

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 259**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 06847293 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 1957666**

54 Título: **Uso de 4'-fosfopanteteinil transferasa como diana para identificar moléculas de anticuerpo**

30 Prioridad:

08.12.2005 EP 05292610

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

18.02.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR y

**UNIVERSITÉ PAUL SABATIER (TOULOUSE III)
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHALUT, CHRISTIAN y
GUILHOT, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

ES 2 529 259 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

Uso de 4'-fosfopanteteinil transferasa como diana para identificar moléculas de anticuerpo

La cubierta celular desempeña un papel importante en la fisiología de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de tuberculosis en seres humanos, una enfermedad que sigue siendo responsable de más muertes que ningún otro agente infeccioso individual. En primer lugar, esta estructura compleja proporciona una fuerte resistencia a la degradación por enzimas del hospedador y una barrera de permeabilidad para antibióticos y moléculas tóxicas producidas por el hospedador. En segundo lugar, contiene componentes que ejercen un efecto activo para facilitar la captación de la bacteria y para modular la respuesta inmunitaria del hospedador (Daffé y Draper, 1998). La cubierta micobacteriana se caracteriza por un contenido muy alto de lípidos (60 % del peso seco) y la aparición de lípidos con estructuras inhabituales (Daffé y Draper, 1998). Los constituyentes lipídicos principales de esta pared celular son los ácidos micólicos. Estas moléculas se encuentran específicamente en el suborden *Corynebacterineae*, que incluye corinobacterias, micobacterias, nocardias o rodococos, donde existen como ésteres de trehalosa o esterificados con el núcleo de arabinogalactano de la pared celular bacteriana (Daffé y Draper, 1998; Daffé, 2005). Todos los ácidos micólicos consisten en α -alquil- β -hidroxiácidos grasos ramificados, pero su tamaño y su estructura difieren según la especie bacteriana (Asselineau *et al.*, 2002). Por ejemplo, los ácidos micólicos micobacterianos están compuestos por cadenas de carbono muy largas (C_{60} - C_{90}) que contienen motivos adicionales tales como funciones oxígeno, anillos de ciclopropilo o ramificaciones de metilo, mientras que *Corynebacteria* spp produce una mezcla de ácidos corinomicólicos saturados e insaturados que oscilan típicamente en tamaño de 30 a 36 carbonos. Los ácidos micólicos son componentes estructurales clave de la cubierta celular y su ruta de biosíntesis es la diana del importante fármaco antituberculoso isoniazida (Banerjee *et al.*, 1994). Se ha encontrado que la estructura del micolato es crítica para la replicación inicial y persistencia *in vivo* (Takayama *et al.*, 2005). En micobacterias de crecimiento lento, los ácidos micólicos están asociados a una serie de lípidos extraíbles que contienen ácidos grasos ramificados con metilo (Minnikin *et al.*, 2002). Diversos estudios han mostrado que algunos de estos compuestos, tales como los dimicocerosatos de ftiocerol (DIM) y glicolípido fenólico (PGL-tb), contribuyen a la patogenia de *M. tuberculosis* (Camacho *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2004).

La biosíntesis de los diversos e inhabituales lípidos de *M. tuberculosis* implica la acción combinada de sistemas de ácido graso sintasa (Fas) y policétido sintasas de tipo I (Pks). Por ejemplo, la formación de micolatos requería dos sistemas Fas y una Pks: Fas-I, una proteína multifuncional, está dedicada a la producción de ácidos grasos cortos $C_{16,18}$; Fas-II, un complejo de proteínas monofuncionales, alarga los ácidos grasos generados por Fas-I, proporcionando ácidos grasos de cadena larga de longitud que oscila de C_{48} a C_{64} ; Pks13 cataliza la condensación de dos ácidos grasos, formando ácidos micólicos (Takayama *et al.*, 2005; Portevin *et al.*, 2004). La biosíntesis de DIM y PGL-tb requiere Fas-I y 7 Pks (Onwueme *et al.*, 2005). Finalmente, Fas-I y Pks2 o Pks3/4 están implicadas en la formación de diversos ácidos grasos ramificados multimetílicos encontrados en los lípidos derivados de trehalosa específicos de *M. tuberculosis* (Sirakova *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2002). Globalmente, el genoma de *M. tuberculosis* codifica más de 18 Pks de tipo I y dos sistemas Fas (Cole *et al.*, 1998). Estas enzimas son los actores clave que dotan a *M. tuberculosis* con la capacidad única de producir una variedad impresionante de lípidos de estructura única.

Para ser funcionales, los dominios de proteína portadora de acilo (ACP) de Fas y Pks tienen que convertirse desde sus apoformas inactivas a sus holoformas funcionales mediante la unión covalente de un grupo 4'-fosfopanteteína (P-pant) a un grupo hidroxilo de un residuo de serina invariable (Walsh *et al.*, 1997; Keating y Walsh, 1999). El papel de este brazo protésico flexible es proporcionar un sitio de unión para intermedios de extensión de cadena y transportar las cadenas en crecimiento entre los diferentes sitios catalíticos de los complejos de sintasa (Cane y Walsh, 1999). Este rasgo es compartido por otra clase de enzimas, las péptido sintasas no ribosómicas (NRPS), que están implicadas en la producción de sideróforos en *M. tuberculosis* (De Voss *et al.*, 1999). Esta modificación postraducciona se cataliza por una 4'-fosfopanteteinilo transferasa (PPTasa) que transfiere el grupo P-pant desde la coenzima A (CoA) al ACP (Lambalot *et al.*, 1996). Las PPTasas se han identificado y caracterizado bioquímicamente en una serie de microorganismos y se han clasificado en tres grupos basándose en la similitud de secuencia primaria y la especificidad de sustrato (Wiessman *et al.*, 2004 y referencias en el mismo). Los miembros del primer grupo ejemplificado por la holo(proteína portadora de acilo) sintasa (AcpS) de *Escherichia coli* son de aproximadamente 120 residuos de tamaño y actúan como homotrimeros (Parris *et al.*, 2000). Estas PPTasas de tipo AcpS tienen una especificidad de sustrato estrecha limitada al ACP de Fas de tipo II y sistemas Pks (Mootz *et al.*, 2001). El segundo grupo comprende PPTasas que se parecen a la proteína Sfp (fosfopanteteinil transferasa de surfactina), una PPTasa necesaria para la producción del antibiótico surfactina en *Bacillus subtilis* (Quadri *et al.*, 1998a). Estas PPTasas de tipo Sfp son de aproximadamente el doble de tamaño que aquellas del primer grupo (220-240 residuos) y existen en forma monomérica (Mofid *et al.*, 2004). Están a menudo asociadas a genes que codifican la producción de metabolitos secundarios, pero exhiben especificidades de sustrato muy amplias y son habitualmente capaces de modificar tanto los dominios ACP de tipo I y tipo II como de proteína portadora de peptidilo (PCP) (Weissman *et al.*, 2004; Quadri *et al.*, 1998a). Las PPTasas del tercer grupo se incorporan como un dominio catalítico a Fas de tipo I y permiten la autofosfopanteteinilación del dominio ACP de la proteína (Fichtischerer *et al.*, 2000).

Habitualmente, las bacterias contienen más de una PPTasa dedicada a una o varias rutas dependientes de P-pant. Por ejemplo, *E. coli* tiene tres PPTasas (Lambalot *et al.*, 1996), AcpS implicada en la síntesis de ácidos grasos, EntD

una PPTasa de tipo Sfp implicada en la biosíntesis del sideróforo enterobactina, y el producto del gen *yhhU* que tiene una función fisiológica desconocida. Se ha mostrado que AcpS es esencial para la viabilidad celular, pero no EntD (Flugel *et al.*, 2000). En contraposición, en *Bacillus subtilis* que tiene dos PPTasas, Sfp puede complementar la actividad de AcpS y mantener la biosíntesis de ácidos grasos después de la inactivación de *acpS* (Mootz *et al.*, 2001).

En su análisis inicial del genoma de *M. tuberculosis*, Cole *et al.* (1998) identificaron a *Rv2523c* como un gen que codifica una presunta PPTasa relacionada con AcpS. Al mismo tiempo, se descubrió una segunda PPTasa en *M. tuberculosis* por Quadri *et al.* (1998b), quienes encontraron que *Rv2794c* codifica una PPTasa de tipo Sfp, renombrada PptT, que era capaz de activar *in vitro* dos NRPS necesarias para el ensamblaje del sideróforo micobactina. Sin embargo, a pesar de la importancia del sistema Fas-I y las Pks de tipo I para la biología de *M. tuberculosis*, no se han reseñado datos referentes a la modificación postraduccional de estas enzimas en micobacterias. Se han identificado dos PPTasas que serían responsables de la activación de más de 20 proteínas en *M. tuberculosis*, pero sus repertorios respectivos de sustratos, su presunta redundancia y su importancia para la biología micobacteriana no se han investigado anteriormente. Responder a estas preguntas es crucial para entender la biosíntesis de lípidos en *M. tuberculosis*.

Los inventores han encontrado ahora que se encuentran ortólogos de las dos PPTasas de *M. tuberculosis* identificadas anteriormente en otras especies de *Corynebacterineae*. Han demostrado que ambas PPTasas son esenciales para el crecimiento de micobacterias y ostentan funciones idénticas en micobacterias y corinobacterias: AcpS es responsable de la modificación postraduccional de Fas-I y PptT, la PPTasa de tipo Sfp, está implicada en la activación de la enzima condensadora Pks13. Además, han mostrado que las diversas Pks de tipo I necesarias para la formación de factores de virulencia lipídicos se activan por PptT en *M. tuberculosis*. La implicación de PptT de *M. tuberculosis* en varias rutas dependientes de P-pant esenciales para el crecimiento o la virulencia la hace una diana potencial atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos antimicobacterianos.

Es por tanto un primer aspecto de la presente invención el uso de una proteína PptT según la reivindicación 1 como diana para cribar compuestos para identificar aquellos que tienen actividad antibiótica. Según esta invención, dicha proteína PptT es preferiblemente de una bacteria patogénica que contiene ácidos micólicos, y más preferiblemente una corinobacteria, una micobacteria o una nocardia. Por ejemplo, la proteína PptT es de una bacteria seleccionada del grupo consistente en *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium xenopi*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova* y *Nocardia otitidiscaviarum*. En particular, pueden usarse las proteínas PptT de SEQ NO: 2 a 9 según la invención.

Por supuesto, las proteínas de fusión correspondientes a una proteína PptT como se describe anteriormente, fusionadas con un resto peptídico que posibilite su más fácil purificación sin modificar su actividad, se consideran también en la presente memoria como proteínas PptT.

La presente invención hace referencia también a un proceso de cribado *in vitro* según la reivindicación 5 para identificar compuestos que tienen actividad antibiótica, midiendo la actividad de una proteína PptT en presencia o ausencia de dichos compuestos.

En un proceso según la invención, la actividad de PptT puede medirse (i) incubando una PptT aislada con una proteína Pks o subunidad de la misma que comprende un dominio de proteína portadora de acilo, y con una acetil-CoA marcada, (ii) precipitando dicha proteína Pks o subunidad de la misma y (iii) midiendo el nivel de marcaje de dicho precipitado. Puede usarse cualquier proteína PptT en dicha prueba como se describe anteriormente.

La presente invención se ilustra mediante los resultados experimentales y las figuras descritas a continuación.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Construcción de mutantes de *M. smegmatis*. Representación esquemática de la organización genómica del locus *acpS* en la cepa WT de *M. smegmatis*, la cepa PMM68 merodiploica y el mutante condicional PMM77 ($\Delta acpS::km:pC-acpSms$) (A) y del locus *pptT* en las cepas WT de *M. smegmatis*, la cepa PMM70 merodiploica y el mutante condicional PMM78 ($\Delta pptT::km:pC-pptTms$) (B). Los recuadros negros representan los genes *acpS* (A) y *pptT* (B), y los recuadros blancos representan las regiones flanqueantes 5' y 3' amplificadas por PCR para construir los mutantes. El módulo resistente a Km usado para la interrupción orientada y el gen *sacB* se representan por recuadros grises y rayados, respectivamente. Se muestran las posiciones y nombres de los cebadores (flechas) usados para la caracterización de mutantes y se indican los tamaños esperados de los productos de PCR debajo de cada estructura genética. (C) Se analizaron las cepas recombinantes PMM77 (panel izquierdo) y PMM78 (panel derecho) por PCR usando diversas combinaciones de cebadores como se indica.

Figura 2: Termosensibilidad de mutantes condicionales de *M. smegmatis* y complementos genéticos con los genes *acpS* y *pptT* de *C. glutamicum*. Se hicieron crecer WT, PMM77 ($\Delta acpS::pC-acpSms$) y PMM78 ($\Delta pptT::pC-pptTms$) de

M. smegmatis (A) y WT, PMM84 ($\Delta acpS::pC-acpScg$) y PMM85 ($\Delta pptT::pC-pptTcg$) de *M. smegmatis* (B) en LB (con Km y Str para las cepas recombinantes) a 30 °C y se sembraron en estrías sobre placas de agar LB que se incubaron durante 2 días a 30 °C (paneles izquierdos) o 42 °C (paneles derechos), una temperatura no permisiva para la replicación de plásmido.

