

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 629**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2008 PCT/AU2008/000474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2008 WO08119134**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2008 E 08733308 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2142638**

54 Título: **Métodos para producir metabolitos secundarios**

30 Prioridad:

02.04.2007 AU 2007901738 P

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

07.06.2017

73 Titular/es:

**NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED
(100.0%)**

**RUPERT MYERS BUILDING GATE 14, BARKER
STREET UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES
NSW 2052, AU**

72 Inventor/es:

**NEILAN, BRETT A.;
ROBERTS, ALEX y
COPP, JANINE**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 615 629 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

Métodos para producir metabolitos secundarios.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a métodos para producir metabolitos secundarios usando bacterias *Synechocystis* sp. transformadas, y metabolitos secundarios producidos por las bacterias *Synechocystis* sp. La invención se refiere adicionalmente a enzimas fosfopanteteinil transferasa.

10

Antecedentes

La síntesis no ribosomal permite a los microorganismos producir una amplia gama de nuevos compuestos, incluyendo ácidos carboxi, anillos heterocíclicos, ácidos grasos y aminoácidos no proteínógenos modificados. Los polipéptidos pequeños se ensamblan mediante péptido sintetasa al igual que otros compuestos, como los ácidos grasos, están unidos por otras sintetasas durante la síntesis en el ribosoma.

15

La síntesis no ribosomal proporciona una ruta de síntesis de compuestos que será costosa o imposible de obtener usando procedimientos químicos sintéticos. Los péptidos no ribosómicamente sintetizados comparten ciertas características. Estos pequeños péptidos bioactivos tienen, por lo general, entre 2 y 50 residuos aminoácídicos de longitud y poseen actividades biológicas potentes. La mayoría de los ejemplos de estos compuestos son también altamente resistentes a la degradación física y química, lo que les hace ideal para su uso como productos terapéuticos orales. Los productos valiosos de la síntesis peptídica microbiana no ribosomal incluyen el inmunosupresor ciclosporina A y antibióticos tales como la penicilina, gramicidina S, vancomicina, cefalosporinas y surfactinas.

20

25

Dichos compuestos se sintetizan por rutas complejas del metabolismo secundario que implican policétido sintetasas (PKS), sintetasas peptídicas no ribosomales (NRPS) y ácido graso sintetasas (FAS). Estas enzimas se activan por fosfopanteteinil transferasas (PPT). Las PPT activan las proteínas portadoras que son esenciales para la actividad de PKS, NRPS y FAS. Las PPT convierten las proteínas portadoras inactivas en sus holo-formas activas que portan cofactores a través de la transferencia del resto esencial 4'fosfopanteteína protésico de la coenzima A (CoA) (**figura 1**).

30

1).

Las cianobacterias constituyen una fuente rica de metabolitos secundarios obteniéndose la mayor parte de PKS, NRPS y FAS. Debido a su amplia distribución intergenérica de los sistemas enzimáticos integrados, las cianobacterias proporcionan una fuente de muchos módulos de péptido sintetasa de activación y modificación de aminoácidos no caracterizados. En consecuencia, se han seleccionado cianobacterias de agua dulce y marinas para determinar la bioactividad que revela productos naturales con aplicaciones biológicas novedosas y que implican claramente a las cianobacterias como una fuente rica de compuestos potencialmente útiles.

35

40

La tesis doctoral de J.N. Copp (2005, Catalysed activation of cyanobacterial biosynthetic pathways by fosfopanteteinil transferasas. University of New South Wales: School of Biotechnology and Biomolecular Science) está relacionada con las rutas biosintéticas en las cianobacterias que implican fosfopanteteinil transferasas.

El análisis de rutas de síntesis de péptidos cianobacterianos no ribosomales, policétidos y ácidos grasos ha revelado estructuras bioquímicas imprevistas que muestran el potencial de los nuevos productos de cianobacterias. Sin embargo, las cepas de cianobacterias que sintetizan compuestos naturales generalmente son cepas asociadas al crecimiento más lento o requisitos de cultivo complicados. Por lo tanto, las especies que producen productos naturales pueden excluirse en el cribado basado en cultivos. Además, la detección actual de productos naturales se basa en la propagación del organismo. Dado que se estima que menos del 1 % de los microorganismos son cultivables, sin embargo, la mayor parte de las bioactividades potenciales presentes en la naturaleza no es detectable. Como alternativa, se han usado síntesis orgánicas que consumen mucho tiempo para crear un producto natural modificado. Aunque los métodos moleculares pueden producir la información genética, se requiere la expresión recombinante en un organismo huésped adecuado para permitir el aislamiento y la producción de compuestos novedosos.

