 280 285
 Gly Ile Lys Glu Thr Asn Ile Thr Met Val Pro Ala Pro Gly Ser Lys
 290 295 300
 Phe Glu Glu Leu Leu Lys His Arg Ala Ala Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Ala His Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ala Trp Asp Gly Gly Ala Gly Phe
 325 330 335
 Thr Ser Glu Asp Gly Arg Gly Gly Ile Thr Leu Arg Val Ala Val Ala
 340 345 350
 Asn Gly Leu Gly Asn Ala Lys Lys Leu Ile Thr Lys Met Gln Ala Gly
 355 360 365
 Glu Ala Lys Tyr Asp Phe Val Glu Ile Met Ala Cys Pro Ala Gly Cys
 370 375 380
 Val Gly Gly Gly Gly Gln Pro Arg Ser Thr Asp Lys Ala Ile Thr Gln
 385 390 395 400
 Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg
 405 410 415
 Arg Ser His Glu Asn Pro Ser Ile Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Tyr Leu
 420 425 430
 Gly Glu Pro Leu Gly His Lys Ala His Glu Leu Leu His Thr His Tyr
 435 440 445
 Val Ala Gly Gly Val Glu Glu Lys Asp Glu Lys Lys Gly Gly Gly Gly

ES 2 525 805 T3

```

          450              455              460
Ser Met Ala Ser Tyr Thr Val Lys Leu Ile Thr Pro Asp Gly Glu Ser
465              470              475              480

Ser Ile Glu Cys Ser Asp Asp Thr Tyr Ile Leu Asp Ala Ala Glu Glu
              485              490              495

Ala Gly Leu Asp Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Ala Gly Ala Cys Ser Thr
              500              505              510

Cys Ala Gly Lys Ile Thr Ala Gly Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ser
              515              520              525

Phe Leu Asp Asp Asp Gln Ile Glu Ala Gly Tyr Val Leu Thr Cys Val
530              535              540

Ala Tyr Pro Thr Ser Asp Cys Thr Ile Glu Thr His Lys Glu Glu Glu
545              550              555              560

Leu Thr Ala
    
```

5 <210> 17
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3HidFd: un producto recombinante del dúo pET Hid E + A Cr Fd con un enlazador mediano

<400> 17

```

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
1              5              10              15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
              20              25              30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
              35              40              45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
50              55              60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
65              70              75              80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
              85              90              95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu
100              105              110

Thr Glu His Leu Glu Ala His Pro His Ser Asp Glu Pro Leu Pro Met
115              120              125
    
```

ES 2 525 805 T3

Phe Thr Ser Cys Cys Pro Gly Trp Ile Ala Met Leu Glu Lys Ser Tyr
 130 135 140
 Pro Asp Leu Ile Pro Tyr Val Ser Ser Cys Lys Ser Pro Gln Met Met
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Lys Lys Gly Ile Ala
 165 170 175
 Pro Lys Asp Met Val Met Val Ser Ile Met Pro Cys Thr Arg Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Ala Asp Arg Asp Trp Phe Cys Val Asp Ala Asp Pro Thr Leu
 195 200 205
 Arg Gln Leu Asp His Val Ile Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Ile Phe
 210 215 220
 Lys Glu Arg Gly Ile Asn Leu Ala Glu Leu Pro Glu Gly Glu Trp Asp
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Gly Val Gly Ser Gly Ala Gly Val Leu Phe Gly Thr Thr
 245 250 255
 Gly Gly Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Phe Thr
 260 265 270
 Gly Thr Pro Leu Pro Arg Leu Ser Leu Ser Glu Val Arg Gly Met Asp
 275 280 285
 Gly Ile Lys Glu Thr Asn Ile Thr Met Val Pro Ala Pro Gly Ser Lys
 290 295 300
 Phe Glu Glu Leu Leu Lys His Arg Ala Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Ala His Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ala Trp Asp Gly Gly Ala Gly Phe
 325 330 335
 Thr Ser Glu Asp Gly Arg Gly Gly Ile Thr Leu Arg Val Ala Val Ala
 340 345 350
 Asn Gly Leu Gly Asn Ala Lys Lys Leu Ile Thr Lys Met Gln Ala Gly
 355 360 365
 Glu Ala Lys Tyr Asp Phe Val Glu Ile Met Ala Cys Pro Ala Gly Cys
 370 375 380
 Val Gly Gly Gly Gly Gln Pro Arg Ser Thr Asp Lys Ala Ile Thr Gln
 385 390 395 400
 Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg
 405 410 415
 Arg Ser His Glu Asn Pro Ser Ile Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Tyr Leu
 420 425 430

ES 2 525 805 T3

Gly Glu Pro Leu Gly His Lys Ala His Glu Leu Leu His Thr His Tyr
 435 440 445

Val Ala Gly Gly Val Glu Glu Lys Asp Glu Lys Lys Gly Gly Gly Gly
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ser Tyr Thr Val Lys Leu Ile Thr
 465 470 475 480

Pro Asp Gly Glu Ser Ser Ile Glu Cys Ser Asp Asp Thr Tyr Ile Leu
 485 490 495

Asp Ala Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asp Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Ala
 500 505 510

Gly Ala Cys Ser Thr Cys Ala Gly Lys Ile Thr Ala Gly Ser Val Asp
 515 520 525

Gln Ser Asp Gln Ser Phe Leu Asp Asp Asp Gln Ile Glu Ala Gly Tyr
 530 535 540

Val Leu Thr Cys Val Ala Tyr Pro Thr Ser Asp Cys Thr Ile Glu Thr
 545 550 555 560

His Lys Glu Glu Glu Leu Thr Ala
 565

<210> 18

<211> 527

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 4HidFd: un producto recombinante de Hid E + A Cr Fd C' truncado N' truncado y sin enlazador

<400> 18

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
 20 25 30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
 35 40 45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
 50 55 60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
 85 90 95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu

ES 2 525 805 T3

			100						105					110			
Thr	Glu	His	Leu	Glu	Ala	His	Pro	His	Ser	Asp	Glu	Pro	Leu	Pro	Met		
		115					120					125					
Phe	Thr	Ser	Cys	Cys	Pro	Gly	Trp	Ile	Ala	Met	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr		
	130					135					140						
Pro	Asp	Leu	Ile	Pro	Tyr	Val	Ser	Ser	Cys	Lys	Ser	Pro	Gln	Met	Met		
145					150					155					160		
Leu	Ala	Ala	Met	Val	Lys	Ser	Tyr	Leu	Ala	Glu	Lys	Lys	Gly	Ile	Ala		
				165					170					175			
Pro	Lys	Asp	Met	Val	Met	Val	Ser	Ile	Met	Pro	Cys	Thr	Arg	Lys	Gln		
			180					185					190				
Ser	Glu	Ala	Asp	Arg	Asp	Trp	Phe	Cys	Val	Asp	Ala	Asp	Pro	Thr	Leu		
		195					200					205					
Arg	Gln	Leu	Asp	His	Val	Ile	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Ile	Phe		
	210					215						220					
Lys	Glu	Arg	Gly	Ile	Asn	Leu	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Glu	Trp	Asp		
225					230					235					240		
Asn	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Val	Leu	Phe	Gly	Thr	Thr		
				245					250					255			
Gly	Gly	Val	Met	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Tyr	Glu	Leu	Phe	Thr		
			260					265					270				
Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Met	Asp		
		275					280					285					
Gly	Ile	Lys	Glu	Thr	Asn	Ile	Thr	Met	Val	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Lys		
	290					295					300						
Phe	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Glu	Ala	Ala		
305					310					315					320		
Ala	His	Gly	Thr	Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Phe		
				325					330					335			
Thr	Ser	Glu	Asp	Gly	Arg	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Ala		
			340					345					350				
Asn	Gly	Leu	Gly	Asn	Ala	Lys	Lys	Leu	Ile	Thr	Lys	Met	Gln	Ala	Gly		
		355					360					365					
Glu	Ala	Lys	Tyr	Asp	Phe	Val	Glu	Ile	Met	Ala	Cys	Pro	Ala	Gly	Cys		
	370					375					380						
Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Pro	Arg	Ser	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Thr	Gln		
385					390					395					400		

ES 2 525 805 T3

Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg
 405 410 415

Arg Ser His Glu Asn Pro Ser Ile Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Tyr Leu
 420 425 430