5 **Figura 3:** Análisis bioquímico de la cubierta celular de las cepas recombinantes de *C. glutamicum* $\Delta acpS::km$ y $\Delta pptT::km$. (A) Se prepararon los ácidos grasos y ácidos micólicos producidos por WT de *C. glutamicum*, los diversos mutantes y las cepas complementadas a partir de células y se separaron por TLC analítica en Durasil 25TLC (Macherey-Nagel) con diclorometano. Se visualizaron los lípidos pulverizando las placas con ácido fosfomolibdico al 10 % en etanol, seguido de calentamiento. (B) Se analizaron los derivados de trimetilsililo de ésteres metílicos de ácido graso de WT, $\Delta acpS$, $\Delta pptT$, $\Delta pptT::pCGL-pptTms$ de *C. glutamicum* mediante CG como se describe en Constant *et al.* (2002). Para cada cromatograma, se amplía la porción entre 36 y 44 min. Se indican los picos correspondientes a ácidos grasos C₁₆, C₁₈ y corinomicolatos C₃₂, C_{34:1}, C_{36:2}. (C) Se analizó por CG-EM el derivado de trimetilsililo de corinomicolato C_{36:2} de $\Delta acpS$ de *C. glutamicum* (mostrado por una flecha en B). Se muestran a la derecha los orígenes de los diversos picos de fragmentos iónicos principales del espectro de masas por impacto electrónico.

15 **Figura 4:** Ensayos de marcaje de 4'-fosfopanteteinilación que usan β -[β -¹⁴C]alanina. (A) Se cultivaron WT, $\Delta pptT$ y $\Delta pks13$ de *C. glutamicum* en presencia de β -[β -¹⁴C]alanina y se separaron las proteínas del extracto celular de cada cepa por PAGE-SDS. Se tiñó el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie (panel inferior) y se expuso a película de rayos X para autorradiografía (panel superior). Las posiciones de Pks13 y Fas-I se indican por flechas y puntas de flecha, respectivamente. M, marcadores metilados con ¹⁴C (220, 97,4, 66, 46, 30, 21,5, 14,3 kDa) (Sigma). (B-C) Se hicieron crecer cepas de BL21 $\Delta entD$ de *E. coli* que expresan Pks13 o Pks13* mutadas (Pks13, S55A y S1266A) de *M. tuberculosis* (B) o diversas Pks de tipo I de *M. tuberculosis* (C) con la PptT de tipo silvestre (indicado por + sobre cada figura) de *M. tuberculosis* o la PPTasa codificada por $PptT$ mutada (indicado por – sobre cada figura) en presencia de β -[β -¹⁴C]alanina. Después de la sobreexpresión, se separaron las proteínas del extracto celular de cada cepa por PAGE-SDS y se tiñeron los gels de poliacrilamida con azul de Coomassie [paneles inferiores (B) y (C)] y se expusieron a película de rayos X para autorradiografía [paneles superiores (B) y (C)]. Las posiciones de Pks13, Pks13* (B), Mas, PpsA, PpsB, PpsC y PpsD (C) se indican por flechas. M, marcadores metilados con ¹⁴C.

20 **Figura 5:** Representación esquemática del papel desempeñado por AcpS y PptT en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos, ácidos micólicos, lípidos asociados ramificados con metilo y sideróforos en *M. tuberculosis*. Solo se indican las proteínas que requieren 4'-fosfopanteteinilación en estas rutas. Las proteínas activadas con AcpS se recuadran por rectángulos y las proteínas modificadas por AcpS por óvalos. p-HBA, ácido para-hidroxibenzoico, SL-1, sulfolípidos 1, PAT, poliactilrehalosas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: procedimientos experimentales

35 **Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

Se hicieron crecer las cepas DH5 α y C600 de *E. coli* usadas para experimentos de clonación en caldo Luria Bertani (LB) (Difco). Se cultivó *C. glutamicum* en medio de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Difco) que contiene un 0,05 % de Tween 80 para evitar la agregación. Se hizo crecer el mutante $\Delta acpS::km$ de *C. glutamicum* en medio BHI suplementado con 0,03 % de Tween 40 y 0,03 % de oleato de sodio (peso/volumen) (Sigma). Se hizo crecer *M. smegmatis* en caldo LB suplementado con 0,05 % de Tween 80. Cuando se necesitaron, se usaron ampicilina (Amp), kanamicina (Km), cloranfenicol (Cln), estreptomycin (Str), higromicina (Hyg) y sacarosa a una concentración final de 100 μ g/ml, 40 μ g/ml (para *E. coli*) o 25 μ g/ml (para *M. smegmatis* y *C. glutamicum*), 15 μ g/ml, 25 μ g/ml, 200 μ g/ml (para *E. coli*) o 50 μ g/ml (para *M. smegmatis*) y 5 % (peso/volumen), respectivamente.

45 **Construcción de plásmidos para la producción de las proteínas recombinantes PptT, Pks13, Mas y PpsA-D de M. tuberculosis en E. coli.**

Se amplificaron los genes *pks13* (Rv3800), *mas*, *ppsA*, *ppsB*, *ppsC* y *ppsD* por PCR a partir de ADN total de H37Rv de *M. tuberculosis* y se insertaron los fragmentos resultados en el vector de expresión de *E. coli* pET26b (Novagen) bajo el control del promotor T7, dando los plásmidos pWM35, pETMas, pETA, pETB, pETC y pETD, respectivamente. Estos vectores permiten la expresión de las proteínas recombinantes Pks13, Mas y PpsA-D fusionadas con un péptido marcador de polihistidina en sus extremos C-terminales en la cepa BL21 $\Delta entD$ de *E. coli*. El plásmido pWM35 γ se origina a partir de pWM35 después de mutagénesis dirigida a sitio de los dos codones correspondientes a los dos residuos catalíticos Ser55 y Ser1266, responsables de la unión del resto P-pant de CoA a los dominios ACP N- y C-terminales de Pks13. En pWM35 γ , estos codones se han sustituido por codones que codifican alanina.

55 Para coproducir PptT y las diversas Pks de *M. tuberculosis* en *E. coli*, se amplificó *pptT* (Rv2794c) a partir de ADN genómico de H37Rv de *M. tuberculosis* y se insertó en el plásmido pET26b en dirección 3' del promotor T7. Se reamplificó por PCR el gen *pptT* más 108 pb de en dirección 5' del codón de inicio, una región que porta la región

5

promotora de T7, y se clonó en el sitio *Bcl* del plásmido pLysS (Novagen), dando pLSfp. Se realizó también un vector derivado de pLSfp llamado pLSfpΔ, productor de una proteína PptT truncada no funcional, digiriendo pLSfp con *Eco*RI, que corta en el gen *pptT*. Se rellenaron los extremos de ADN con fragmento Klenow y se religó el plásmido. Se comprobaron todos estos constructos mediante secuenciación de ADN (Genome Express, Grenoble, Francia).

Las cepas y plásmidos usados en el presente estudio se resumen en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Cepas o plásmidos

Nombre	Características relevantes	Ref./fuente
Cepas		
BL21(DE3)	<i>E. coli</i>	Novagen
BL21 Δ <i>entD</i>	BL21 (DE3)Δ <i>entD</i> de <i>E. coli</i>	Este estudio
mc ² 155	<i>M. smegmatis</i>	Snapper <i>et al.</i> , 1990
PMM68	mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que alberga los alelos cromosómicos WT <i>acpS</i> y Δ <i>acpS::km</i> (primer evento de recombinación), Km ^R	Este estudio
PMM70	mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que alberga los alelos cromosómicos WT <i>pptT</i> y Δ <i>pptT::km</i> (primer evento de recombinación), Km ^R	Este estudio
PMM77	Δ <i>acpS::km</i> de mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que porta el plásmido pC- <i>acpSms</i> , Km ^R Str ^R	Este estudio
PMM78	Δ <i>pptT::km</i> de mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que porta el plásmido pC- <i>pptTms</i> , Km ^R Str ^R	Este estudio
PMM84	Δ <i>acpS::km</i> de mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que porta el plásmido pC- <i>acpScg</i> , Km ^R Str ^R	Este estudio
PMM85	Δ <i>pptT::km</i> de mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i> que porta el plásmido pC- <i>pptTcg</i> , Km ^R Str ^R	Este estudio
ATCC13032	<i>C. glutamicum</i>	ATCC
CGL2035	Δ <i>pptT(NCgl1905)::km</i> de ATCC13032 de <i>C. glutamicum</i> , Km ^R	Este estudio
CGL2039	Δ <i>acpS(NCgl2405)::km</i> de ATCC13032 de <i>C. glutamicum</i> , Km ^R	Este estudio
Plásmidos		
pET26b	Vector de expresión de <i>E. coli</i> que contiene el promotor T7, Km ^R	Novagen
pWM35	pET26b que contiene <i>pkS13 (Rv3800)</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pWM35γ	pET26b que contiene un gen <i>pkS13</i> mutado (S55A, S1266A) de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pETMas	pET26b que contiene <i>mas</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pETA	pET26b que contiene <i>ppsA</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pETB	pET26b que contiene <i>ppsB</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pETC	pET26b que contiene <i>ppsC</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pETD	pET26b que contiene <i>ppsD</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> , Km ^R	Este estudio
pLysS	Vector de <i>E. coli</i> que contiene el gen <i>lisoZima T7</i> , Clm ^R	Novagen
pLSfp	pLysS que contiene <i>pptT (Rv2794c)</i> de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> bajo el control del promotor T7, Clm ^R	Este estudio

pLSfpΔ	pLys que contiene un gen $\Delta pptT$ mutado de H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> bajo el control del promotor <i>T7</i> , Clm ^R	Este estudio
pMCS5	Vector de clonación, Amp ^K	MoBiTec
pMCS5ΔacpS	pMCS5 que contiene $\Delta acpS$ (<i>NCgl2405</i>)::km de <i>C. glutamicum</i> , Amp ^K , Km ^R	Este estudio
pMCS5ΔpptT	pMCS5 que contiene $\Delta pptT$ (<i>NCgl1905</i>)::km de <i>C. glutamicum</i> , Amp ^R , Km ^R	Este estudio
pCGL482	Plásmido lanzadera de <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> , Clm ^R	Peyret <i>et al.</i> , 1993
pCGL-acpScg	pCGL482 que contiene <i>acpS</i> (<i>NCgl2405</i>) de <i>C. glutamicum</i> , Clm ^R	Este estudio
pCGL-pptTcg	pCGL482 que contiene <i>pptT</i> (<i>NCgl1905</i>) de <i>C. glutamicum</i> , Clm ^R	Este estudio
pCGL-pptTms	pCGL482 que contiene <i>pptT</i> de <i>M. smegmatis</i> , Clm ^R	Este estudio
pJQ200	Plásmido suicida de micobacterias que contiene <i>sacB</i> , Gm ^K , Suc ^K	Quandt y Hynes, 1993
pJ2523S	pJQ200 que contiene $\Delta acpS$::km de <i>M. smegmatis</i> , Km ^K , Gm ^K , Suc ^K	Este estudio
pJ2794S	pJQ200 que contiene $\Delta pptT$::km de <i>M. smegmatis</i> , Km ^K , Gm ^K , Suc ^K	Este estudio
pCG76	Plásmido lanzadera replicativo termosensible de <i>E. coli</i> /micobacteria, Str ^K	Guilhot <i>et al.</i> , 1994
pC-acpSms	pCG76 que contiene <i>acpS</i> de <i>M. smegmatis</i> , Str ^K	Este estudio
pC-pptTms	pCG76 que contiene <i>pptT</i> de <i>M. smegmatis</i> , Str ^K	Este estudio
pC-acpScg	pCG76 que contiene <i>acpS</i> (<i>NCgl2405</i>) de <i>C. glutamicum</i> , Str ^K	Este estudio
pC-pptTcg	pCG76 que contiene <i>pptT</i> (<i>NCgl1905</i>) de <i>C. glutamicum</i> , Str ^K	Este estudio

Construcción de los mutantes $\Delta acpS$::km y $\Delta pptT$::km de *C. glutamicum* y vectores de complementación

5 Se generaron los mutantes $\Delta acpS$::km y $\Delta pptT$::km de *C. glutamicum* como se describe anteriormente (Portevin *et al.*, 2004). Se amplificaron dos fragmentos de ADN que se superponen al gen *acpS* (*NCgl2405*) en sus extremos 5' y 3' mediante PCR a partir de ADN total de la cepa ATCC13032 de *C. glutamicum* y se insertaron, flanqueando un módulo de resistencia a Km, en el vector pMCS5 (MoBiTec, Gotinga, Alemania), dando pMCS5ΔacpS. De forma similar, se amplificaron dos fragmentos de ADN que se superponen al gen *pptT* (*NCgl1905*) en sus extremos 3' y 5' y se clonaron en el plásmido pMCS5. Se insertó el módulo de resistencia a Km entre estos dos fragmentos, proporcionando el plásmido pMCS5ΔpptT.

10 Se transfirieron estos dos plásmidos a *C. glutamicum* mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes en placas que contenían Km (para pMCS5ΔpptT) o Km, 0,03 % de oleato de sodio (Sigma) y 0,03 % de Tween 40 (para pMCS5ΔacpS) (Sigma). Los transformantes en que había aparecido intercambio alélico entre el gen *acpS* o *pptT* cromosómico WT y los alelos portadores de mutaciones se caracterizaron por PCR usando diversas combinaciones de cebadores. Se seleccionaron dos cepas recombinantes, $\Delta acpS$::km de *C. glutamicum* y $\Delta pptT$::km de *C. glutamicum* llamadas CGL2039 y CGL2035, respectivamente, para estudios posteriores.