50

55

La capacidad de expresar de forma heteróloga y caracterizar bioquímicamente proteínas recombinantes y rutas de biosíntesis sigue siendo un problema significativo con respecto a las cianobacterias.

Resumen

La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 no produce ningún metabolito secundario a pesar de que posee una PPT que podría permitir potencialmente la producción de proteínas portadoras activas. La PPT de *Synechocystis* 5 tiene una amplia especificidad de sustrato y es capaz de activar PKS, NRPS y FAS a pesar del hecho de que esta especie no codifica de forma natural los genes peptídicos o policétidos no ribosomales. Este fondo nulo permite la rápida identificación de los productos producidos potencialmente mediante la expresión heteróloga en esta especie. Esto indica el potencial de *Synechocystis* como un microorganismo adecuado y eficiente para la producción de novedosos péptidos y policétidos no ribosomales.

10

De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método para la producción de metabolitos secundarios, comprendiendo el método las etapas de transformar bacterias *Synechocystis* sp. con uno o más de un gen péptido sintetasa, un gen policétido sintasa, o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios, cultivar las bacterias *Synechocystis* sp. en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más 15 genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios, y purificar los metabolitos secundarios de las bacterias.

En una realización, el método comprende adicionalmente, antes de la etapa (c), la etapa de cribar las bacterias *Synechocystis* sp. para determinar la producción de metabolitos secundarios. En una realización, la etapa de cribado 20 comprende cromatografía líquida de alto rendimiento o espectrometría de masas.

En una realización, la bacteria *Synechocystis* sp. es *Synechocystis* sp. PCC6803. Preferiblemente, el metabolito secundario es un péptido, un policétido, un ácido graso, o un derivado de los mismos. En una realización, el péptido, policétido, ácido graso o un derivado de los mismos es un compuesto bioactivo seleccionado entre el grupo que 25 consiste en un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente anticanceroso, un agente inmunosupresor, un anestésico, un analgésico, un producto antitumoral, un antibiótico, un anticolesterolémico, un agente antiparasitario, un agente terapéutico veterinario, un producto agroquímico y un cosmético.

30 En una realización, el uno o más genes sintetasa están unidos operativamente a un promotor activo en *Synechocystis* sp. Preferiblemente, el promotor es un promotor inducible, tal como un promotor inducible variando la intensidad de la luz a la que las bacterias se exponen durante el cultivo.

En una realización, el uno o más genes sintetasa están en un plásmido, fásmid o cósmido. En una realización, la 35 transformación de las bacterias *Synechocystis* sp está mediada por transposones. En una realización, las bacterias se transforman con múltiples genes péptido sintetasa, policétido sintasa, o ácido graso sintasa formando un agrupamiento de genes biosintéticos.

En una realización, las bacterias *Synechocystis* sp. expresan una fosfopanteteinil transferasa exógena (PPT). 40 Preferiblemente, la PPT exógena está integrada de forma estable en el genoma de *Synechocystis* sp. Preferiblemente, la PPT exógena es una PPT cianobacteriana, tal como una PPT de *Nodularia spumigena*. En una realización, la PPT es de *Nodularia spumigena* NSOR10. Preferiblemente, la PPT comprende la secuencia aminoacídica como se expone en la SEQ ID NO: 1, o una variante de fragmento de la misma.

45 En otro aspecto, se proporciona un metabolismo secundario producido de acuerdo con el método del primer aspecto.

En otro aspecto, se proporciona una bacteria *Synechocystis* sp. transformada que comprende uno o más de un gen 50 péptido sintetasa, un gen policétido sintasa, o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios.