Gly Glu Pro Leu Gly His Lys Ala His Glu Leu Leu His Thr His Tyr
 435 440 445

Val Asp Asp Thr Tyr Ile Leu Asp Ala Ala Glu Glu Ala Gly Leu Asp
 450 455 460

Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Ala Gly Ala Cys Ser Thr Cys Ala Gly Lys
 465 470 475 480

Ile Thr Ala Gly Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ser Phe Leu Asp Asp
 485 490 495

Asp Gln Ile Glu Ala Gly Tyr Val Leu Thr Cys Val Ala Tyr Pro Thr
 500 505 510

Ser Asp Cys Thr Ile Glu Thr His Lys Glu Glu Glu Leu Thr Ala
 515 520 525

<210> 19
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 5HidFd: un producto recombinante del dúo pET Hid E + A Cr Fd C' truncado y sin enlazador

10

<400> 19

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
 20 25 30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
 35 40 45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
 50 55 60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
 85 90 95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu
 100 105 110

Thr Glu His Leu Glu Ala His Pro His Ser Asp Glu Pro Leu Pro Met
 115 120 125

ES 2 525 805 T3

Phe Thr Ser Cys Cys Pro Gly Trp Ile Ala Met Leu Glu Lys Ser Tyr
 130 135 140
 Pro Asp Leu Ile Pro Tyr Val Ser Ser Cys Lys Ser Pro Gln Met Met
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Lys Lys Gly Ile Ala
 165 170 175
 Pro Lys Asp Met Val Met Val Ser Ile Met Pro Cys Thr Arg Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Ala Asp Arg Asp Trp Phe Cys Val Asp Ala Asp Pro Thr Leu
 195 200 205
 Arg Gln Leu Asp His Val Ile Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Ile Phe
 210 215 220
 Lys Glu Arg Gly Ile Asn Leu Ala Glu Leu Pro Glu Gly Glu Trp Asp
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Gly Val Gly Ser Gly Ala Gly Val Leu Phe Gly Thr Thr
 245 250 255
 Gly Gly Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Phe Thr
 260 265 270
 Gly Thr Pro Leu Pro Arg Leu Ser Leu Ser Glu Val Arg Gly Met Asp
 275 280 285
 Gly Ile Lys Glu Thr Asn Ile Thr Met Val Pro Ala Pro Gly Ser Lys
 290 295 300
 Phe Glu Glu Leu Leu Lys His Arg Ala Ala Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Ala His Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ala Trp Asp Gly Gly Ala Gly Phe
 325 330 335
 Thr Ser Glu Asp Gly Arg Gly Gly Ile Thr Leu Arg Val Ala Val Ala
 340 345 350
 Asn Gly Leu Gly Asn Ala Lys Lys Leu Ile Thr Lys Met Gln Ala Gly
 355 360 365
 Glu Ala Lys Tyr Asp Phe Val Glu Ile Met Ala Cys Pro Ala Gly Cys
 370 375 380
 Val Gly Gly Gly Gly Gln Pro Arg Ser Thr Asp Lys Ala Ile Thr Gln
 385 390 395 400
 Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg
 405 410 415

ES 2 525 805 T3

Arg Ser His Glu Asn Pro Ser Ile Arg Glu Leu Tyr Asp Thr Tyr Leu
 420 425 430

Gly Glu Pro Leu Gly His Lys Ala His Glu Leu Leu His Thr His Tyr
 435 440 445

Val Met Ala Ser Tyr Thr Val Lys Leu Ile Thr Pro Asp Gly Glu Ser
 450 455 460

Ser Ile Glu Cys Ser Asp Asp Thr Tyr Ile Leu Asp Ala Ala Glu Glu
 465 470 475 480

Ala Gly Leu Asp Leu Pro Tyr Ser Cys Arg Ala Gly Ala Cys Ser Thr
 485 490 495

Cys Ala Gly Lys Ile Thr Ala Gly Ser Val Asp Gln Ser Asp Gln Ser
 500 505 510

Phe Leu Asp Asp Asp Gln Ile Glu Ala Gly Tyr Val Leu Thr Cys Val
 515 520 525

Ala Tyr Pro Thr Ser Asp Cys Thr Ile Glu Thr His Lys Glu Glu Glu
 530 535 540

Leu Thr Ala
 545

<210> 20

<211> 538

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 6HidFd: un producto recombinante del dúo pET Hid E + A Cr Fd N' truncado

<400> 20

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Arg Ser Glu Asn Leu Tyr
 1 5 10 15

Phe Gln Gly Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Leu Ser His Val Gln
 20 25 30

Gln Ala Leu Ala Glu Leu Ala Lys Pro Lys Asp Asp Pro Thr Arg Lys
 35 40 45

His Val Cys Val Gln Val Ala Pro Ala Val Arg Val Ala Ile Ala Glu
 50 55 60

Thr Leu Gly Leu Ala Pro Gly Ala Thr Thr Pro Lys Gln Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Arg Leu Gly Phe Asp Glu Val Phe Asp Thr Leu Phe Gly
 85 90 95

Ala Asp Leu Thr Ile Met Glu Glu Gly Ser Glu Leu Leu His Arg Leu
 100 105 110

5

10

ES 2 525 805 T3

Thr Glu His Leu Glu Ala His Pro His Ser Asp Glu Pro Leu Pro Met
 115 120 125
 Phe Thr Ser Cys Cys Pro Gly Trp Ile Ala Met Leu Glu Lys Ser Tyr
 130 135 140
 Pro Asp Leu Ile Pro Tyr Val Ser Ser Cys Lys Ser Pro Gln Met Met
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Met Val Lys Ser Tyr Leu Ala Glu Lys Lys Gly Ile Ala
 165 170 175
 Pro Lys Asp Met Val Met Val Ser Ile Met Pro Cys Thr Arg Lys Gln
 180 185 190
 Ser Glu Ala Asp Arg Asp Trp Phe Cys Val Asp Ala Asp Pro Thr Leu
 195 200 205
 Arg Gln Leu Asp His Val Ile Thr Thr Val Glu Leu Gly Asn Ile Phe
 210 215 220
 Lys Glu Arg Gly Ile Asn Leu Ala Glu Leu Pro Glu Gly Glu Trp Asp
 225 230 235 240
 Asn Pro Met Gly Val Gly Ser Gly Ala Gly Val Leu Phe Gly Thr Thr
 245 250 255
 Gly Gly Val Met Glu Ala Ala Leu Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Phe Thr
 260 265 270
 Gly Thr Pro Leu Pro Arg Leu Ser Leu Ser Glu Val Arg Gly Met Asp
 275 280 285
 Gly Ile Lys Glu Thr Asn Ile Thr Met Val Pro Ala Pro Gly Ser Lys
 290 295 300
 Phe Glu Glu Leu Leu Lys His Arg Ala Ala Arg Ala Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Ala His Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ala Trp Asp Gly Gly Ala Gly Phe
 325 330 335
 Thr Ser Glu Asp Gly Arg Gly Gly Ile Thr Leu Arg Val Ala Val Ala
 340 345 350
 Asn Gly Leu Gly Asn Ala Lys Lys Leu Ile Thr Lys Met Gln Ala Gly
 355 360 365
 Glu Ala Lys Tyr Asp Phe Val Glu Ile Met Ala Cys Pro Ala Gly Cys
 370 375 380
 Val Gly Gly Gly Gly Gln Pro Arg Ser Thr Asp Lys Ala Ile Thr Gln
 385 390 395 400
 Lys Arg Gln Ala Ala Leu Tyr Asn Leu Asp Glu Lys Ser Thr Leu Arg