15 Para construir los plásmidos de complementación, se amplificaron los genes *acpS* y *pptT* de *C. glutamicum* mediante PCR a partir de ADN genómico de *C. glutamicum* y se amplificó el gen *pptT* de *M. smegmatis* por PCR a partir del plásmido pC-pptTms. Se insertaron los productos de PCR en un pCGL482 modificado (Peyret *et al.*, 1993) bajo el control del promotor *cpsB*, dando los plásmidos pCGL-acpScg, pCGL-pptTcg y pCGL-pptTms, respectivamente.

Construcción de los mutantes condicionales $\Delta acpS$::km y $\Delta pptT$::km de *M. smegmatis* y vectores de complementación

25 Se efectuó la construcción de las cepas mutantes condicionales de *M. smegmatis* como se describe anteriormente (Portevin *et al.*, 2004). Se amplificaron por PCR a partir de ADN cromosómico de mc²155 de *M. smegmatis* dos fragmentos que contenían el gen *acpS* (ortólogo de *Rv2523c* de H37Rv de *M. tuberculosis*) y el gen *pptT* (ortólogo de *Rv2794c* de H37Rv de *M. tuberculosis*) flanqueados por sus extremos 5' y 3' y se clonaron en pGEM-T (Promega), proporcionando pG2523S y pG2794S. Se linealizó cada plásmido con una enzima de restricción que corta en un sitio único dentro de *acpS* o *pptT* (*BclI* para pG2523S y *MscI* para pG2794S) y se ligó con un módulo de

resistencia a Km, dando los plásmidos pG2523SK y pG2764SK. Se insertaron el fragmento *NdeI*-*Apal* de 4,76 kb de pG2523SK y el fragmento *NdeI*-*Apal* de 4,4 kb de pG2794SK que contenían el alelo interrumpido de *acpS* y *pptT*, respectivamente, entre los sitios *SmaI* y *Apal* de pJQ200 (Quandt y Hymes, 1993), un plásmido suicida micobacteriano que alberga el marcador contraseleccionable *sacB*, proporcionando pJ2523SK y pJ2794SK, respectivamente. Se electrotransfirieron estos constructos a mc^2155 de *M. smegmatis* y se sembraron los transformantes en placas LB suplementadas con Km a 37 °C. Para cada transformación, se seleccionaron varios transformantes y se caracterizaron por PCR usando diversos cebadores. Dos cepas que albergaban un patrón correspondiente a la inserción de pJ2523SK y pJ2794SK en el cromosoma como resultado de un único evento de recombinación homóloga se llamaron PMM68 y PMM70, respectivamente, y se usaron para estudios posteriores (Figuras 1A y 1B).

Para la construcción del plásmido de complementación termosensible pC-*acpSms*, se amplificó el gen *acpS* a partir de mc^2155 de *M. smegmatis* por PCR y se clonó en un derivado del plásmido lanzadera *E. coli*-micobacteria pMIP12 (Le Dantec *et al.*, 2001), que alberga un sitio *NdeI* en dirección 3' del promotor *pBlaF**. Se digirió entonces el constructo resultante con *PacI* y *NheI* y se clonó posteriormente el fragmento de 1,78 kb que se superpone al promotor *pBlaF**, el gen *acpS* y la región terminadora de pMIP12 en el vector pCG76 (Guilhot *et al.*, 1994), que alberga un replicón micobacteriano termosensible y resistencia a estreptomycin, dando pC-*acpSms*. Se amplificaron por PCR el gen *pptT* de *M. smegmatis*, el gen *acpS* de *C. glutamicum* (NCgl2405) y el gen *pptT* de *C. glutamicum* (NCgl1905) a partir de ADN genómico. Se digirió cada producto de PCR con *NdeI* y *SpeI* y se ligaron independientemente entre los sitios de restricción *NdeI* y *SpeI* de pC-*acpSms*, proporcionando pC-*pptTms*, pC-*acpScg* y pC-*pptTcg* respectivamente.

Se introdujeron los vectores pC-*acpSms* y pC-*acpScg* en la cepa PMM68 y pC-*pptTms* y pC-*pptTcg* en la cepa PMM70 mediante electrotransformación. Se seleccionaron los transformantes en placas de LB que contenían Km y Str a 30 °C. Para cada transformación, se resuspendió una colonia en medio líquido y se hizo crecer a 30 °C antes de plantar sobre placas LB que contenían Km, Str y 5 % de sacarosa a 30 °C para inducir el segundo evento de cruzamiento en el locus cromosómico de *acpS* (para PMM68 transformado con pC-*acpSms* o pC-*acpScg*) o el locus cromosómico de *pptT* (para PMM70 transformado con pC-*pptTms* o pC-*pptTcg*). Para cada constructo, se cribaron varios clones por PCR usando diversos cebadores (Figura 1) después de la preparación de ADN genómico. Se seleccionaron dos cepas llamadas PMM77 ($\Delta acpS::km:pC-acpSms$) y PMM84 ($\Delta acpS::km:pC-acpScg$), en que la copia WT de *acpS* se ha reemplazado por el alelo *acpS::km* mutado y dos cepas llamadas PMM78 ($\Delta pptT::km:pC-pptTms$) y PMM85 ($\Delta pptT::km:pC-pptTcg$), en que la copia WT de *pptT* se ha reemplazado por el alelo *pptT::km* de mutación.

Caracterización bioquímica de ácidos grasos de cepas de *C. glutamicum*

Se hicieron crecer cultivos de *C. glutamicum* hasta crecimiento exponencial, se prepararon los ácidos grasos a partir de células y se separaron por TLC analítica en Durasil 25 según Laval *et al.* (2001). Para análisis de CG y CG-EM, se obtuvieron derivados de trimetilsililo de ácidos grasos y se analizaron como describe anteriormente (Constant *et al.*, 2002).

Marcaje de las proteínas 4'-fosfopanteteiniladas en *C. glutamicum*

Se hicieron crecer las cepas WT, $\Delta pptT::km$ y $\Delta pks13::km$ de *C. glutamicum* hasta fase exponencial en 5 ml de medio mínimo CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) suplementado con 0,05 % de Tween 80 a 30 °C. Se añadieron entonces 5 μ l de β -[14 C]alanina (49 mCi/mmol; Sigma) a cada cultivo y se incubaron las células durante 12 horas adicionales. Se recogieron las células bacterianas por centrifugación, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Se añadieron 500 μ l de perlas de vidrio a cada suspensión bacteriana y se desestabilizaron las células por agitación durante 3 min en un Mini BeadBeater. Se centrifugaron los extractos celulares a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C y se sometieron las proteínas de los sobrenadantes a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS). Se tiñó el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie, se secó y se detectaron las proteínas radiomarcadas por exposición a películas de rayos X Kodak.

Marcaje de las Pks micobacterianas en *E. coli*.

Se cotransfirieron los vectores de expresión pWM35, pWM35 γ , pETMas, pETA, pETB, pETC y pETD con pLSfp o pLSfp Δ a BL21 $\Delta entD$ de *E. coli*. Para cada transformación, se inoculó una colonia bacteriana en 2 ml de medio LB suplementado con Km y Clm y se incubó durante una noche a 37 °C. Se recuperaron 200 μ l del precultivo y se centrifugaron durante 2 min a 4.000 rpm. Se lavaron entonces las células bacterianas dos veces con 500 μ l de medio M9 (Sambrook y Russell, 2001), se diluyeron en 5 ml de medio M9 con Km y Clm y se hicieron crecer a 30 °C. Cuando la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0,5, se añadieron 5 μ l de β -D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 M y 5 μ l de β -[14 C]alanina al cultivo y se continuó la incubación durante 4 horas adicionales a 30 °C. Se centrifugó entonces 1 ml de cultivo, se lavaron las células con 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y se resuspendieron finalmente en 100 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 que contenía 0,1 % de Triton X-100. Para el análisis de marcaje, se incubaron 10 μ l de suspensión celular con 10 μ l de tampón desnaturante 2x (Sambrook y Russell, 2001) a 95 °C

durante 5 min antes de la separación de proteínas por PAGE-SDS. Se tiñeron los geles de poliacrilamida con azul de Coomassie antes de secar y exponer a autorradiografía.

Ejemplo 2: Micobacterias y corinobacterias contienen dos PPTasas conservadas

5 *M. tuberculosis* produce una serie de proteínas que deben convertirse desde sus apoformas inactivas en sus holoformas funcionales mediante transferencia del resto P-pant desde CoA hasta una serina conservada en sus dominios o subunidades ACP o PCP. Estas incluyen proteínas AcpM y Fas-I implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos, pero también una serie de Pks de tipo I y proteínas NRPS que son necesarias para la biosíntesis de ácidos micólicos, lípidos asociados a la pared celular y sideróforos. Se identificaron anteriormente dos genes que codifican proteínas con similitudes a PPTasas en el genoma de H37Rv de *M. tuberculosis*: *Rv2523c*, también llamado *acpS* 10 debido a las similitudes de la proteína de 130 aminoácidos codificados con AcpS de diversos orígenes bacterianos, y *Rv2794c*, que se mostró anteriormente que codifica una PPTasa de tipo Sfp de 227 aminoácidos, llamada PptT, responsable de la modificación de un conjunto de NRPS implicadas en la biosíntesis de micobactinas (Quadri *et al.*, 1998b). Para buscar genes de PPTasa adicionales, se buscaron en el genoma de H37Rv de *M. tuberculosis* motivos conservados de PPTasas como sondas (Weissman *et al.*, 2004). No se identificó un gen novedoso, sugiriendo que 15 *M. tuberculosis* contiene solo dos PPTasas responsables de la activación de 20 sustratos proteicos.

Se abordó entonces la cuestión de si estos dos genes de PPTasa se conservaban en las diversas especies micobacterianas y en las especies corinobacterianas estrechamente relacionadas. En todo el genoma analizado (incluyendo las cepas H37Rv y CDC151 de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG de *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. microti*, *M. marinum*, *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* y *C. efficiens*), se encontraron ortólogos de *acpS* y 20 *pptT*. Los niveles de similitudes de proteínas fueron mayores del 80 % para las proteínas micobacterianas y de aproximadamente un 40 % para las proteínas corinobacterianas con sus contrapartidas de *M. tuberculosis*.

Por lo tanto, estos análisis bioinformáticos mostraron que las especies micobacterianas y corinobacterianas relacionadas contienen solo dos PPTasas altamente conservadas con diferentes propiedades catalíticas. Sin embargo, ninguna de estas dos proteínas se había caracterizado en micobacterias ni corinobacterias.

Ejemplo 3: Las PPTasas AcpS y PptT son esenciales para viabilidad de *Mycobacteria*

En las micobacterias, existe un gran número de proteínas que tienen que activarse para ser funcionales, por ejemplo, 2 sistemas Fas, al menos 3 NRPS y 18 Pks de tipo I en *M. tuberculosis*. Sin embargo, no estaba disponible información tanto sobre el repertorio de sustratos proteicos reconocidos por cada PPTasa como sobre la presunta redundancia de estas dos proteínas. Como varias de las proteínas que necesitan activación están implicadas en procesos biológicos esenciales para la viabilidad micobacteriana, se abordó primero el problema de si cualquiera de los dos genes de PPTasa puede interrumpirse en el modelo de cepa micobacteriana de *M. smegmatis*. Se construyeron dos plásmidos no replicativos portadores del marcador contraselectivo *sacB* y un alelo interrumpido de *acpS* o *pptT* de *M. smegmatis* y se insertaron en el cromosoma mediante cruzamiento único, dando las cepas PMM68 y PMM70, respectivamente (Figuras 1A y 1B). La siembra de cultivos de cepas PMM68 o PMM70 sobre medio que contiene 5 % de sacarosa no consiguió seleccionar el segundo evento de recombinación, sugiriendo que tanto *acpS* como *pptT* son esenciales para la viabilidad micobacteriana. Para establecer con seguridad la esencialidad, se produjeron dos mutantes condicionales de *M. smegmatis*. En primer lugar, se transformaron células PMM68 con plásmido pC-*acpSms*, un vector micobacteriano termosensible portador de una copia intacta del alelo del gen *acpS* bajo el control del promotor *pBlaF**. En este contexto genético, la selección en agar LB que contiene 40 sacarosa a 30 °C produjo colonias en que había aparecido el segundo evento de recombinación entre los dos alelos cromosómicos (Figuras 1A y 1C). Se eligieron para trabajo posterior un clon llamado PMM77 ($\Delta acpS::km:pC-acpSms$) que contiene un gen *acpS::km* interrumpido en el cromosoma y un gen *acpS* funcional en el plásmido termosensible pC-*acpSms*. Se usó la misma estrategia para generar PMM78 ($\Delta pptT::km:pC-pptTms$), una cepa recombinante que alberga un gen cromosómico *pptT::km* mutado y un alelo *pptT* intacto en el plásmido 45 termosensible pC-*pptTms* (Figuras 1B y 1C).

Para investigar el papel de *acpS* y *pptT* en el crecimiento micobacteriano, se hicieron crecer cultivos de las cepas recombinantes PMM77, PMM78 y la cepa WT de *M. smegmatis* a 30 °C y se sembraron en estrías sobre placas de agar LB. Cuando se incubaron las placas a 30 °C, las cepas PMM77 y PMM78 crecieron igual que la WT. Sin embargo, cuando se incubaron las placas a 42 °C, una temperatura no permisiva para replicación de plásmido, 50 ambas cepas recombinantes exhibieron inhibición del crecimiento en contraposición con la WT (Figura 2A). Estos descubrimientos establecieron con seguridad que AcpS y PptT son necesarios para la supervivencia de *M. smegmatis* y por lo tanto activan las proteínas implicadas en las rutas biosintéticas esenciales. Estos resultados demuestran también que las dos PPTasas no pueden sustituirse entre sí.