En otro aspecto, se proporciona el uso de bacterias *Synechocystis* sp. para la producción de metabolitos secundarios, en el que las *Synechocystis* sp. se transforman con uno o más de un gen péptido sintetasa, un gen policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios, y las 55 bacterias *Synechocystis* sp. se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios.

En una realización, la bacteria *Synechocystis* sp. es *Synechocystis* sp. PCC6803.

En una realización, las bacterias *Synechocystis* sp. expresan una PPT exógena. En una realización, la PPT exógena está integrada de forma estable en el genoma de *Synechocystis* sp. En una realización, la PPT exógena es una PPT cianobacteriana de *Nodularia spumigena*. En una realización, la PPT es de *Nodularia spumigena* NSOR10. Más preferiblemente, la PPT comprende la secuencia aminoacídica como se expone en la SEQ ID NO: 1, o una variante de fragmento de la misma.

En otro aspecto, se proporciona una fosfopanteteinil transferasa codificada por la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma.

10 En otro aspecto, se proporciona una fosfopanteteinil transferasa codificada por la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2, o una variante o fragmento de la misma.

En una realización, la fosfopanteteinil transferasa codificada por el aminoácido expuesto en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, o una variante funcional de fragmento de las mismas se proporciona en un vector. El vector puede proporcionarse en una célula huésped. La célula huésped puede ser una célula huésped de *Synechocystis* sp., tal como *Synechocystis* sp. PCC6803.

En otro aspecto, se proporciona un método para la producción de metabolitos secundarios, comprendiendo el método:

- 20
- (a) transformar las bacterias *Synechocystis* sp. con un gen péptido sintetasa requerido para la producción de metabolitos secundarios;
 - (b) cultivar las bacterias *Synechocystis* sp. en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios; y
 - 25 (c) purificar los metabolitos secundarios de las bacterias.

en el que dichas bacterias *Synechocystis* sp. expresan una fosfopanteteinil transferasa exógena (PPT) de *Nodularia spumigena*.

30 En otro aspecto, se proporciona un método para la producción de metabolitos secundarios, comprendiendo el método:

- 35
- (a) transformar las bacterias *Synechocystis* sp. con uno o más de un gen policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios;
 - (b) cultivar las bacterias *Synechocystis* sp. en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios; y
 - (c) purificar los metabolitos secundarios de las bacterias,

en el que dichas bacterias *Synechocystis* sp. expresan una fosfopanteteinil transferasa exógena.

40 En otro aspecto, se proporciona el uso de bacterias *Synechocystis* sp. para la producción de metabolitos secundarios en el que, las *Synechocystis* sp. se transforman con una péptido sintetasa para la producción de metabolitos secundarios, y las bacterias *Synechocystis* sp. se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios.

Las *Synechocystis* sp. pueden expresar una fosfopanteteinil transferasa exógena PPT.

50 En otro aspecto, se proporciona el uso de bacterias *Synechocystis* sp. para la producción de metabolitos secundarios en el que, las *Synechocystis* sp. se transforman con uno o más de un policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios, y las bacterias *Synechocystis* sp. se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios, y

55 las bacterias *Synechocystis* sp. expresan una fosfopanteteinil transferasa exógena.

También se proporcionan vectores que comprenden secuencias de la invención, y células huésped que comprenden las secuencias y vectores de la invención. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un metabolito secundario preparado de acuerdo con la invención, junto con un portador,

excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La **figura 1** es un diagrama que muestra la activación de PPT de apo-proteínas transportadoras. Una PPT cataliza el ataque nucleófilo de la cadena lateral hidroxilo del residuo de serina de proteína portadora conservado en el enlace 5'-β pirofosfato CoA. Esto causa la transferencia del resto fosfopanteteinilo de CoA a la cadena lateral del residuo de serina convertido, que convierte la proteína portadora de una forma apo inactiva a una forma holo activa (mostrado a la derecha en la figura 1).
- 10 La **figura 2** es una tabla que enumera la fuente de secuencias de PPT de cianobacterias utilizadas por los inventores. Se obtuvieron PPT de cianobacterias de secuencias de bases de datos publicadas (genoma), o se amplifican a partir de cebadores redundantes. N/a (no aplicable) - se refiere a las secuencias obtenidas a partir de bases de datos de genoma en línea.
- 15 La **figura 3** muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica en recuadros sombreados de representantes de la familia PPT "tipo Sfp". El sombreado de color negro indica residuos idénticos, mientras que el sombreado gris indica residuos similares. Se muestran dos subfamilias. Las secuencias de F/KES (alineamiento superior) y W/KEA (alineamiento inferior) se separan y una línea de consenso (cons) se muestra debajo. Las secuencias incluyen; Pse, *Pseudomonas aeruginosa*, AAG04554; Xan, *Xanthomonas albicans*, AAG28384; Vib, *Vibrio cholerae*, AAD48884; Pho, *Photorhabdus luminescens*, AAK16071; Bac, *Bacillus subtilis*, P39135; Syn, *Synechocystis* PCC6803, BAA10326; Cae, *Caenorhabdus elegans*, A89451; Dro, *Drosophila melanogaster*, AAM12253. Los motivos de PPT están en recuadros y numerados, incluyendo 1* como se describe. La numeración para Sfp de *Bacillus subtilis* se muestra entre paréntesis.
- 20 La **figura 4** es un diagrama de árbol filogenético que muestra un análisis de una selección de PPT de tipo Sfp. El árbol muestra clados de AcpS y PPT de tipo Sfp con los números de acceso dados entre paréntesis. Se muestran datos de remuestreo significativos (por encima de 500 de 1000 repeticiones). Se escoge AcpS de *E. coli* como un grupo externo para el lado de PPT de tipo Sfp. Se observaron dos subgrupos y se distinguieron como los clados W/KEA y F/KES respectivamente. Las letras/símbolos en superíndice se refieren a la biosíntesis de PKS (P); la biosíntesis de NRPS (N); la biosíntesis de híbrida de PKS/NRPS (H); la biosíntesis de sideróforos (S); secuencias obtenidas a través de la traducción de secuencias contiguas de proyectos de genoma no finalizados (*); PPT de tipo Sfp que se encuentran en los genomas sin una AcpS (A-); PPT de cianobacterias asociadas a la síntesis de glucolípidos de heterocistos (HET); y PPT asociadas a la biosíntesis de lisina (L).
- 25 La **figura 5** es una fotografía que muestra transformantes de desactivación de *Synechocystis* sp. PCC6803 de *Sppt* en placas BGTS con cloranfenicol. La **figura 5A** muestra colonias de inactivaciones de *Sppt* de *Synechocystis* sp. PCC6803 de tipo silvestre; la **figura 5B** muestra colonias de control positivo de plásmidos de resistencia a cloranfenicol de *Synechocystis* sp. PCC6803 de tipo silvestre; la **figura 5C** muestra colonias de desactivaciones de *Sppt* complementadas con *N. punctiform* fosfopanteteinil transferasa ($\Delta NsPPT^+$); la **figura 5D** muestra un control negativo de $\Delta NsPPT^+$ que no produjo ninguna colonia.
- 30 La **figura 6** es una fotografía de un gel usado para la electroforesis de productos de detección por PCR de cepas *Sppt* alterada y cepas *Synechocystis* sp. PCC6803 complementadas con *NsPPT*. Carril M, marcador del peso molecular; Carril 1, gen *Sppt* de *Synechocystis* sp. PCC6803 WT; Carriles 2-4, mutante heterocigoto de desactivación de *Sppt* de *Synechocystis* sp. PCC6803 de tipo silvestre (WT) con subcultivo repetido en medio selectivo; Carril 5, gen *Sppt* complementado con $\Delta NsPPT^+$; Carriles 6-7, mutante heterocigoto de *Sppt* complementado con $\Delta NsPPT^+$ con subcultivo repetido en medio selectivo; Carril 8, mutante de desactivación de *Sppt* de $\Delta NsPPT^+$ completamente segregado; Carril 9, control PCR negativo; Carril 10, plásmido de desactivación, pGCSlr, con casete de cloranfenicol insertado en el gen *Sppt*. Las flechas indican la segregación de *Sppt* en copias cromosómicas del genoma con subcultivo repetido.
- 35 La **figura 7** es una fotografía de un gel SDS-PAGE de fosfopanteteinil de *Synechocystis* sp. PCC8603 (sPPT) purificado (**figura 7A**) y proteína portadora de síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. PCC8603 (SACP) (**figura 7B**). M: Marcadores de amplio rango y previamente teñidos (New England Biolabs).
- 40 La **figura 8** muestra los espectros de masas de SACP (**figura 8A**) y SACP después de un ensayo de fosfopanteteinilación con *Sppt* (**figura 8B**).
- 45 La **figura 9** proporciona gráficos que muestran la caracterización enzimática de *Sppt* con respecto a SACP3. La **figura 9A** muestra el efecto del pH sobre la actividad de fosfopanteteinil transferasa según se mide por ensayo de HPLC. La **figura 9B** muestra el efecto de CoA, el donante del grupo 4'-fosfopanteteinil, sobre la actividad de *Sppt*.
- 50 La **figura 10** muestra los espectros de masas del control de la proteína portadora arilo de *N. punctiforme*