ES 2 525 805 T3

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaa agatctgaaa acctgtatctt tcagggcgct 60
 gctcctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcggg actggcgaaa 120
 ccgaaagatg atccgaccog taagcatgtg tgcgtgcagg tggcgccggc ggtgcgtgtg 180
 gcgategcgg aaacctggg cctggcgccg ggcgcgacca ccccgaaaca gctggcgga 240
 ggctgcgtc gtctgggctt tgatgaagtg ttcgataccc tgtttggcgc ggatctgacc 300
 atcatggaag aaggcagcga actgctgcat cgtctgaccg aacatctgga agcgcacccg 360
 catagcgatg aaccgctgcc gatgtttacc agctgctgcc cgggctggat tgcgatgctg 420
 gaaaaagct atccggatct gattccgtat gtgagcagct gcaaaagccc gcagatgatg 480
 ctggcggcga tggtgaaaag ctatctggcg gaaaaaaaaag gcattgcgcc gaaagatatg 540
 gtgatggtga gcattatgcc gtgcaccgt aaacagagcg aagcggatcg tgattggttc 600
 tgcgtggatg cggatccgac cctgcgtcag ctggatcatg tgattaccac cgtggaactg 660
 ggcaacattt ttaaagaacg tggcattaac ctggcggaac tgcgggaagg cgaatgggat 720
 aaccgatgg gcgtgggag cggcgcgccg gtgctgttcg gcaccaccgg cggcgtgatg 780
 gaagcggcgc tgcgtaccgc gtatgaactg ttaccggca ccccgctgcc gcgtctgagc 840
 ctgagcgagg tgcgtggcat ggatggcatt aaagagacca acattaccat ggtgcccgcg 900

ccgggcagca aatttgaaga actgctgaaa catcgtcggc cggcgctgc ggaagcggcg 960
 gcgcattgca ccccgggccc gctggcgtgg gatggcggcg cggcctttac cagcgaagat 1020
 ggcctggtgg gcattaccct gcgtgtggcg gtggcgaaag gcctgggcaa cgcgaaaaaa 1080
 ctgattacca aaatgcaggc gggcgaaagc aaatatgatt ttgtggaaat tatggcgtgc 1140
 ccggcgggct gcgtgggccc cggcgcccag ccgcgtagca ccgataaagc gatcaccag 1200
 aaacgtcagg cggcgctgta taacctggat gagaagagca ccctgcgtcg tagccatgag 1260
 aaccggagca ttctggaact gtatgatacc tatctgggcg aaccgctggg ccataaagcg 1320
 catgaactgc tgcataccca ttatgtggcg ggcggcgtgg aagaaaaaga tgaaaaaaaa 1380
 atggcatcct ataccgttaa attgatcacc cccgatggtg aaagttccat cgaatgctct 1440
 gacgatacct atatcctcga tgcctcggaa gaagctggcc tagacctgcc ctattcctgc 1500
 cgtgctgggg cttgctccac ctgtgccggg aagatcaccg ctggtagtgt tgaccaatcc 1560
 gatcagctct tcttgatga tgaccaaatt gaagctgggt atgttttgac ctgtgtagct 1620
 tatccacct ccgattgcac cattgaaacc cacaaagaag aagagctcac cgcataa 1677

5 <210> 22
 <211> 1691
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dúo pET Hid E + A Cr Fd con un enlazador pequeño
 <400> 22

ES 2 525 805 T3

```

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaa agatctgaaa acctgtattt tcagggcgct      60
getoctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcggg actggcgaaa      120
ccgaaagatg atccgacccg taagcatggt gcgtgcaggt ggcgccggcg gtgcgtgtgg      180
cgatcgcgga aacctgggc ctggcgccgg gcgcgaccac cccgaaacag ctggcggaag      240
gcctgcgctg tctgggcttt gatgaagtgt tcgataccct gtttggcgcg gatctgacca      300
tcattggaaga aggcagcgaa ctgctgcata gtctgaccga acatctggaa gcgcataccg      360
atagcgatga accgctgcgg atgtttacca gctgctgccc gggtggatt gcgatgctgg      420
aaaaaagcta tccgatctg attccgatg tgagcagctg caaaagcccg cagatgatgc      480
tggcggcgat ggtgaaaagc tatctggcgg aaaaaaagg cattgcgccg aaagatatgg      540
tgatggtgag cattatgccc tgcacccgta aacagagcga agcggatcgt gattggttct      600
gcgtggatgc ggatccgacc ctgcgtcagc tggatcatgt gattaccacc gtggaactgg      660
gcaacatttt taaagaacgt ggcattaacc tggcggaact gccggaaggc gaatgggata      720
accgatggg cgtgggcagc ggcgcggcg tgetgttcgg caccaccggc ggctgatgg      780
aagcggcgct gcgtaccgcg tatgaactgt ttaccggcac cccgctgccg cgtctgagcc      840
tgagcgaggt gcgtggcatg gatggcatta aagagaccaa cattaccatg gtgccggcgc      900
cgggcagcaa atttgaagaa ctgctgaaac atcgtgcggc ggcgcgtgcg gaagcggcgg      960
cgcatggcac cccgggcccg ctggcgtggg atggcggcgc gggctttacc agcgaagatg     1020
gccgtggcgg cattaccctg cgtgtggcgg tggcgaaacgg cctgggcaac gcgaaaaaac     1080
tgattaccaa aatgcaggcg ggcgaagcga aatatgattt tgtggaatt atggcgtgcc     1140

cggcgggctg cgtgggcggc ggcggccagc cgcgtagcac cgataaagcg atcaccaga     1200
aacgtcaggc ggcgctgtat aacctggatg agaagagcac cctgcgtcgt agccatgaga     1260
acccgagcat tcgtgaactg tatgatacct atctgggcga accgctgggc cataaagcgc     1320
atgaactgct gcatacccat tatgtggcgg gcggcgtgga agaaaaagat gaaaaaaaag     1380
gtggcggcgg atccatggca tcctataccg ttaaattgat caccoccat ggtgaaagtt     1440
ccatcgaatg ctctgacgat acctatatcc tcgatgctgc ggaagaagct ggcctagacc     1500
tgccctatc ctgcctgct gggccttct ccacctgtgc cggtaagatc accgctggtg     1560
gtgttgacca atccgatcag tctttcttgg atgatgacca aattgaagct ggttatgttt     1620
tgacctgtgt agcttatccc acctccgatt gcaccattga aaccacacaa gaagaagagc     1680
tcaccgcata a                                     1691

```

5 <210> 23
 <211> 1707
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dúo pET Hid E + A Cr Fd con un enlazador mediano
 <400> 23

ES 2 525 805 T3

```

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaa agatctgaaa acctgtattt tcagggcgct      60
gctcctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcgga actggcgaaa     120
ccgaaagatg atccgacccc taagcatgtg tgcgtgcagg tggcgccggc ggtgcgtgtg     180
gcgatoagcg aaaccctggg cctggcgccg ggcgcgacca ccccgaaaca gctggcgaaa     240
ggcctgctgc gtctgggctt tgatgaagtg ttcgataccc tgtttggcgc ggatctgacc     300
atcatggaag aaggcagcga actgctgcat cgtctgaccg aacatctgga agcgcacccg     360
catagcgatg aaccgctgcc gatgtttacc agctgctgcc cgggctggat tgcgatgctg     420
gaaaaaagct atccggatct gattccgtat gtgagcagct gcaaaagccc gcagatgatg     480
ctggcgggca tgggtgaaaag ctatctggcg gaaaaaaaag gcattgcgcc gaaagatatg     540
gtgatggtga gcattatgcc gtgcacccgt aaacagagcg aagcggatcg tgattggttc     600
tgcgtggatg cggatccgac cctgcgtcag ctggatcatg tgattaccac cgtggaactg     660
ggcaacattt ttaaagaacg tggcattaac ctggcggaac tgcgggaagg cgaatgggat     720
aaccgatgg gcgtgggcag cggcgcgggc gtgctgttcg gcaccaccgg cggcgtgatg     780
gaagcggcgc tgcgtaccgc gtatgaaactg tttaccggca ccccgctgcc gcgtctgagc     840
ctgagcagag tgcgtggcat ggatggcatt aaagagacca acattaccat ggtgcgcggc     900
ccggcgagca aatttgaaga actgctgaaa catcgtgcgg cggcgcgctg ggaagcggcg     960
gcgcatggca ccccgggccc gctggcgtgg gatggcgcg cgggctttac cagcgaagat    1020
ggcctgggg gcattaccct gcgtgtggcg gtggcgaaac gcctgggcaa cgcgaaaaaa    1080
ctgattacca aaatgcaggc gggcgaagcg aatatgatt ttgtggaat tatggcgtgc    1140
ccggcgggct gcgtggggcg cggcgggccag ccgcgtagca ccgataaagc gatcaccocg    1200
aaacgtcagg cggcgtgta taacctggat gagaagagca ccctgcgtcg tagccatgag    1260
aaccgagca ttcgtgaact gtatgatacc tatctggcg aaccgctggg ccataaagcg    1320

catgaaactgc tgcataccca ttatgtggcg ggcggcgtgg aagaaaaaga tgaaaaaaaa    1380
ggaggaggag gatccggcgg cggcggtcc atggcaccct ataccgtaa attgatcacc    1440
cccgatggtg aaagtccat cgaatgctct gacgatacct ataccctcga tgcgtcggaa    1500
gaagctggcc tagacctgcc ctattcctgc cgtgctgggg cttgctccac ctgtgccggt    1560
aagatcaccg ctggtagtgt tgaccaatcc gatcagcttt tcttggatga tgaccaaat    1620
gaagctggtt atgttttgac ctgtgtagct tatccacct ccgattgcac cattgaaacc    1680
cacaagaag aagagctcac cgcataa                                     1707