Ejemplo 4: Los mutantes $\Delta pptT::km$ y $\Delta acpS::km$ de *C. glutamicum* ostentan un fenotipo microbiológico diferente

Entre los sustratos de PPTasa, aquellos responsables de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos son conocidos por ser esenciales para el crecimiento de *M. smegmatis* en condiciones de laboratorio. Por tanto, se previó que ambas PPTasas estuvieran implicadas en al menos una de estas rutas metabólicas. Por lo tanto, para

estudiar el papel desempeñado por AcpS y PptT en la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos, se cambió a *C. glutamicum*, otro modelo bacteriano. Es más, esta especie bacteriana exhibe una cubierta celular estrechamente relacionada con la de micobacterias, con un núcleo de pared celular similar (Daffé, 2005). Sin embargo, se demostró en un trabajo anterior que esta cepa es más tolerante que la cepa micobacteriana a la mutación en genes implicados en el metabolismo lipídico (Portevin *et al.*, 2004). Para investigar el papel de las dos PPTasas, se intentó inactivar los correspondientes genes en *C. glutamicum*. Se transfirieron dos alelos de *acpS* y *pptT*, interrumpidos por un gen resistente a Km, a un plásmido no replicativo en *C. glutamicum* y se seleccionaron los transformantes en Km. Para *pptT*, se cribaron varios clones resistentes a Km por PCR y se retuvo un clon que daba un patrón de amplificación consistente con la inserción del módulo de Km en *pptT* para análisis posterior. De forma interesante, este mutante $\Delta pptT::km$ ostentaba cambios fenotípicos similares a los observados para el mutante $\Delta pks13$ de *C. glutamicum*, que carece de una enzima esencial para la producción de corinomicolatos (Portevin *et al.*, 2004). En placas de agar BHI, el mutante $\Delta pptT::km$ exhibía colonias pequeñas y rugosas en lugar de colonias grandes y brillantes para WT. Además, este mutante crecía mucho más lentamente que WT en medio líquido y las células agregaban fuertemente, mientras que en las mismas condiciones las células WT crecían bien dispersadas (datos no mostrados). Estas modificaciones fenotípicas se revirtieron completamente cuando la cepa mutante se transformó con el plásmido pCGL-pptTcg, que contiene una copia funcional de *pptT* de *C. glutamicum*, indicando que el fenotipo observado de la cepa mutante era debido a la delección del gen *pptT*.

Para *acpS*, la misma estrategia dio mutantes $\Delta acpS::km$ solo cuando el medio de crecimiento se suplementaba con ácidos grasos. Un análisis fenotípico confirmó que estos mutantes $\Delta acpS::km$ de *C. glutamicum* eran incapaces de crecer en medio BHI sólido o líquido excepto cuando el medio se suplementaba con oleato de sodio y Tween 40. En estas condiciones, no se observaron diferencias fenotípicas entre WT y la cepa recombinante $\Delta acpS::km$ (datos no mostrados). Esta auxotrofia por ácido oleico sugería que la interrupción de *acpS* en *C. glutamicum* afecta a la biosíntesis de ácidos grasos. La transferencia de pCGL-acpScg, un plásmido corinobacteriano portador de un gen *acpS* funcional de *C. glutamicum*, a la cepa mutante $\Delta acpS::km$ restauró la capacidad de las células bacterianas de crecer en medio sólido o líquido sin oleato, indicando que los cambios fenotípicos observados entre las cepas mutada y WT se basaban solamente en la interrupción del gen *acpS*.

En conjunto, estos experimentos mostraron que la interrupción de *acpS* y *pptT* en *C. glutamicum* conducía a cepas que exhiben diferentes genotipos. La auxotrofia por ácido oleico del mutante $\Delta acpS::km$ sugería que *acpS* está implicado en la biosíntesis de ácidos grasos. En contraposición, el gen *pptT* no era necesario para la viabilidad de *C. glutamicum*, pero las alteraciones morfológicas del mutante $\Delta pptT::km$ indicaban modificaciones de la cubierta celular consistentes con la ausencia de producción de micolato.

Ejemplo 5: Las PPTasas AcpS y PptT están respectivamente implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en *C. glutamicum*.

Para caracterizar adicionalmente los fenotipos inducidos por la interrupción de *acpS* y *pptT*, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de ácidos grasos y corinomicolatos producidos por las dos cepas recombinantes de *C. glutamicum*.

Se hicieron crecer cultivos de WT, mutante $\Delta acpS::km$ y cepa complementada $\Delta acpS::km:pCGL-acpScg$ de *C. glutamicum* hasta fase exponencial (en presencia de ácido oleico y Tween 40 para la cepa mutante) y se liberaron ácidos grasos de la bacteria mediante la saponificación de células enteras. El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) mostró que el mutante $\Delta acpS::km$ sintetizaba corinomicolatos al mismo nivel que la WT o la cepa complementada (Figura 3A). Cuando se analizaron los metiléteres de ácido graso por CG, se encontró que la cepa mutante $\Delta acpS::km$ exhibía grandes cantidades de ácidos grasos C_{16} y $C_{18:1}$, los precursores de los corinomicolatos. Puesto que este mutante era auxotrófico por ácidos grasos, estos lípidos se originaron probablemente a partir del ácido oleico y Tween 40 añadidos al medio. En contraposición con las cepas WT (Figura 3B, superior izquierda) y complementada (datos no mostrados), que sintetizaban diversas formas de corinomicolatos, la cepa mutante $\Delta acpS::km$ producía solo una especie detectable de ácido corinomicólico (Figura 3B, superior derecha). Una caracterización adicional de este lípido por análisis de CG-EM reveló que corresponde a un corinomicolato $C_{36:2}$ (Figura 3C), indicando que el mutante era capaz de condensar dos ácidos grasos $C_{18:1}$ proporcionados por la adición exógena de ácido oleico al medio. La ausencia de corinomicolatos C_{32} y C_{34} en la cubierta celular del mutante es sorprendente, puesto que los ácidos grasos C_{16} están disponibles en el medio de crecimiento. Sin embargo, se ha mostrado anteriormente que cuando se suministran grandes cantidades de oleato a *C. glutamicum*, existe un cambio en la composición de micolato hacia corinomicolato $C_{36:2}$ (Radmacher *et al.*, 2005).

Al contrario que las micobacterias, que poseen dos sistemas de ácido graso sintasa (Fas-I y Fas-II), *C. glutamicum* carece del sistema Fas-II, pero tiene dos proteínas Fas-I (Fas-IA y Fas-IB). Se ha mostrado que Fas-IA es esencial para el crecimiento, pero no Fas-IB (Radmacher *et al.*, 2005). El hecho de que la interrupción de *acpS* en *C. glutamicum* afecte a la biosíntesis de ácidos grasos significa que la enzima Fas-IA es inactiva en el mutante $\Delta acpS::km$, sugiriendo fuertemente que la AcpS es responsable de la 4'-fosfopanteteinilación de esta enzima. Estos resultados establecieron también que la PptT no puede complementar la carencia de AcpS para efectuar esta reacción en *C. glutamicum*, proporcionando un fuerte apoyo al modelo de que las dos PPTasas no son redundantes. Además, la capacidad de la cepa recombinante de mantener la síntesis de corinomicolatos en presencia de ácidos

grasos exógenos implica que la PPTasa AcpS no es necesaria para la modificación postraduccional de la enzima condensadora Pks13.

A continuación, se investigó si los cambios fenotípicos observados con el mutante $\Delta pptT::km$ reflejan modificaciones en la pared celular. Los análisis de TLC y CG revelaron que la interrupción de *pptT* en *C. glutamicum* anulaba la producción de corinomicolatos (Figura 3A y 3B, inferior izquierda). La complementación de la mutación mediante la introducción de un alelo WT en el mutante restauraba totalmente la producción de todas las clases de corinomicolatos (C_{32} , C_{34} , C_{36}), confirmando que las diferencias observadas entre las cepas mutante y WT eran debidas a la interrupción del gen *pptT* (datos no mostrados). Se encontró también que el mutante $\Delta pptT::km$ producía grandes cantidades de ácidos grasos C_{16} y C_{18} (Figura 3B). Por tanto, parece que PptT no es necesaria para la producción de ácidos grasos en células de corinobacterias y por lo tanto no está implicada en la modificación postraduccional de la enzima Fas-IA. Además, la incapacidad de la cepa mutante de sintetizar ácidos micólicos a partir de ácidos grasos sugiere que la PptT está implicada en la activación de la enzima condensadora proteína Pks13.

Tomados en conjunto, estos experimentos establecieron que AcpS y PptT exhiben funciones diferentes en *C. glutamicum*, estando implicada la primera en la activación de Fas-I y la segunda en la modificación de Pks13.

Ejemplo 6: Caracterización bioquímica de la 4'-fosfopanteteinilación de Pks13 y Fas-I en *C. glutamicum*.

El análisis fenotípico y bioquímico de los dos mutantes de *C. glutamicum* proporciona evidencias indirectas de que AcpS y PptT activan Fas-I y Pks13 respectivamente. Para demostrar directamente la especificidad de las dos PPTasas, se diseñó un experimento para marcar el brazo de P-pant y visualizar su transferencia a los diversos sustratos proteicos. Se hicieron crecer diversas cepas WT y recombinantes de *C. glutamicum* en medio mínimo CGXII en presencia de β -[β - ^{14}C]alanina, un precursor de CoA. El principio de este experimento era generar una agrupación de CoA que albergara un grupo protésico 4'-fosfopanteteína radiomarcado con ^{14}C en las bacterias. Este agrupamiento puede servir entonces como sustrato para las dos PPTasas para marcar específicamente las proteínas 4'-fosfopanteteiniladas. Después del crecimiento, se recogieron las células, se lisaron y se separaron las proteínas de los extractos celulares por PAGE-SDS antes de tinción con azul de Coomassie y autorradiografía para visualizar las proteínas radiomarcadas.

Cuando se efectuó este experimento con *C. glutamicum* WT, se marcaron dos bandas de proteínas que exhibían un peso molecular aparente de 170 kDa y mayor de 220 kDa (Figura 4A, superior). Se estableció la identidad de la proteína menor mediante el uso de un mutante $\Delta pks13$ que ya no exhibe la banda de 170 kDa marcada. Una búsqueda en la base de datos genómica de *C. glutamicum* ATCC13032 de la presencia de proteínas grandes que deben convertirse por la unión covalente del grupo P-pant reveló que solo Fas-IA y Fas-IB (315 y 317 kDa) eran mayores de 220 kDa. Por tanto, se concluyó que la banda de proteína marcada mayor corresponde a las enzimas Fas-I.

Cuando se efectuaron los mismos experimentos con la cepa $\Delta pptT$, Pks13 ya no estaba marcada (Figura 4A, superior). En contraposición, las enzimas Fas-I seguían activadas en esta cepa. La ausencia de marcaje no era debida a deficiencia de expresión, puesto que la tinción con azul de Coomassie del gel de poliacrilamida reveló que estaba presente Pks13 en el extracto celular del mutante $\Delta pptT$, aunque no marcada (Figura 4A, inferior). Cuando se efectuaron los experimentos con el mutante $\Delta acpS$, se observó el patrón de marcaje opuesto: Pks13 estaba marcada pero no las enzimas Fas-I.

Por lo tanto, estos experimentos establecieron por primera vez el repertorio de sustratos proteicos de las dos PPTasas de *C. glutamicum*: AcpS y PptT tienen una especificidad de sustrato estricta por las enzimas Fas-I y Pks13, respectivamente.

Ejemplo 7: AcpS y PptT ostentan funciones idénticas en micobacterias y corinobacterias.

Los experimentos anteriormente descritos establecieron la función desempeñada por cada PPTasa en células de corinobacterias. Para estudiar si estas proteínas ostentan funciones similares en micobacterias, se ensayó si la interrupción del gen *pptT* o *acpS* en *M. smegmatis* podía complementarse mediante la expresión de los correspondientes ortólogos de *C. glutamicum*. Para abordar este tema, se construyeron dos plásmidos micobacterianos termosensibles, llamados pC-acpScg y pC-pptTcg, que albergaban el gen *acpS* y *pptT* de *C. glutamicum*, respectivamente. Se transfirió pC-acpScg a PMM68 de *M. smegmatis*, que es merodiploide del gen *acpS*, y pC-pptTcg a PMM70 de *M. smegmatis*, merodiploide del gen *pptT*. Se hicieron crecer varios transformantes en LB a 30 °C antes de sembrar sobre medio sólido que contiene sacarosa para inducir un segundo evento de recombinación entre los dos alelos cromosómicos en los loci de *pptT* o *acpS*. Se seleccionaron para análisis posteriores varias colonias en que la copia cromosómica WT de *acpS* o *pptT* se reemplazaba por el alelo mutado y se llamaron PMM84 ($\Delta acpS::km:pC-acpScg$) y PMM85 ($\Delta pptT::km:pC-pptTcg$).