```

<210> 24
 <211> 1584
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Dúo pET Hid E + A Cr Fd C' truncado N' truncado y sin enlazador

10

<400> 24

ES 2 525 805 T3

```

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaaa agatctgaaa acctgtatTT tcagggcgct      60
gctcctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcgga actggcgaaa      120
ccgaaagatg atccgacccg taagcatgtg tgcgtgcagg tggcgccggc ggtgctgtg      180
gcgatcgcgg aaaccctggg cctggcgccg ggcgcgacca ccccgaaaca gctggcgga      240
ggcctgcgtc gtctgggctt tgatgaagtg ttcgataccc tgtttggcgc ggatctgacc      300
atcatggaag aaggcagcga actgctgcat cgtctgaccg aacatctgga agcgcataccg      360
catagcgatg aaccgctgcc gatgTTtacc agctgctgcc cgggctggat tgcgatgctg      420
gaaaaaagct atccggatct gattccgtat gtgagcagct gcaaaagccc gcagatgatg      480
ctggcgggca tggTgaaaag ctatctggcg gaaaaaaaag gcattgcgcc gaaagatatg      540
gtgatggTga gcattatgcc gtgcaccogt aaacagagcg aagcggatcg tgattgTtc      600
tgcgtggatg cggatccgac cctcgcTcag ctggatcatg tgattaccac cgtggaactg      660
ggcaacattt ttaaagaacg tggcattaac ctggcggaac tgccggaagg cgaatgggat      720
aacccgatgg gcgtgggcag cggcgcgggc gtgctgtTcg gcaccaccgg cggcgtgatg      780
gaagcggcgc tgcgtaccgc gtatgaactg tttaccggca ccccgctgcc gcgtctgagc      840
ctgagcgagg tgcgtggcat ggatggcatt aaagagacca acattaccat ggtgcocggc      900
ccgggcagca aatttgaaga actgctgaaa catcgtgcgg cggcgctgc ggaagcggcg      960
gcgatggca ccccgggccc gctggcgtg gatggcgcg cgggctttac cagcgaagat      1020
ggcctggcg gcattaccct gcgtgtggcg gtggcgaacg gcctgggcaa cgcgaaaaaa      1080
ctgattacca aaatgcagc gggcgaagcg aaatatgatt ttgtggaat tatggcgtgc      1140
ccggcgggct gcgtggcg cggcgccag ccgcgtagca ccgataaac gatcaccocag      1200
aaacgtcagg cggcgtgta taacctggat gagaagagca cctgcgtcg tagccatgag      1260
aacccgagca ttcgtgaact gtatgatacc tatctggcg aaccgctggg ccataaagcg      1320
catgaactgc tgcataccca ttatgtggac gatacctata tctcgtgc tgcggaagaa      1380
gctggcctag acctgccta ttctgccgt gctggggctt gctccacctg tgccggtaag      1440
atcaccgctg gtagtgttga ccaatccgat cagtcttTct tggatgatga ccaattgaa      1500

gctggttatg tttgacctg ttagcttat ccacctccg attgcacat tgaaccocac      1560
aaagaagaag agctcaccgc ataa      1584

```

5 <210> 25
 <211> 1644
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Dúo pET Hid E + A Cr Fd C' truncado sin enlazador
 <400> 25

ES 2 525 805 T3

```

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaaa agatctgaaa acctgtatatt tcagggcgct      60
gctcctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcgga actggcgaaa      120
ccgaaagatg atccgaccgg taagcatgtg tgcgtgcagg tggcgccggc ggtgctgtg      180
gcatgctggg aaaccctggg cctggcgccg ggcgogacca ccccgaaaca gctggcgaaa      240
ggcctgctgc gtctgggctt tgatgaagtg ttcgataccc tgtttggcgc ggatctgacc      300
atcatggaag aaggcagcga actgctgcat cgtctgaccg aacatctgga agcgcacccg      360
catagcgatg aaccgctgcc gatgtttacc agctgctgcc cgggctggat tgcgatgctg      420
gaaaaaagct atccgatct gattccgtat gtgagcagct gcaaaaagccc gcagatgatg      480
ctggcggcga tggtgaaaaa ctatctggcg gaaaaaaaaa gcattgcgcc gaaagatatg      540
gtgatggtga gcattatgoc gtgcacccgt aaacagagcg aagcggatcg tgattggttc      600
tgcgtggatg cggatccgac cctgcgtcag ctggatcatg tgattaccac cgtggaactg      660
ggcaacattt ttaaagaacg tggcattaac <gtggcggaac tgccggaagg cgaatgggat      720
aaccgatgag gogtgggcag cggcgcgggc gtgctgttcg gcaccaccgg cggcgtgatg      780
gaagcggcgc tgcgtaccgc gtatgaaactg tttaccggca ccccgctgcc gcgtctgagc      840
ctgagcgagg tgcgtggcat ggatggcatt aaagagacca acattaccat ggtgccggcg      900
ccgggcagca aatttgaaga actgctgaaa catcgtgcgg cggcgcgtgc ggaagcggcg      960
gcatgctgca ccccgggccc gctggcgtgg gatggcggcg cgggctttac cagcgaagat     1020
ggcgtgctgc gcattaccct gcgtgtggcg gtggcgaacg gcctgggcaa cgcgaaaaaa     1080
ctgattacca aaatgcaggc gggcgaagcg aaatatgatt ttgtggaaat tatggcgtgc     1140
ccggcgggct gcgtggggcg cggcggccag ccgcgtagca ccgataaagc gatcaccacg     1200
aaacgtcagg cggcgtgta taacctggat gagaagagca cctgcgtcg tagccatgag     1260
aaccgagca ttcgtgaaact gtatgatacc tatctggcgg aaccgctggg ccataaagcg     1320
catgaaactgc tgcataccca ttatgtgatg gcacccctata ccgttaaatt gatcaccccc     1380
gatggtgaaa gttccatcga atgctctgac gataccctata tccctgatgc tgcggaagaa     1440
gctggcctag acctgcceta ttcctgcctg gctggggctt gctccacctg tgcgggtaag     1500
atcaccgctg gtatgtttga ccaatccgat cagtctttct tggatgatga ccaaattgaa     1560
gctggttatg ttttgacctg tgtagcttat cccacctccg attgcacatc tgaaaaccac     1620
aaagaagaag agctcaccgc ataa                                             1644

```

- 5 <210> 26
- <211> 1617
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Dúo pET Hid E + A Cr Fd N' truncado
- <400> 26

ES 2 525 805 T3

atgggctgga gccatccgca gtttgaaaa agatctgaaa acctgtattt tcagggcgct 60
 gctcctgctg ctgaagcgcc gctgagccat gtgcagcagg cgctggcgga actggcgaaa 120
 ccgaaagatg atccgaccgg taagcatgtg tgcgtgcagg tggcgccggc ggtgcgtgtg 180
 gcgatcgagg aaacctggg cctggcgccg ggcgcgacca ccccgaaaca gctggcgaaa 240
 ggctgctgct gtctgggctt tgatgaagtg ttcgataccc tgtttggcgc ggatctgacc 300
 atcatggaag aaggcagcga actgctgcat cgtctgaccg aacatctgga agcgcacccg 360
 catagcgatg aaccgctgcc gatgtttacc agctgctgcc cgggctggat tgcgatgctg 420
 gaaaaaagct atccgatct gattocgtat gtgagcagct gcaaaaagccc gcagatgatg 480
 ctggcgcgga tgggtgaaaag ctatctggcg gaaaaaaaag gcattgcgcc gaaagatag 540
 gtgatggtga gcattatgcc gtgcacccgt aaacagagcg aagcggatcg tgattggttc 600
 tgcgtggatg cggatccgac cctgcgtcag ctggatcatg tgattaccac cgtggaactg 660
 ggcaacattt ttaaagaacg tggcattaac ctggcggaac tgccggaagg cgaatgggat 720
 aaccggatgg gcgtggcgag cggcgcgggc gtgctgttcg gcaccaccgg cggcgtgatg 780
 gaagcggcgc tgcgtaccgc gtatgaaactg tttaccggca ccccgctgcc gcgtctgagc 840
 ctgagcgagg tgcgtggcat ggatggcatt aaagagacca acattaccat ggtgccggcg 900
 ccggcgagca aatttgaaga actgctgaaa catcgtcggg cggcgcgctgc ggaagcggcg 960
 gcgcatggca ccccgggccc gctggcgtgg gatggcggcg cgggetttac cagcgaagat 1020
 ggccgtggcg gcattaccct gcgtgtggcg gtggcgaacg gcctgggcaa cgcgaaaaaa 1080
 ctgattacca aaatgcagcg gggcgaagcg aaatatgatt ttgtggaaat tatggcgtgc 1140
 ccggcgggct gcgtggcgcg cggcggccag ccgcgtagca ccgataaagc gatcaccag 1200
 aaacgtcagg cggcgctgta taacctggat gagaagagca ccctgcgtcg tagccatgag 1260
 aaccggagca ttcgtgaaact gtatgatacc tatctggcgg aaccgctggg ccataaagcg 1320
 catgaaactgc tgcataccca ttatgtggcg ggcggcgtgg aagaaaaaga tgaaaaaaa 1380
 gacgatacct atatcctcga tgctcgggaa gaagctggcc tagacctgcc ctattcctgc 1440
 cgtgctgggg cttgctccac ctgtgccggg aagatcaccg ctggtagtgt tgaccaatcc 1500
 gatcagcttt tcttgatga tgaccaaat gaagctggtt atgttttgac ctgtgtagct 1560
 tatcccact ccgattgcac cattgaaacc cacaagaag aagagctcac cgcataa 1617

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula cianobacteriana que comprende una proteína de fusión de la subunidad IX del centro de reacción del Fotosistema I (PsaJ) y el precursor de la subunidad III del centro de reacción del Fotosistema I (PsaF), en el que dicho PsaF está truncado por al menos diez aminoácidos en su extremo N y en el que dicho complejo PSI acepta electrones de al menos un citocromo respiratorio, comprendiendo adicionalmente la célula una enzima hidrogenasa unida a una ferredoxina heteróloga.
- 10 2. La célula de la reivindicación 1, que es termófila.
3. La célula de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha proteína de fusión es al menos el 80 % idéntica a la expuesta en la SEC ID N°: 1.
- 15 4. La célula de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha fusión es como se expone en la SEC ID N°: 1.
5. La célula de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha subunidad PsaF se expone en la SEC ID N°: 14
- 20 6. La célula de la reivindicación 1, en la que un polinucleótido que codifica dicha proteína de fusión está insertado en el genoma de la célula.
7. La célula de la reivindicación 1, que produce hidrógeno a una temperatura por encima de aproximadamente 55 °C.
- 25 8. Un polinucleótido aislado, que codifica un polipéptido como se expone en la SEC ID N°: 1.
9. El polinucleótido aislado de la reivindicación 8 como se expone en la SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 6.
- 30 10. La célula de la reivindicación 1, en la que dicho al menos un citocromo respiratorio es el citocromo C o el citocromo M.
11. La célula de la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión es una proteína recombinante.
- 35 12. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80 % idéntica a la secuencia como se expone en la SEC ID N°: 1.
13. El polipéptido aislado de la reivindicación 12, que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 1.
- 40 14. Un biorreactor para producir hidrógeno, que comprende
- (i) una tubería que comprende las células de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 10 y 11, en el que una primera sección de dicha tubería se coloca en un primer depósito que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 60-70 °C y una segunda sección de dicha tubería se coloca en un segundo depósito que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 30-50 °C;
- 45 (ii) una bomba de recirculación configurada de tal manera que dichas células circulan a través de dicha tubería.
- 50 15. Un método para producir gas hidrógeno, comprendiendo el método cultivar la célula cianobacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 10 y 11 en condiciones que generen gas hidrógeno en la célula cianobacteriana, produciendo de este modo gas hidrógeno.

FIG. 1A

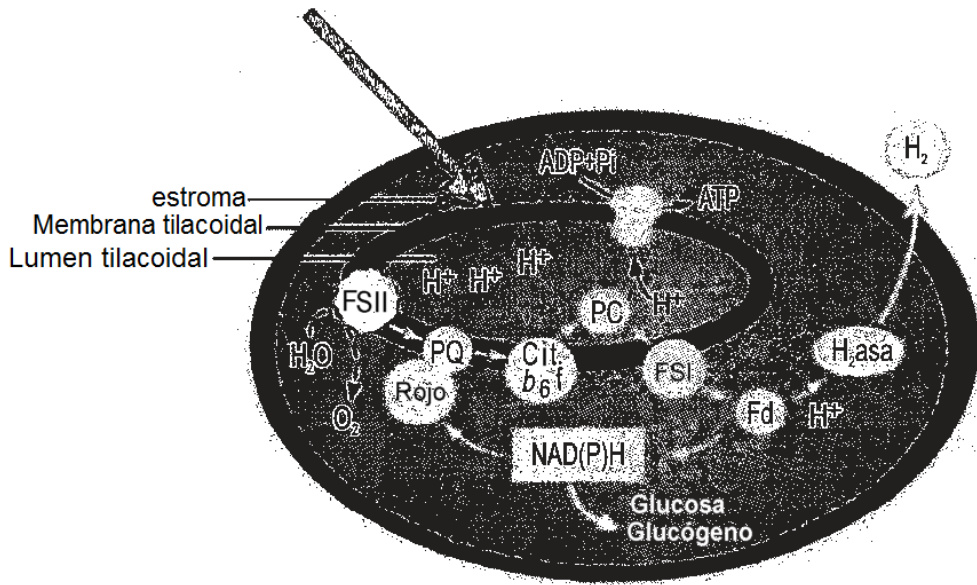
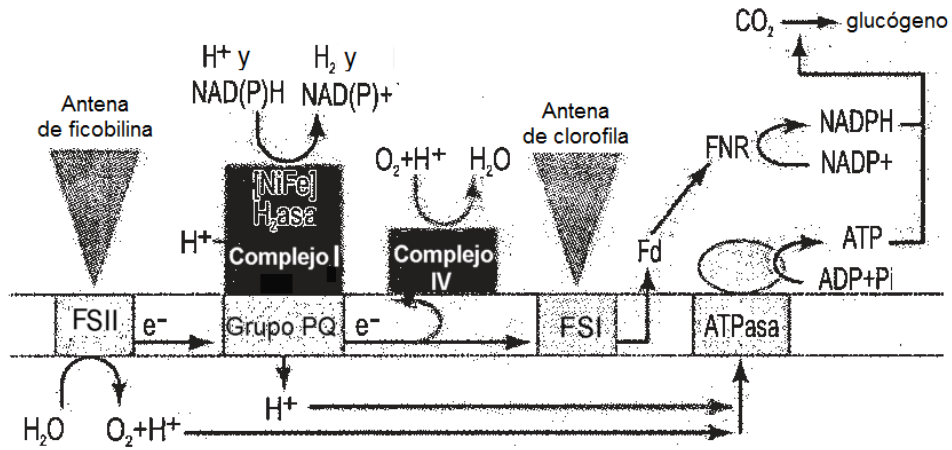