PMM84 y PMM85 exhibían un fenotipo WT idéntico al obtenido con PMM77 ($\Delta acpS::km:pCacpSms$) y PMM78 ($\Delta pptT::km:pC-pptTms$) mutantes, que expresaban AcpS y PptT de *M. smegmatis*, respectivamente. Ambas cepas mutantes mantenían un crecimiento normal en medio líquido LB y en placas de agar LB a 30 °C, pero eran

incapaces de mantener el crecimiento en medio sólido a 42 °C, una temperatura no permisiva para la replicación de plásmido (Figura 2B). Estos datos demostraban que las dos PPTasas de *C. glutamicum* son capaces de reconocer y modificar postraduccionalmente las mismas proteínas esenciales en *M. smegmatis* que sus ortólogos micobacterianos, indicando que AcpS y PptT tienen funciones similares en ambas especies.

- 5 Se observó una complementación cruzada similar cuando se expresaba la PptT de *M. smegmatis* en $\Delta pptT::km$ de *C. glutamicum*. En contraposición con las células $\Delta pptT::km$ de *C. glutamicum*, la cepa complementada con *pptT* de *M. smegmatis* no mostraba agregación en medio líquido y crecía en forma de colonias regulares brillantes sobre placas de agar. Además, el análisis de los ácidos grasos por TLC y CG después de la saponificación de células enteras reveló que la producción de corinomicolatos se había restaurado al mismo nivel que en la cepa WT (Figura 10 3A y 3B, inferior derecha). Como se afirma anteriormente, el fenotipo inhabitual de la cepa $\Delta pptT::km$ de *C. glutamicum* es el resultado de la falta de fosfopanteteinilación de Pks13. Por tanto, parece que la PptT de *M. smegmatis* puede activar la Pks13 de *C. glutamicum*, sugiriendo que esta proteína efectúa la misma reacción catalítica en *M. smegmatis*. En conjunto, estos experimentos de complementación cruzada muestran que las PPTasas PptT y AcpS tienen funciones similares en la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos de 15 micobacterias y corinobacterias.

Ejemplo 8: La PptT es responsable de la 4'-fosfopanteteinilación de Pks de tipo I en *M. tuberculosis*.

- Se demostró que la AcpS está implicada en la activación de Fas-I en corinobacterias y micobacterias, mientras que la PptT cataliza la modificación postraduccional de Pks13. Esta proteína es la única Pks de tipo I codificada por el 20 genoma corinobacteriano. Sin embargo, el repertorio de Pks de tipo I es mucho mayor en micobacterias. Estas proteínas adicionales están implicadas en la formación de lípidos extraíbles, tales como DIM o PGL-tb en *M. tuberculosis*, que son factores de virulencia claves. Entonces, se planteó si la PptT está también implicada en la activación de otras Pks de tipo I de *M. tuberculosis*.

- Para abordar esta cuestión, se coprodujeron diversas Pks de *M. tuberculosis* en *E. coli* con PptT de *M. tuberculosis* y se observó la activación de estas proteínas usando radiomarcaje con β -[β - 14 C]alanina. En los experimentos previos, 25 se observó que la PPTasa EntD de *E. coli* era responsable de la activación parcial de algunas Pks de *M. tuberculosis* (datos no publicados). Para superar este problema, se construyó una cepa BL21(DE3) de *E. coli* con interrupción de *entD* mediante intercambio alélico y se llevaron a cabo los mismos experimentos en la nueva cepa. Se efectuó el experimento en primer lugar con Pks 13, porque ya se sabía que es un sustrato de PptT (véanse los resultados anteriores). Los resultados revelaron que Pks13 estaba marcada en células coproductoras de Pks13 y 30 PptT de *M. tuberculosis*, pero no en células productoras de Pks13 sola (Figura 4B, superior). Para descartar la posibilidad de un marcaje no específico de Pks13, se construyó el plásmido pWM35 γ , un derivado de pWM35 que expresa una proteína mutante Pks13 en que los dos residuos de serina (Ser55 y Ser1266) responsables de la unión del resto P-pant de CoA en los dominios ACP N- y C-terminales de Pks13 se han sustituido por residuos de alanina. Cuando se coprodujo esta proteína mutante con PptT en BL21 $\Delta entD$ de *E. coli*, no se observó radiomarcaje en el 35 ensayo, indicando que la señal obtenida con Pks13 era específicamente el resultado de la unión del resto P-pant de CoA a las serinas catalíticas de Pks13 (Figura 4B). Estos experimentos proporcionaron una evidencia directa de que la Pks13 es un sustrato de PptT en *M. tuberculosis*.

- Una vez el ensayo fue funcional, se observó la activación de otras Pks de tipo I por PptT. Se coprodujeron independientemente 5 Pks de tipo I diferentes con PptT en BL21 $\Delta entD$ de *E. coli* y, en todos los casos, se detectó 40 transferencia de P-pant radiomarcado (Figura 4C, superior). Las señales eran débiles, pero se detectaron reproduciblemente. En contraposición, se encontró que ninguna de estas Pks estaba marcada en cepas de *E. coli* que carecen de la PPTasa micobacteriana PptT. Esta ausencia de activación detectable no puede atribuirse al bajo nivel de expresión proteica como se indica por la tinción con azul de Coomassie del gel proteico, que demostraba que las Pks de tipo I se producían a alto nivel sin la PPTasa PptT (Figura 4C, inferior).

- 45 Según esto, puede concluirse que la PptT no es solo responsable de la activación de Pks13 en *M. tuberculosis*, sino que es también necesaria para la modificación de otros tipos de Pks de tipo I implicadas en la biosíntesis de lípidos necesarios para virulencia.

Discusión

- Dado el papel crucial de los lípidos de cubierta celular en la biología de *M. tuberculosis*, se han realizado enormes 50 esfuerzos durante las últimas décadas por descifrar los procesos celulares que conducen a la producción y translocación de estos componentes. A partir de estos esfuerzos, ha surgido el concepto de que las estructuras lipídicas únicas encontradas en las micobacterias se sintetizan mediante la acción combinada de los sistemas Fas y Pks de tipo I: ambas clases de enzimas tienen que convertirse desde las apoformas inactivas en holoformas funcionales. En este estudio, se ha examinado el papel de dos PPTasas en la modificación postraduccional de estas 55 enzimas biosintéticas. Se ha proporcionado una evidencia directa de que las dos PPTasas activan cada una un subconjunto definido de sustratos proteicos en micobacterias y corinobacterias, y son ambas esenciales para la viabilidad de las micobacterias. Estos resultados tienen implicaciones importantes para nuestra comprensión del metabolismo lipídico en micobacterias y bacterias relacionadas. Demuestran el papel fundamental desempeñado por

las dos PPTasas en la biología de estos microorganismos, definiendo nuevas dianas de fármaco prometedoras para luchar contra la tuberculosis.

Con respecto al metabolismo lipídico en micobacterias, se propone un modelo en que la AcpS está dedicada a la modificación postraducciona de Fas-I y la subunidad AcpM de Fas-II, mientras que la PptT activa las numerosas Pks de tipo I y NRPS de *M. tuberculosis* (Figura 5). Este modelo es también cierto para *Corynebacteria spp.*, pero el número de proteínas para modificar es menor que en micobacterias, y especialmente *M. tuberculosis*. Varias series de evidencias son consistentes con este modelo. En primer lugar, los resultados presentados aquí establecían claramente que las dos PPTasas micobacterianas o corinobacterianas no son redundantes y exhiben diferente repertorio de sustratos. Es más, las dos PPTasas micobacterianas eran independientemente esenciales para la viabilidad de micobacterias. *C. glutamicum* con eliminación de *acpS* exhibía auxotrofia por ácidos grasos y falta de activación de Fas-I, pero seguía siendo apta para la formación de ácido micólico y activación de Pks13. En contraposición, la delección de *pptT* conducía a un mutante de *C. glutamicum* incapaz de sintetizar ácido micólico y activar Pks13, pero aún capaz de producir ácidos grasos C₁₆-C₁₈ y modificar Fas-I. Así, estos datos demostraban que Fas-I y Pks13 son sustratos de AcpS y PptT, respectivamente. En segundo lugar, los resultados mostraron que otras 5 Pks de tipo I de *M. tuberculosis*, de diferente tamaño y contenidos de dominios, se activan también por PptT. Aunque no puede descartarse formalmente la posibilidad de que estas Pks sean también sustratos de AcpS, la falta de redundancia de las dos PPTAsas habla en contra de esta hipótesis. Por lo tanto, estos descubrimientos apoyan fuertemente el modelo de que todas las Pks de tipo I de *M. tuberculosis* se activan por PptT. En tercer lugar, un informe anterior estableció que, *in vitro*, la PptT es capaz de 4'-fosfopanteteinilar MbtB y MbtE, dos NRPS que actúan en el ensamblado de micobactinas (Quadri *et al.*, 1998b). La activación de las dos proteínas adicionales, MbtF una péptido sintasa, y MbtD una policétido sintasa, codificadas por el agrupamiento génico de micobactina, sigue siendo especulativa debido a la falta de datos experimentales, pero puede deducirse de los resultados y de los de Quadri *et al.* (1998b) que ambas proteínas se activan también por PptT. Finalmente, se ha mostrado que la AcpM exhibe una estructura tridimensional muy similar a Acp de *E. coli*, que es un sustrato de AcpS (Wong *et al.*, 2002). Esta proteína, AcpM, puede activarse por AcpS de *E. coli* tanto *in vitro* como *in vivo*, apoyando el modelo de que esta proteína es también el sustrato de AcpS en micobacterias (Schaeffer *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2002). Por lo tanto, todos los resultados obtenidos en este estudio o publicados anteriormente apoyan el modelo. Este modelo es también consistente con observaciones anteriores realizadas en otros microorganismos que muestran que las PPTasas de tipo Sfp habitualmente se asocian funcionalmente con el metabolismo secundario (Mootz *et al.*, 2001).

Estos resultados tienen también implicaciones importantes para la comprensión de la biología de las micobacterias y especialmente *M. tuberculosis*. Es más, *M. tuberculosis* contiene más de 20 proteínas que tienen que 4'-fosfopanteteinilarse. Estos descubrimientos han proporcionado una definición del repertorio de sustrato de cada PPTasa y han mostrado que ambas enzimas son necesarias para la formación de componentes esenciales para la viabilidad de las micobacterias. Por ello, la enzima Fas-I, que se activa por AcpS, cataliza la síntesis de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ que se incorporan a los diversos constituyentes lipídicos de la membrana plasmática. La síntesis de ácidos grasos cortos por Fas-I es también una de las primeras etapas de la larga ruta biosintética que conduce a la formación de micolatos, que son elementos estructurales clave del esqueleto de la pared celular micobacteriana (Daffé y Draper, 1998). Esta ruta incluye también otras dos proteínas AcpM y Pks13 activadas por AcpS y PptT, respectivamente: AcpM es una subunidad del sistema Fas-II que sintetiza la cadena larga de meromicolato y Pks13 es la condensasa que cataliza la última etapa de condensación de la formación de micolato. Por lo tanto, las dos PPTasas micobacterianas son necesarias para la formación de micolatos. Como consecuencia, son ambas esenciales para la viabilidad de las micobacterias.

Además, estas dos enzimas son también necesarias para la producción de factores de virulencia importantes. Por ejemplo, las enzimas MbtB y MbtD-F activadas por PptT están implicadas en el ensamblado de sideróforos de micobactina que son necesarios para el crecimiento en macrófagos humanos (de Voss *et al.*, 2000). En la misma línea, Fas-I y 7 Pks de tipo I, activadas por AcpS y PptT respectivamente, están implicadas en la formación de DIM y PGL-tb, dos lípidos complejos producidos por un número muy limitado de especies micobacterianas y dos factores de virulencia importantes de *M. tuberculosis*. Es más, los mutantes sin DIM están afectados en su capacidad de multiplicarse en el hospedador y causar enfermedades (Cox *et al.*, 1999). De forma similar, se ha mostrado que los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* que exhiben un fenotipo de hipervirulencia en diversos modelos animales se atenúan mediante la mutación de Pks15/1, una enzima necesaria para la formación de PGL-tb (Reed *et al.*, 2004).

Por tanto, las dos PPTasas parecen tener papeles fundamentales para la biología del patógeno *M. tuberculosis*, necesiándose ambas para viabilidad y patogénesis. Otros patógenos micobacterianos tales como *M. leprae*, *M. ulcerans* o *M. avium* poseen también ortólogos de AcpS y PptT y todos producen micolatos y factores de virulencia lipídicos. Por lo tanto, las dos PPTasas micobacterianas son dianas muy prometedoras para el desarrollo de fármacos para luchar contra infecciones micobacterianas.

Ejemplo 9: Ensayo enzimático de PptT

La actividad PPTasa consiste en la transferencia del grupo 4'-fosfopanteteína (P-pant) desde la coenzima A hasta el dominio de proteína portadora de acilo (ACP) de Pks. Se ensaya la actividad de PptT usando un procedimiento de ensayo radiactivo como se describe anteriormente para diversas PPTasas, incluyendo Sfp de *Bacillus subtilis* o AcpS de *E. coli* (Lambalot, Gehring *et al.* 1996; Quadri, Weinreb *et al.* 1998a; Mootz, Finking *et al.* 2001) y se adapta

a la PPTasa micobacteriana PptT. Este procedimiento mide la incorporación del grupo 4'-fosfopanteteína marcado con ^3H desde (^3H)-coenzima A hasta apoenzimas.

5 Típicamente, se incuban mezclas de reacción que contienen MgCl_2 , proteína PptT, sustrato proteico (apoenzima) y cosustrato (^3H)-coenzima A durante 30 min a 37 °C. Se inactivan las reacciones mediante la adición de ácido tricloroacético al 10 % (TCA) y BSA añadida como portador. Se recogen las proteínas precipitadas mediante centrifugación, se lavan los aglomerados resultantes con TCA y se disuelven en base Tris 1 M. Se mezclan las proteínas redisueltas con cóctel de centelleo líquido y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorpora al sustrato proteico cuantificado usando un analizador de centello líquido.