FIG. 1B

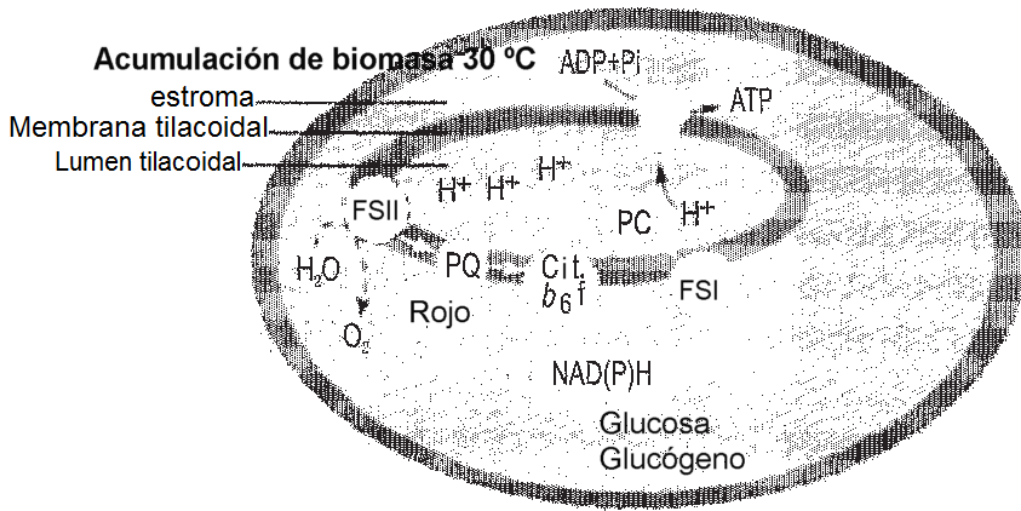


FIG. 2A

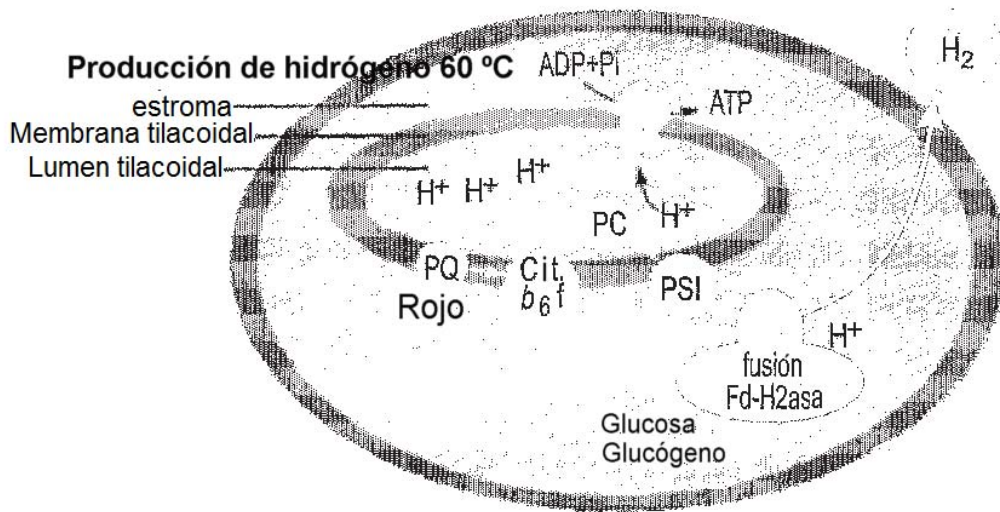


FIG. 2B

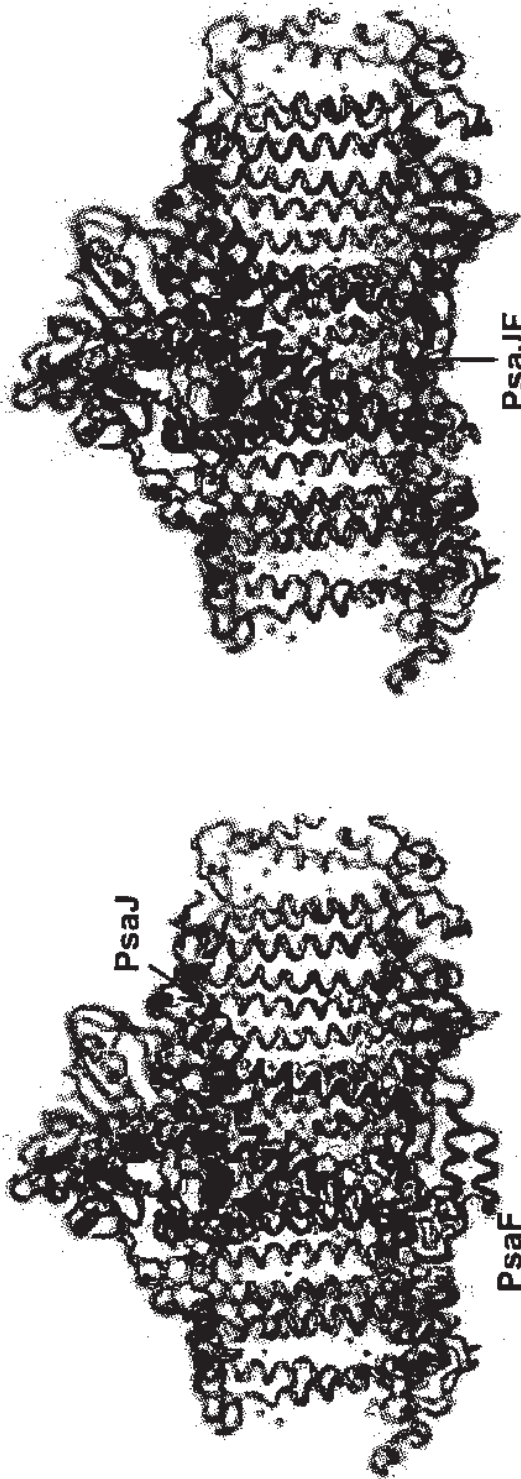


FIG. 3A

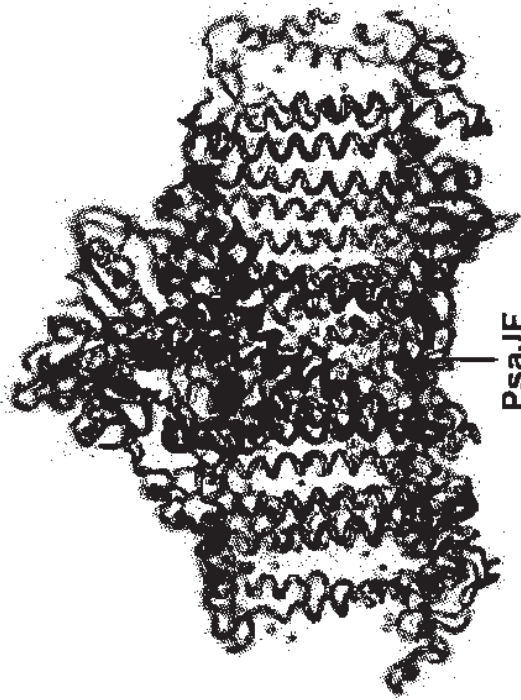