10 Se fusiona la proteína PptT usada en estos ensayos con la proteína MBP (proteína de unión a maltosa) en su extremo N-terminal. Esta proteína de fusión MBP-PptT se sobreexpresa en la cepa BL21 de *E. coli* y se purifica parcialmente por cromatografía de afinidad usando una resina de amilosa.

15 Se ensayan diferentes sustratos proteicos (apoenzimas) consistentes en proteínas Pks micobacterianas enteras o dominios ACP de estas Pks para seleccionar el sustrato más adecuado para la prueba. Como ejemplos de proteínas Pks que pueden usarse en esta prueba, pueden citarse Pks13 y Mas (ácido micocerósico sintasa, que está implicada en la síntesis de ácidos micocerósicos en micobacterias productoras de DIM y PGL). Pueden producirse fusionadas con un marcador His carboxiterminal en una cepa modificada por ingeniería genética de *E. coli* con eliminación del gen *entD*, que codifica una PPTasa de *E. coli* para evitar la activación de fondo (producción de apoformas). Dichas proteínas marcadas con His se purifican mediante cromatografía de afinidad (columna de níquel) seguida de cromatografía de exclusión por tamaño.

20 Una vez la prueba es funcional, se sustituye la (^3H)-coenzima A por análogos de coenzima A que albergan un grupo fosfopanteteína fluorescente o biotinilado para diseñar un ensayo enzimático adecuado para cribado de alto rendimiento de colecciones de compuestos. Varios estudios han demostrado que estos sustratos modificados pueden transferirse eficazmente a diversos sustratos proteicos por Sfp (La Clair, Foley *et al.* 2004; Yin, Liu *et al.* 2004).

25 REFERENCIAS

Asselineau, C., Asselineau, J., Laneelle, G. y Laneelle, M.A. (2002). "The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: current and alternative hypotheses". Prog. Lipid Res. 41, 501-523.

30 Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G. y Jacobs, W.R., Jr. (1994). "inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis". Science 263, 227-230.

Camacho, L.R., Ensergueix, D., Pérez, E., Gicquel, B. y Guilhot, C. (1999). "Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis". Mol. Microbiol. 34, 257-267.

Cane, D.E. y Walsh, C.T. (1999). "The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases". Chem. Biol. 6, R319-325.

35 Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3º, *et al.* (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence". Nature 393, 537-544.

40 Constant, P., Pérez, E., Málaga, W., Laneelle, M.A., Saurel, O., Daffé, M. y Guilhot, C. (2002). "Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene". J. Biol. Chem. 277, 38148-38158.

Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M. y Jacobs, W.R., Jr. (1999). "Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice". Nature 402, 79-83.

45 Daffé, M. y Draper, P. (1998). "The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity". Adv. Microb. Physiol. 39, 131-203.

Daffé, M. (2005). "The cell envelope of Corynebacteria". En "Handbook of Corynebacterium glutamicum", L. Eggeling and M. Bott, ed. (Taylor and Francis, CRC Press), pág. 121-148.

De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G. y Barry, C.E., 3º (1999). "Iron acquisition and metabolism by mycobacteria". J. Bacteriol. 181, 4443-4451.

50 De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y. y Barry, C.E., 3º (2000). "The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1252-1257.

- Dubey, V.S., Sirakova, T.D. y Kolattukudy, P.E. (2002). "Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation". Mol. Microbiol. 45, 1451-1459.
- 5 Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M. y Schweizer, E. (2000). "A novel function of yeast fatty acid synthase. Subunit alpha is capable of self-pantetheinylation". Eur. J. Biochem. 267, 2666-2671.
- Flugel, R.S., Hwangbo, Y., Lambalot, R.H., Cronan, J.E., Jr. y Walsh, C.T. (2000). "Holo-(acyl carrier protein)synthase and phosphopantetheinyl transfer in *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 275, 959-968.
- Guilhot, C., Ota, I., Van Rompaey, I., Martin, C. y Gicquel, B. (1994). "Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries". J. Bacteriol. 176, 535-539.
- 10 Keating, T.A. y Walsh, C.T. (1999). "Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis". Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 598-606.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. y Sahm, H. (1993). "Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon". J. Bacteriol. 175, 5595-5603.
- 15 La Clair, J.J., Foley, T.L., Schegg, T.R., Regan, C.M. y Burkart, M. D. (2004). "Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis". Chem. Biol. 11, 195-201.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. y Walsh, C.T. (1996). "A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases". Chem. Biol. 3, 923-936.
- Laval, F., Laneelle, M.A., Deon, C., Monsarrat, B. y Daffé, M. (2001). "Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry". Anal. Chem. 73, 4537-4544.
- 20 Le Dantec, C., Winter, N., Gicquel, B., Vincent, V. y Picardeau, M. (2001). "Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems". J. Bacteriol. 183, 2157-2164.
- Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G. y Besra, G.S. (2002). "The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*". Chem. Biol. 9, 545-553.
- 25 Mofid, M.R., Finking, R., Essen, L.O. y Marahiel, M.A. (2004). "Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism". Biochemistry 43, 4128-4136.
- Mootz, H.D., Finking, R. y Marahiel, M.A. (2001). "4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*". J. Biol. Chem. 276, 37289-37298.
- 30 Onwueme, K.C., Vos, C.J., Zurita, J., Ferreras, J.A., Quadri, L.E.N. (2005). "The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria". Prog. Lipid Res., 44, 259-302.
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J. y Somers, W.S. (2000). "Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites". Structure Fold. Des. 8, 883-895.
- 35 Peyret, J.L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Schechter, E. y Leblon, G. (1993). "Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*". Mol. Microbiol. 9, 97-109.
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M. y Guilhot, C. (2004). "A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 314-319.
- 40 Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. y Walsh, C.T. (1998a). "Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases". Biochemistry 37, 1585-1595.
- 45 Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. y Walsh, C.T. (1998b). "Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin". Chem. Biol. 5, 631-645.
- Quandt, J. y Hynes, M.F. (1993). "Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria". Gene 127, 15-21.

- Radmacher, E., Alderwick, L.J., Besra, G.S., Brown, A.K., Gibson, K.J., Sahm, H. y Eggeling, L. (2005). "Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*". Microbiology 151, 2421-2427.
- Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G. y Barry, C.E., 3^o (2004). "A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response". Nature 431, 84-87.
- 5 Sambrook, J. y Russel, D.W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual". (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schaeffer, M.L., Agnihotri, G., Kallender, H., Brennan, P.J. y Lonsdale, J.T. (2001). "Expression, purification, and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* acyl carrier protein, AcpM". Biochim. Biophys. Acta 1532, 67-78.
- 10 Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H. y Kolattukudy, P.E. (2001). "The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis". J. Biol. Chem. 276, 16833-16839.
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T. y Jacobs, W.R., Jr (1990). "Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*". Mol. Microbiol. 4, 1911-1919.
- 15 Takayama, K., Wang, C. y Besra, G.S. (2005). "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*". Clin. Microbiol. Rev. 18, 81-101.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E. y Flugel, R.S. (1997). "Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases". Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 309-315.
- Weissman, K.J., Hong, H., Oliynyk, M., Siskos, A.P. y Leadlay, P.F. (2004). "Identification of a phosphopantetheinyl transferase for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*". Chembiochem. 5, 116-125.
- 20 Wong, H.C., Liu, G., Zhang, Y.M., Rock, C.O. y Zheng, J. (2002). "The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*". J. Biol. Chem. 277, 15874-15880.
- Yin, J., Liu, F., Li, X. y Walsh, C.T. (2004). "Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification". J. Am. Chem. Soc. 126, 7754-7755.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- <120> Uso de una 4'-fosfopanteteinil transferasa como diana para identificar moléculas de antibiótico
- CHALUT, Christian
- GUILHOT, Christophe
- <130> BLO/VMA/ahF644/132EP
- 30 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 684
- <212> ADN
- 35 <213> *Mycobacterium* sp.
- <220>
- <221> misc_feature
- <223> Secuencia de codificación de PptT de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, Rv2794c
- <400> 1

ES 2 529 259 T3

atgacggtag gcacgctggt ggcgctggg ttgccggcga ccgtgttca ggattggcg 60
tatgccgagt tgtactccga cccacccggt ctcaccccgc tgcccgagga ggcgccgtg 120
atcgcacgat cggttgcaa gcggcgcaac gaattcatca ccgtgctca ctgcgccgc 180
atcgcgctgg accagctcgg tggccgccg gcgccgatcc tcaagggcga caagggcgaa 240
ccgtgctggc ccgacggcat ggtcggtagc ctcacccact gcgccggtta ccgcgcgcg 300
gttgcggac gcagggatgc ggtcgttcc gtgggcatcg acgccgaacc gcacgacgtg 360
ttgcccaatg gtgtgctgga tgcgatcagc ctgccggccg agcgcgccga catgccccgc 420
accatgccag cggcgttga ttgggatcga atcctgttct gcgccaagga agcaacgtac 480
aaggcgtggt ttccgctgac caagagggtg ctgggttcc aggacgcgca catcacgttc 540
gaaaccgata gcaccggctg gacgggtcgc ttcgtctccc gtatcctcat cgacgggtcc 600
accctgtcgg gtccgccgct gacaacgctg cggggacgct ggtcggttga gcgcgactg 660
gtgctgaccg cgatcgtgct atga 684

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium sp.*

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

<400> 2

ES 2 529 259 T3

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

Glu Asp Leu Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Leu Pro Glu Glu Ala Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Ile Ala Leu Asp
50 55 60

Gln Leu Gly Val Pro Pro Ala Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Glu
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Met Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ala Gly
85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Arg Asp Ala Val Arg Ser Val Gly
100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Ala
115 120 125

Ile Ser Leu Pro Ala Glu Arg Ala Asp Met Pro Arg Thr Met Pro Ala
130 135 140

Ala Leu His Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Lys Ala Trp Phe Pro Leu Thr Lys Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
165 170 175

His Ile Thr Phe Glu Thr Asp Ser Thr Gly Trp Thr Gly Arg Phe Val
180 185 190

Ser Arg Ile Leu Ile Asp Gly Ser Thr Leu Ser Gly Pro Pro Leu Thr
195 200 205

Thr Leu Arg Gly Arg Trp Ser Val Glu Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
210 215 220

Ile Val Leu
225

<210> 3

ES 2 529 259 T3

<211> 227

<212> PRT

<213> *Microbacterium sp.*

<220>

5 <221> misc_feature

<223> PptT de la cepa CDC1551 de *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 3

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

Glu Asp Leu Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Leu Pro Glu Glu Ala Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Ile Ala Leu Asp
50 55 60

Gln Leu Gly Val Pro Pro Ala Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Glu
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ala Gly
85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Arg Asp Ala Val Arg Ser Val Gly
100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Ala
115 120 125

Ile Ser Leu Pro Ala Glu Arg Ala Asp Met Pro Arg Thr Met Pro Ala
130 135 140

Ala Leu His Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Lys Ala Trp Phe Pro Leu Thr Lys Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
165 170 175

ES 2 529 259 T3

His Ile Thr Phe Glu Thr Asp Ser Thr Gly Trp Thr Gly Arg Phe Val
180 185 190

Ser Arg Ile Leu Ile Asp Gly Ser Thr Leu Ser Gly Pro Pro Leu Thr
195 200 205

Thr Leu Arg Gly Arg Trp Ser Val Glu Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
210 215 220

Ile Val Leu
225

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de *Mycobacterium* *vovis*

<400> 4

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

Glu Asp Leu Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Leu Pro Glu Glu Ala Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Ile Ala Leu Asp
50 55 60

Gln Leu Gly Val Pro Pro Ala Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Glu
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ala Gly
85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Arg Asp Ala Val Arg Ser Val Gly
100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Ala
115 120 125

ES 2 529 259 T3

Ile Ser Leu Pro Ala Glu Arg Ala Asp Met Pro Arg Thr Met Pro Ala
130 135 140

Ala Leu His Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Lys Ala Trp Phe Pro Leu Thr Lys Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
165 170 175

His Ile Thr Phe Glu Thr Asp Ser Thr Gly Trp Thr Gly Arg Phe Val
180 185 190

Ser Arg Ile Leu Ile Asp Gly Ser Thr Leu Ser Gly Pro Pro Leu Thr
195 200 205

Thr Leu Arg Gly Arg Trp Ser Val Glu Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
210 215 220

Ile Val Leu
225

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium sp.*

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de *Mycobacterium leprae*

<400> 5

Met Thr Val Ser Met Leu Val Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
1 5 10 15

Gln Asp Leu Glu Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Leu Pro Glu Glu Glu Leu Leu Ile Ala Lys Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Ala Arg Tyr Cys Ala Arg Ile Ala Leu Gly
50 55 60

10 Arg Leu Arg Val Pro Pro Val Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Glu
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ser Gly
 85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Ser Ala Ala Val Arg Ser Val Gly
 100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Glu Met Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Val
 115 120 125

Ile Ser Leu Pro Glu Glu Arg Ser Glu Met Arg Arg Lys Leu Pro Ser
 130 135 140

Val Leu Tyr Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
 145 150 155 160

Lys Ala Trp Phe Pro Leu Thr Lys Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
 165 170 175

His Ile Thr Phe Asp Val Asp Asn Leu Gly Ser Ser Gly Gly Phe Val
 180 185 190

Ser Arg Ile Leu Val Asp Gly Ser Ala Leu Ser Gly Pro Pro Leu Thr
 195 200 205

Val Leu Thr Gly Arg Trp Ser Val Asp Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
 210 215 220

Ile Val Leu
 225

<210> 6

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium sp.*

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de *Mycobacterium marinum*

<400> 6

Val Thr Ile Ser Met Leu Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Thr Val Val
 1 5 10 15

Asp Asp Leu Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Val
 20 25 30

ES 2 529 259 T3

Pro Leu Pro Glu Glu Glu Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Val Ala Leu Gly
50 55 60

Asp Leu Gly Val Pro Pro Val Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Gln
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ser Gly
85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Ser Ala Ala Val Arg Ser Val Gly
100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Ala
115 120 125

Ile Ser Leu Pro Glu Glu Arg Asp Glu Ile Pro Ser Ala Met Pro Asp
130 135 140

Gly Leu His Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Lys Val Trp Phe Pro Leu Thr Asn Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
165 170 175

His Ile Thr Phe Glu Ala Asp Asp Ser Gly Arg Thr Gly Arg Phe Val
180 185 190

Ser Arg Ile Leu Ile Asp Pro Ser Ala Leu Trp Gly Pro Pro Leu Thr
195 200 205

Thr Leu His Gly Arg Trp Ser Val Glu Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
210 215 220

Ile Val Leu
225

<210> 7

<211> 227

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium sp.*

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de *Mycobacterium microti*

<400> 7

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

Glu Asp Leu Ala Tyr Ala Glu Leu Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Thr
20 25 30

Pro Leu Pro Glu Glu Ala Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg
35 40 45

Arg Asn Glu Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Ile Ala Leu Asp
50 55 60

Gln Leu Gly Val Pro Pro Ala Pro Ile Leu Lys Gly Asp Lys Gly Glu
65 70 75 80

Pro Cys Trp Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Ala Gly
85 90 95

Tyr Arg Gly Ala Val Val Gly Arg Arg Asp Ala Val Arg Ser Val Gly
100 105 110

Ile Asp Ala Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asn Gly Val Leu Asp Ala
115 120 125

Ile Ser Leu Pro Ala Glu Arg Ala Asp Met Pro Arg Thr Met Pro Ala
130 135 140

Ala Leu His Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Lys Ala Trp Phe Pro Leu Thr Lys Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala
165 170 175

His Ile Thr Phe Glu Thr Asp Ser Thr Gly Trp Thr Gly Arg Phe Val
180 185 190

Ser Arg Ile Leu Ile Asp Gly Ser Thr Leu Ser Gly Pro Pro Leu Thr
195 200 205

Thr Leu Arg Gly Arg Trp Ser Val Glu Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala
210 215 220

Ile Val Leu
225

<210> 8

<211> 225

<212> PRT

5 <213> *Microbacterium* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT de *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*

<400> 8

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

Ala Tyr Ser Glu Val Tyr Ser Asp Pro Pro Gly Leu Ala Pro Leu Pro
20 25 30

Glu Glu Glu Pro Leu Ile Ala Arg Ser Val Ala Lys Arg Arg Asn Glu
35 40 45

Phe Ile Thr Val Arg His Cys Ala Arg Ile Ala Leu Gly Glu Leu Gly
50 55 60

Leu Pro Pro Ala Pro Ile Leu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Arg Trp
65 70 75 80

Pro Asp Gly Val Val Gly Ser Leu Thr His Cys Thr Gly Tyr Arg Gly
85 90 95

Ala Val Val Gly Arg Thr Gly Ala Val Arg Ser Val Gly Ile Asp Ala
100 105 110

Glu Pro His Asp Val Leu Pro Asp Gly Val Leu Asn Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Pro Ala Glu Arg Ser Glu Ile Pro Ser Ala Leu Pro Gly Asp Leu His
130 135 140

Trp Asp Arg Ile Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr Lys Ala Trp
145 150 155 160

Phe Pro Leu Thr Arg Arg Trp Leu Gly Phe Glu Asp Ala Arg Ile Thr
165 170 175

10

Phe Glu Ala Asp His Pro Gly Ala Thr Thr Gly Gly Phe Val Ser Arg
180 185 190

Ile Leu Ile Asp Pro Ala Ala Leu Cys Gly Pro Pro Leu Thr Ala Leu
195 200 205

Ser Gly Arg Trp Ser Val Ala Arg Gly Leu Val Leu Thr Ala Ile Val
210 215 220

Leu
225

<210> 9

<211> 230

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium diphtheriae*

<220>

<221> misc_feature

<223> PptT

<400> 9

Met Ile Ala Gly Asn Asn Ser Glu Tyr Ala Leu Asp Ser Arg Leu Phe
1 5 10 15

Pro Gln Ser Ala Arg Ser Thr Ala Leu Leu Val Pro Arg His Thr Pro
20 25 30

Asp Leu Ser Asn Phe Asn Arg Leu His Val Leu Glu Lys Ala Gln Val
35 40 45

Lys Asn Ala Val Ala Val Arg Arg Ala Glu Phe Gly Asp Ala Arg Trp
50 55 60

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

Ile Leu Arg Gly Glu Arg Gly Met Pro Leu Trp Pro Val Gly Ile Ala
85 90 95

Gly Ser Leu Thr His Thr Glu Gly Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Pro
100 105 110

Thr Thr Glu Val Ala Ser Met Gly Ile Asp Ala Glu Ile Ala Glu Glu
115 120 125

10

ES 2 529 259 T3

Leu Pro Gly Gly Ile Leu Gly Ser Ile Ala Arg Pro Asn Glu Ile Ala
130 135 140

Met Leu Asp Asp Leu Arg Ala Arg Gly Leu Leu Phe Ala Asp Arg Leu
145 150 155 160

Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr Lys Ala Trp Phe Pro Ile Thr
165 170 175

Gln Arg Trp Leu Asp Phe Asp Gln Ala Glu Ile Asp Ile Arg Ala Asp
180 185 190

Gly Thr Phe Ile Ser Tyr Leu Leu Ile Arg Pro Thr Pro Phe Pro Phe
195 200 205

Ile Glu Gly Lys Trp Ala Ile His Asp Gly Tyr Val Val Ala Thr Thr
210 215 220

Val Ile Pro Ala Met Gly
225 230

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de una proteína PptT 4'-fosfopanteteinil transferasa de una bacteria patogénica que contiene ácidos micólicos como diana para el cribado *in vitro* de compuestos para identificar a aquellos que inhiben la biosíntesis de ácidos micólicos, en el que se identifica un compuesto que inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos si inhibe dicha actividad de PptT.
- 2.** El uso según la reivindicación 1, en el dicha proteína PptT es de una bacteria seleccionada del grupo consistente en corinobacterias, micobacterias y nocardias.
- 10 **3.** El uso según la reivindicación 2, en el que dicha proteína PptT es de una bacteria seleccionada del grupo consistente en *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium xenopi*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova* y *Nocardia otitidiscaviarum*.
- 15 **4.** El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha proteína PptT se selecciona del grupo consistente en las SEQ NO: 2 a 9.
- 20 **5.** Un proceso de cribado *in vitro* para identificar compuestos que inhiben la biosíntesis de ácidos micólicos, **caracterizado porque** se mide la actividad de una proteína PptT 4'-fosfopanteteinil transferasa de una bacteria patogénica que contiene ácidos micólicos en presencia o ausencia de dichos compuestos, en el que se identifica un compuesto que inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos si inhibe dicha actividad de PptT.
- 6.** El proceso según la reivindicación 5, en el que dicha actividad de PptT se mide (i) incubando una PptT aislada con una proteína Pks o subunidad de la misma que comprende un dominio de proteína portadora de acilo, y con una acetil-CoA marcada, (ii) precipitando dicha proteína Pks o subunidad de la misma y (iii) midiendo el nivel de marcaje de dicho precipitado.
- 25 **7.** El proceso según la reivindicación 5 o 6, en el que dicha PptT es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