FIG. 3B

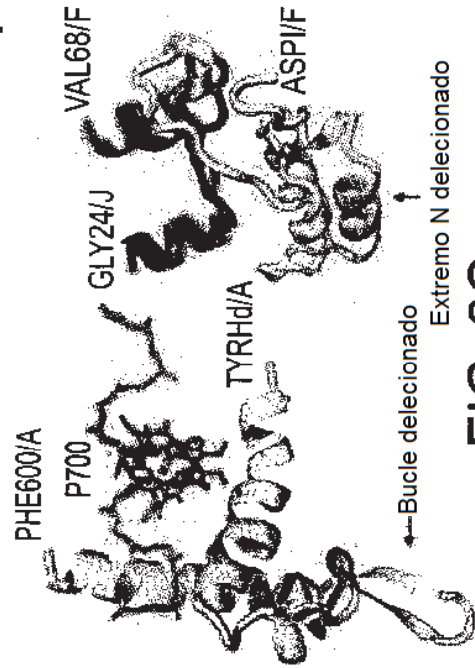


FIG. 3C

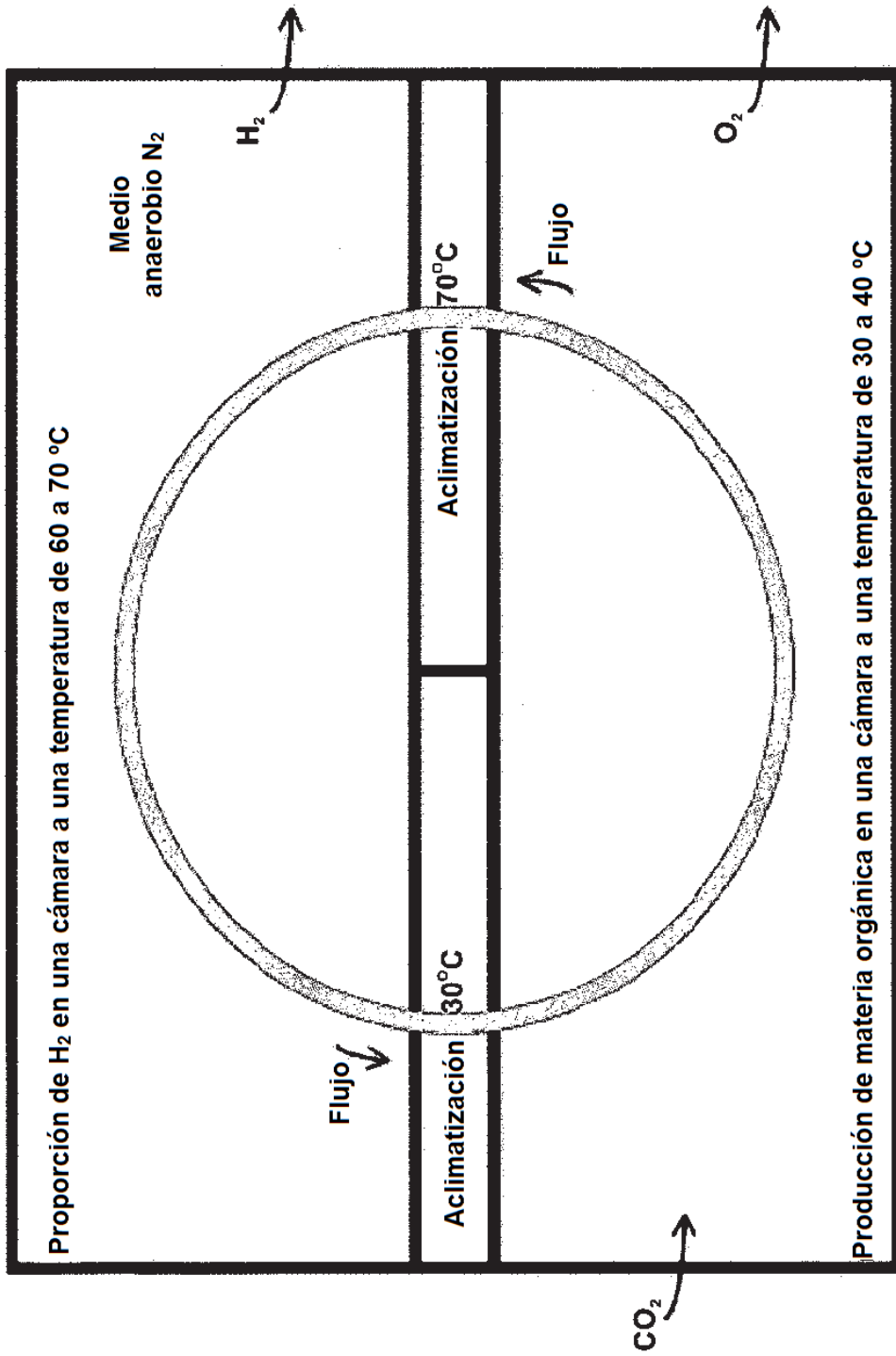


FIG. 4

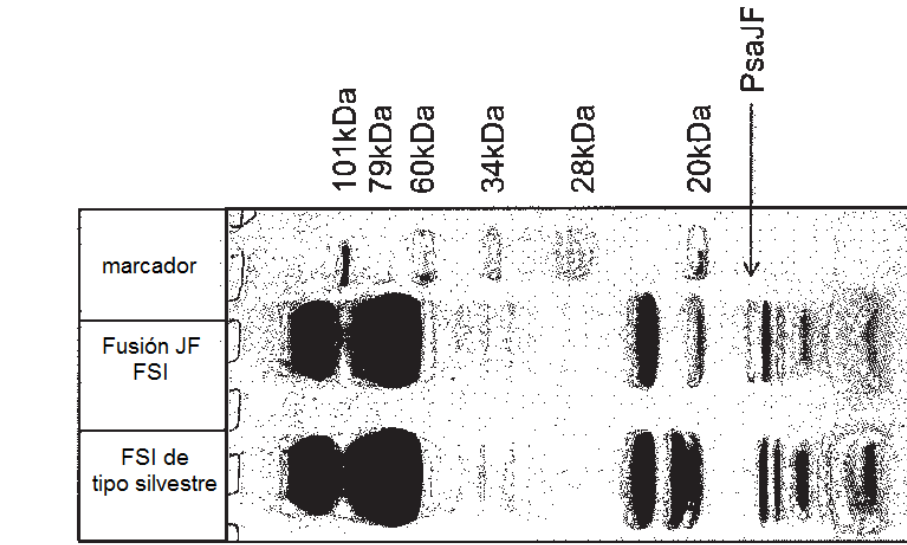
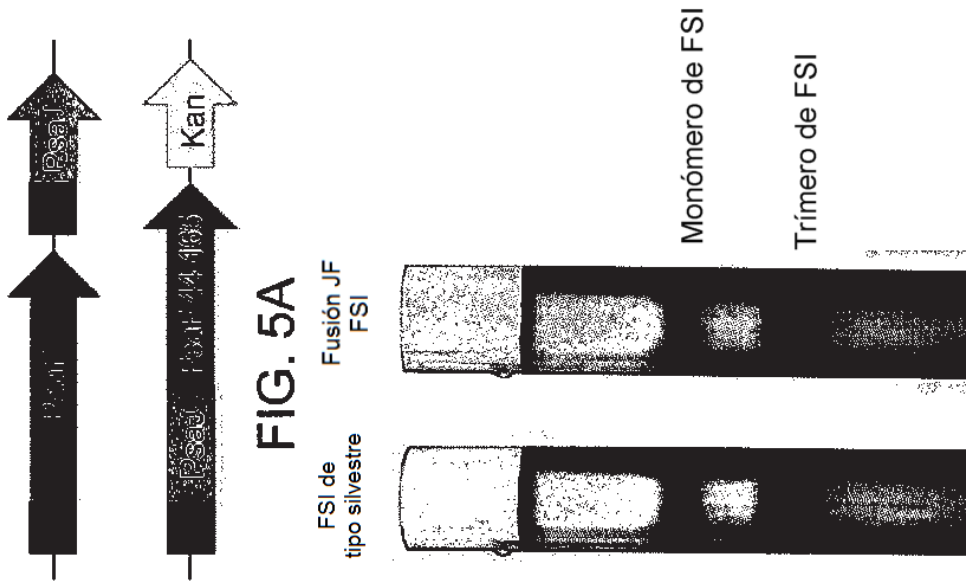