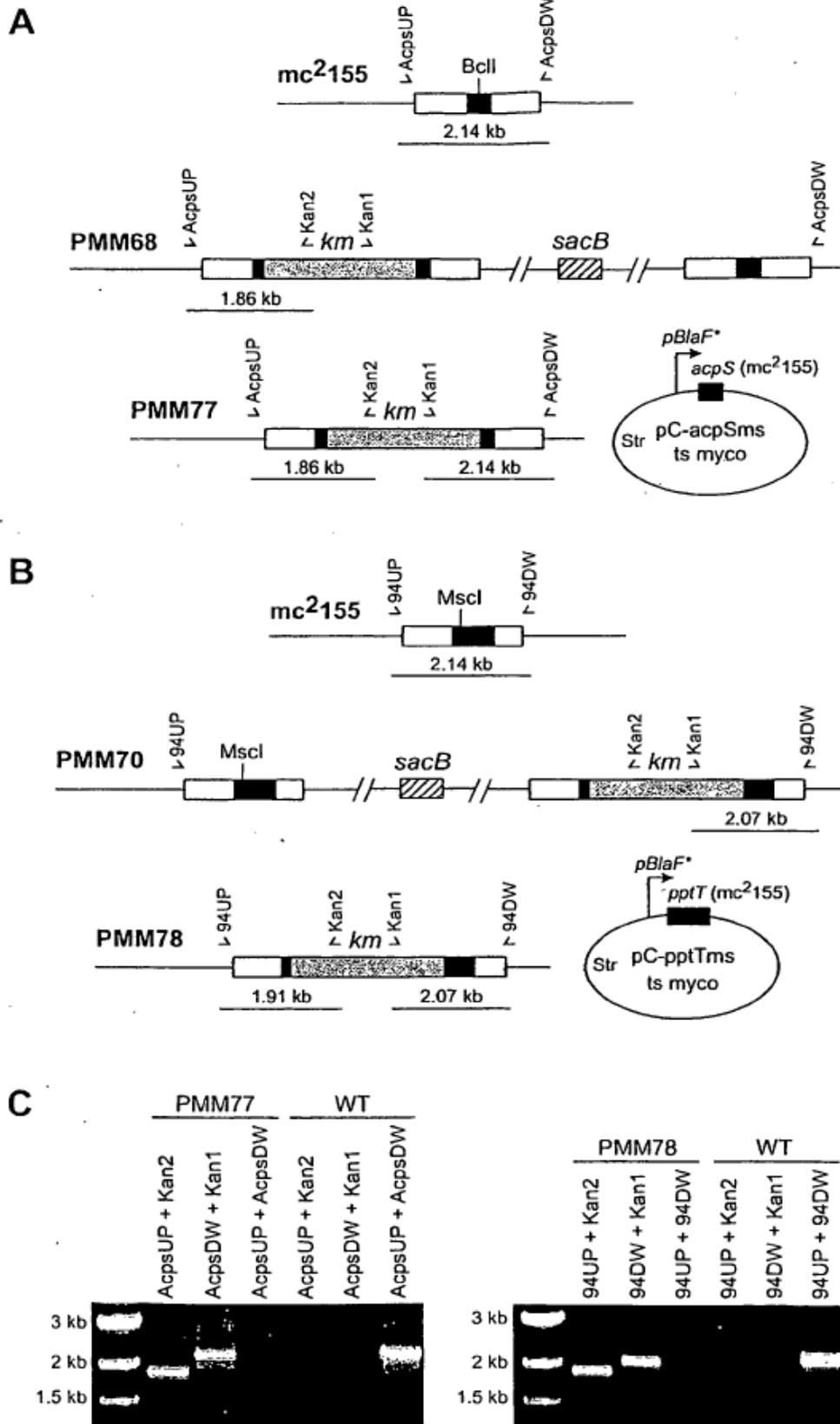


Figura 1

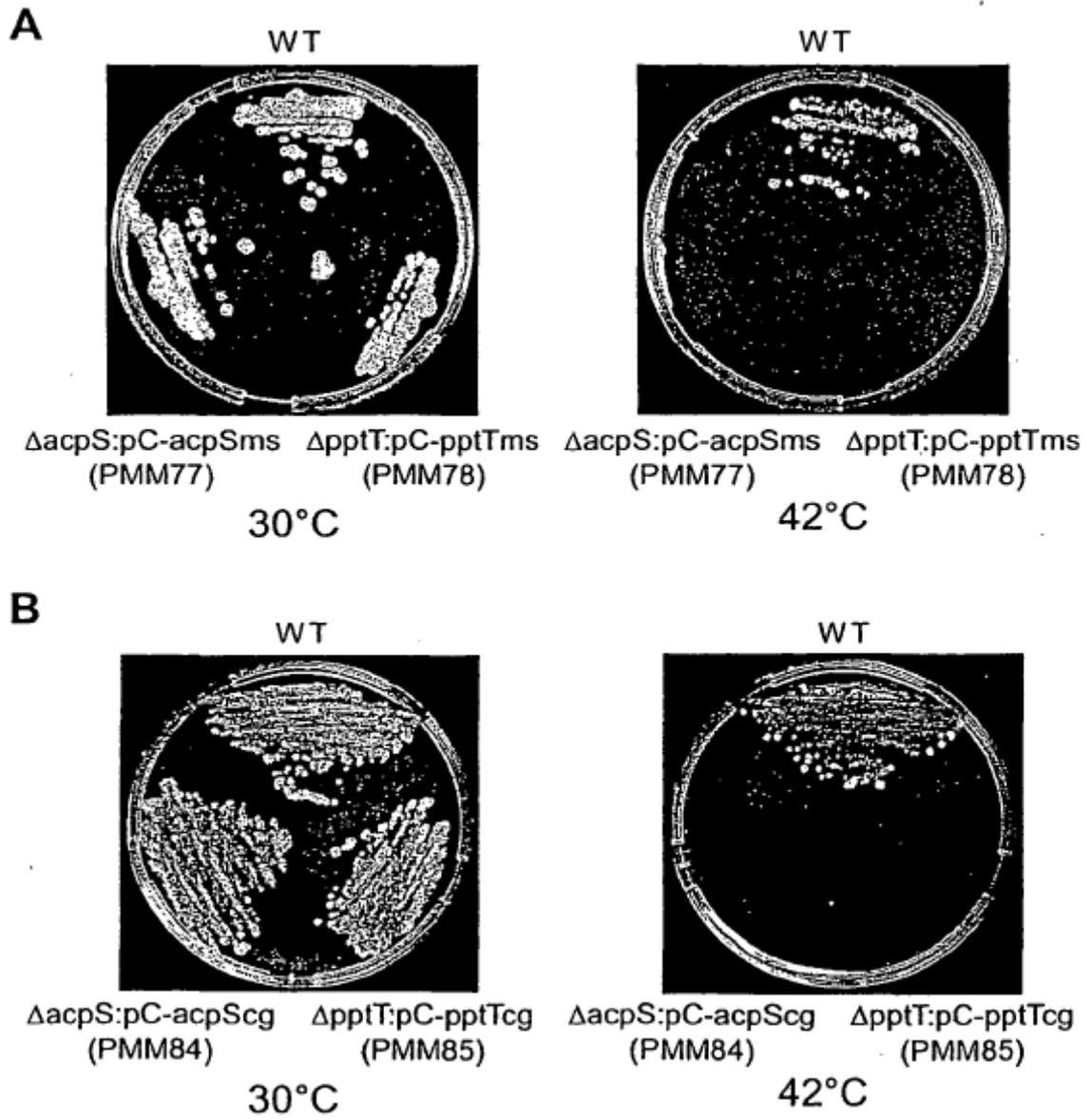


Figura 2

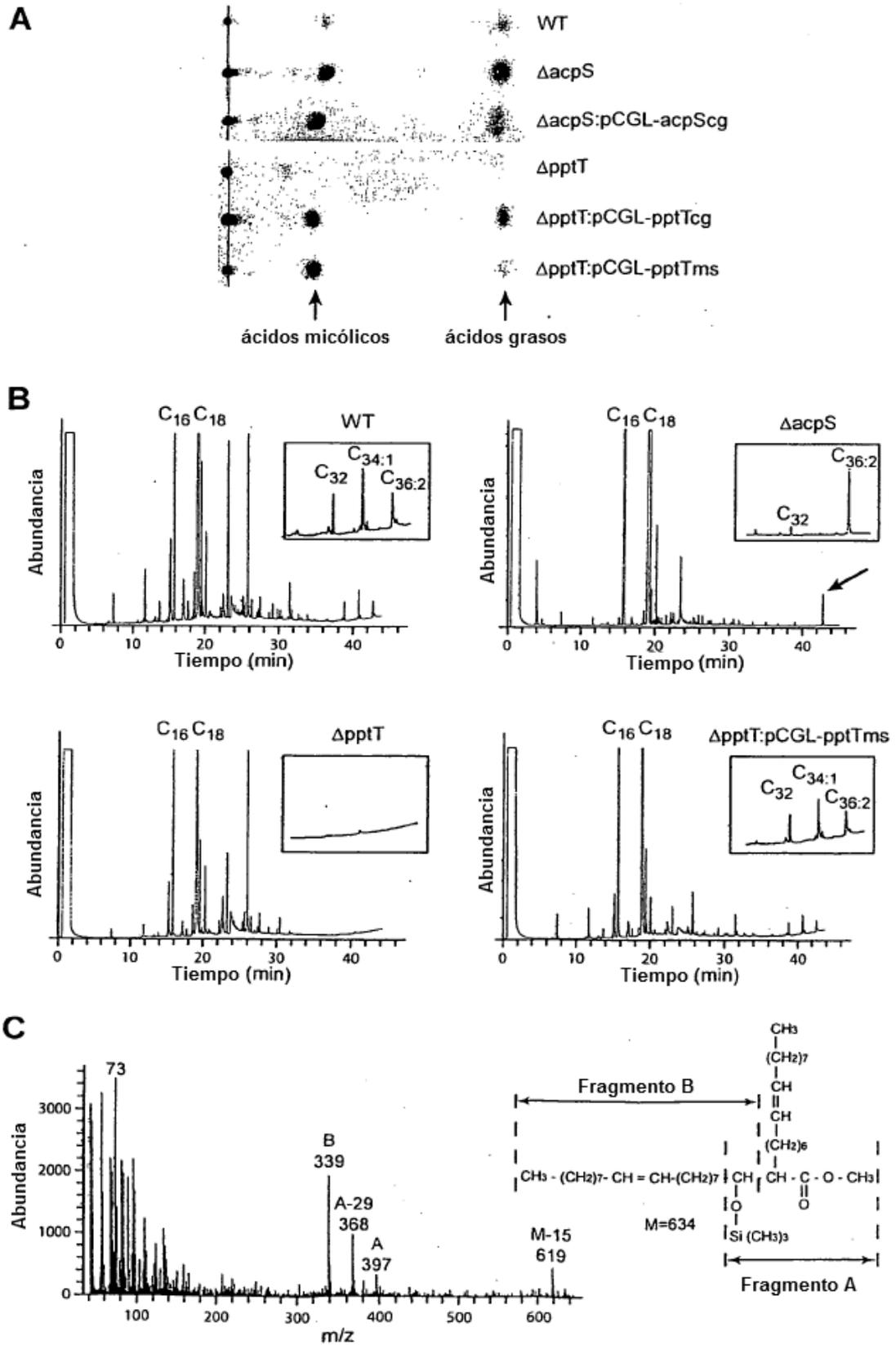


Figura 3

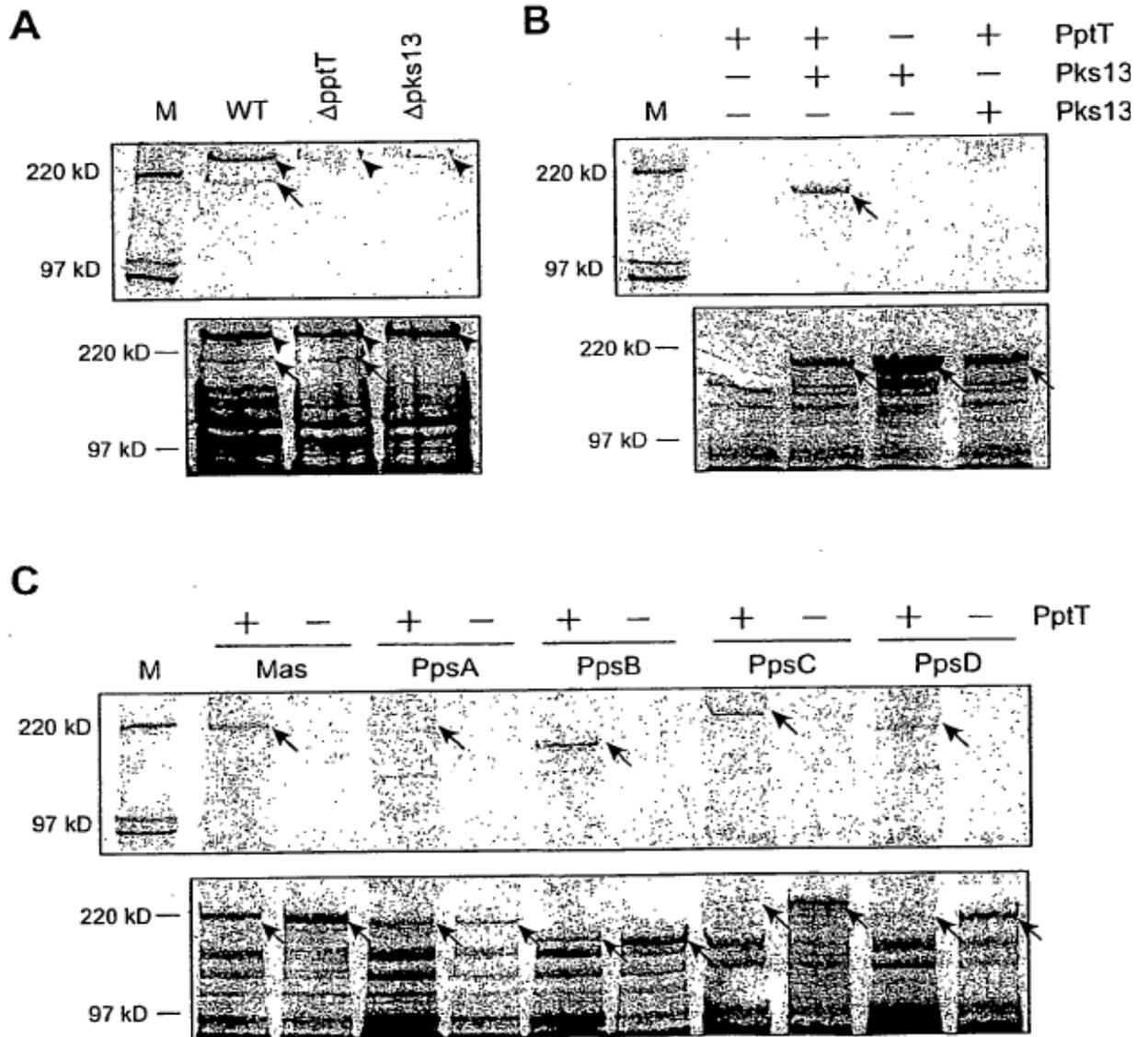


Figura 4

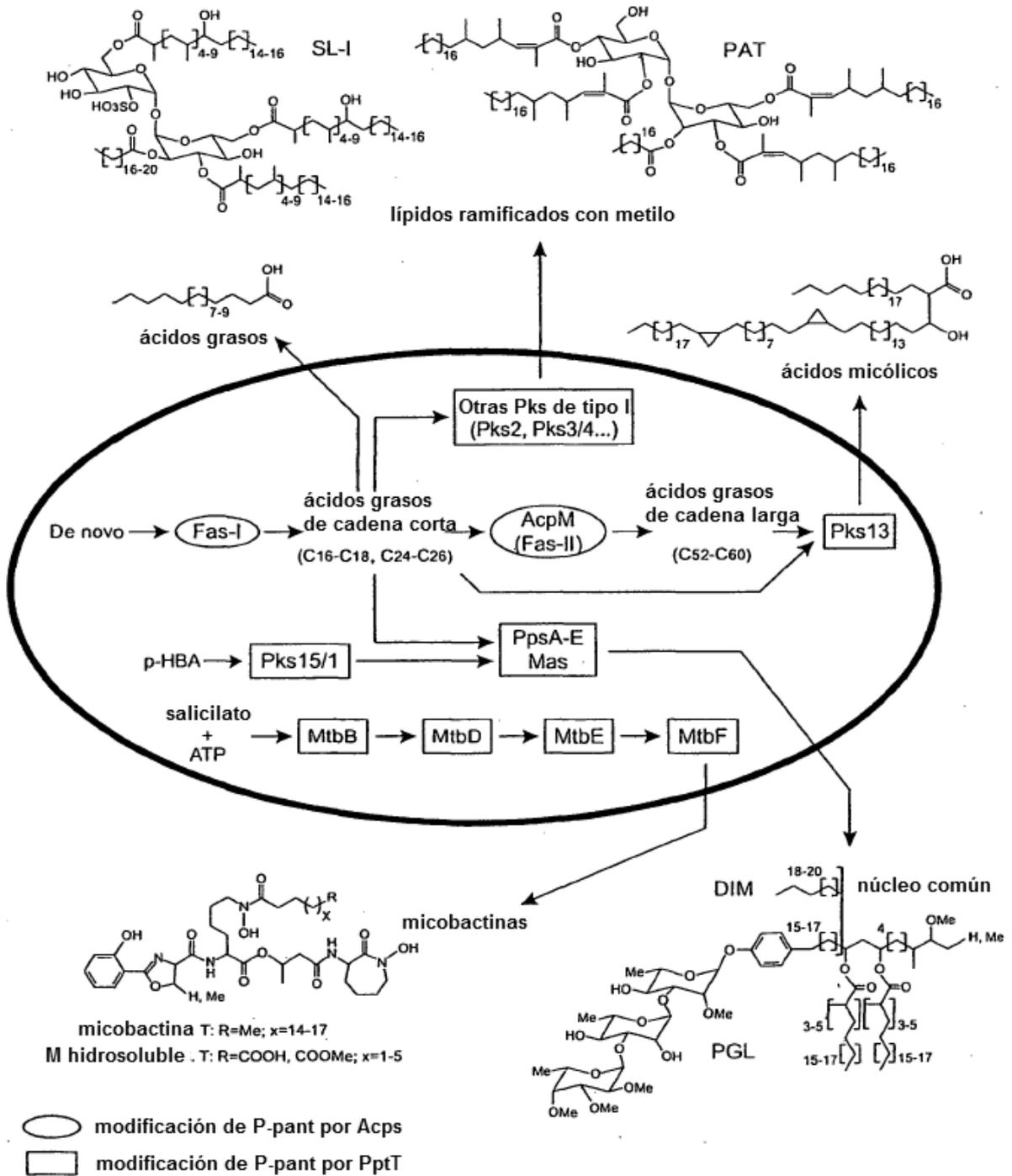


Figura 5