FIG. 5C



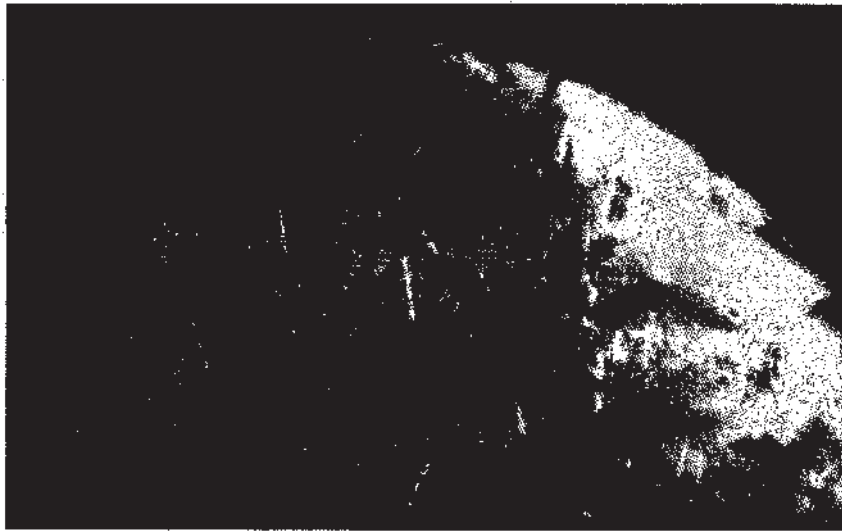


FIG. 6

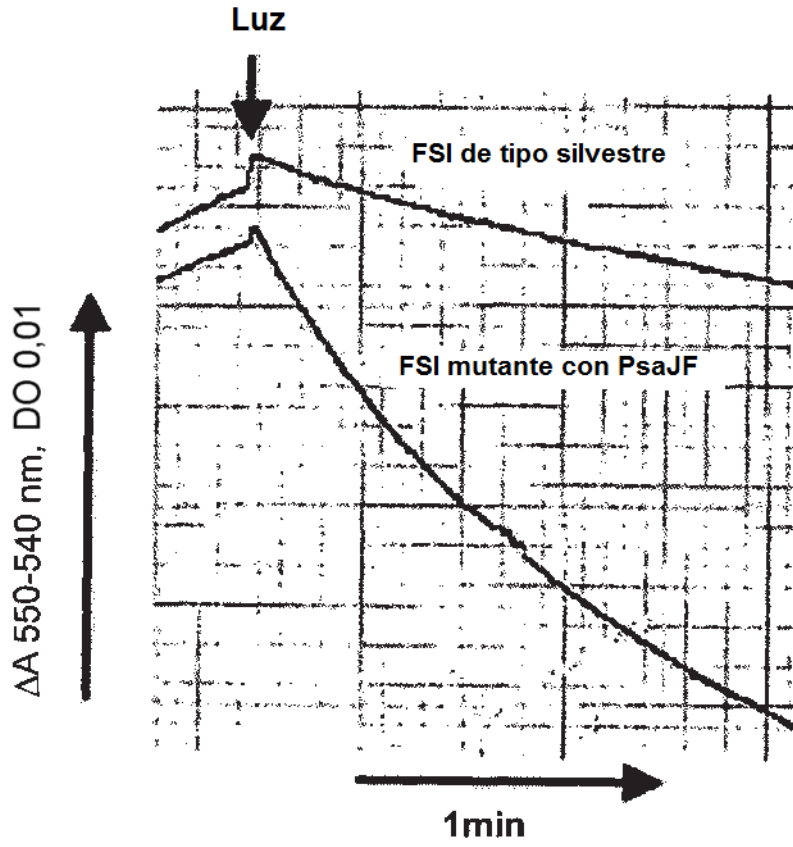


FIG. 7

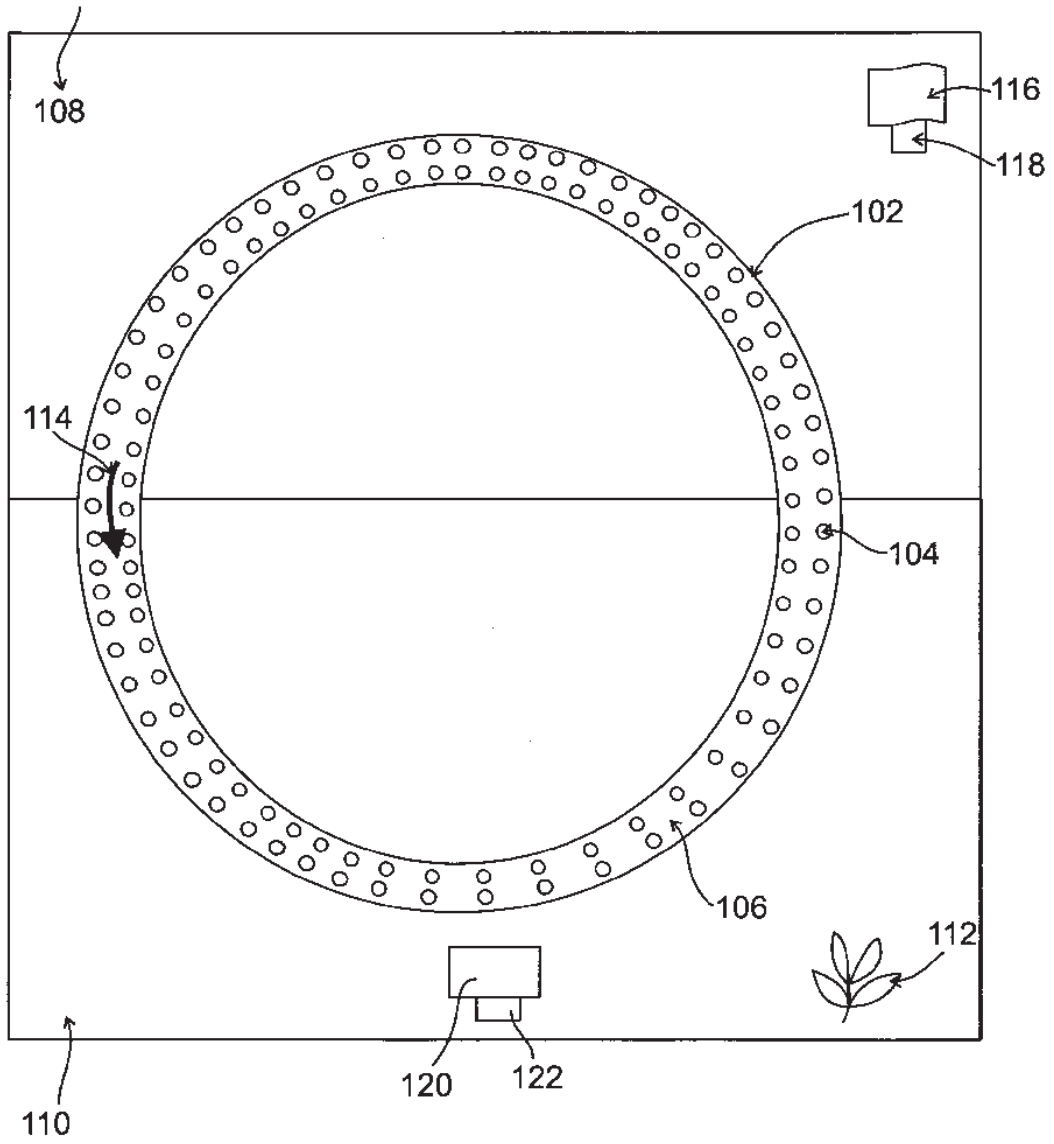


FIG. 8

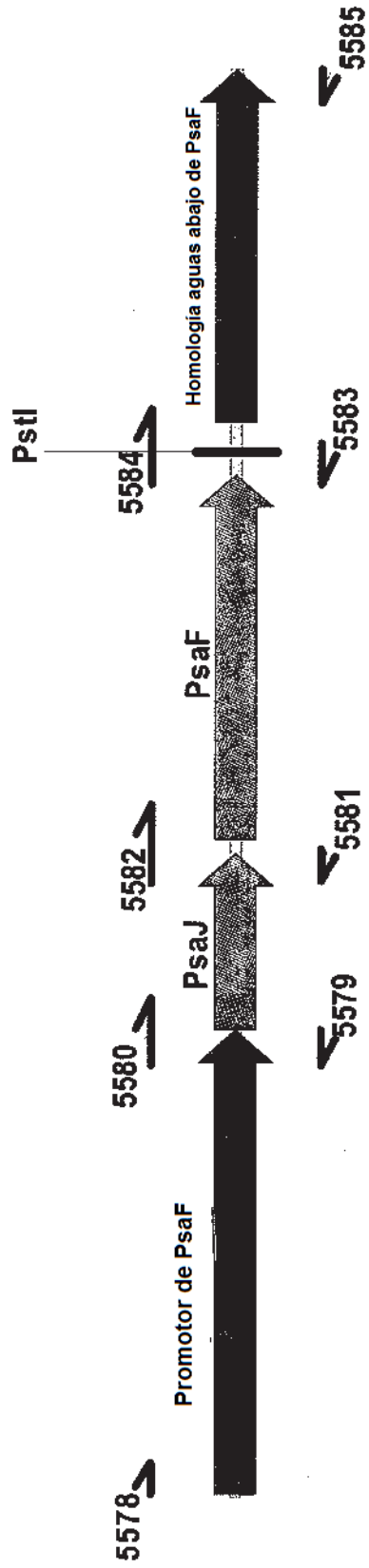


FIG. 9