ATCC29133 (NpArCP) (**figura 10A**), NpArCP después de la incubación con Sppt (**figura 10B**), el control de la proteína portadora peptidilo de *M. aeruginosa* PCC7806 (MPCP) (**figura 10C**); y MPCP después de la incubación con Sppt (**figura 10D**).

La **figura 11** muestra los espectros de masas del control de la proteína portadora acilo de *N. punctiforme* ATCC29133 (NpACP) (**figura 11A**), NpACP con Sppt (**Figure 11B**), el control de la proteína portadora péptido sintetasa no ribosomal peptidilo de *Bacillus brevis* ATCC8185 (TycPCP) (**figura 11C**) y TycPCP después de la incubación con Sppt (**figura 11D**).

La **figura 12** es una tabla que muestra la fosfopanteteinilación de proteínas portadoras no específicas por la PPT de *Synechocystis* sp. PCC6803, Sppt. * Holo-CP se detectó por la adición de masas de un resto fosfopanteteinilo (340 Da) a través de espectrometría de masas. † El % de holo-CP se estimó por comparación de la abundancia de holo y apo-CP en espectros de masas. ND: no detectado.

La **figura 13** es un diagrama de árbol filogenético que muestra el análisis de PPT de cianobacterias. Los números de acceso dados entre paréntesis, y las secuencias subrayadas indican aquellas aisladas durante este estudio. Se muestran datos de remuestreo significativos (más de 500 de 1000 repeticiones). La PPT de las bacterias verdes del azufre *Chlorobium tepidium* se escogió como un grupo externo. Se observan distintos filotipos y se representan como el subgrupo A (asociado a la cianobacteria formadora de heterocistos) y B respectivamente.

La **figura 14** muestra un alineamiento de aminoácidos en recuadros sombreados de secuencias representativas de PPT. La PPT NhcS de *N. spumigena* NSOR10 se alineó con all5359 de *Nostoc* sp. PCC7120 (P37695), slr0495 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (BAA10326) y Sfp de *B. subtilis* (P39135). La numeración de NhcS se muestra y el porcentaje de similitud con respecto a NchS se muestra entre paréntesis. Los motivos de PPT se presentan en recuadros y se numeran.

La **figura 15** es un diagrama que muestra una comparación del loci *hetMNI* de *Nostoc punctiforme* ATCC29133 y *Nodularia spumigena* NSOR10. Las flechas indican la dirección del gen. Se representa por la flecha discontinua un segmento parcial de la secuencia de *hetM* de 1520 pares de bases (pb).

La **figura 16** muestra datos de hibridación de southern de *N. spumigena* NSOR10. La figura 16A es una fotografía de un gel que muestra las hibridaciones de southern de las sondas de PPT en *N. spumigena* NSOR10. "+" indica una banda que se detectó por quimioluminiscencia, "-" indica que no había ninguna banda visible. Los controles positivos utilizaron ADN plasmídico linearizado. La **figura 16B** es una tabla que resume los resultados de los experimentos de hibridación de southern. La numeración entre paréntesis en la tabla mostrada en la figura 16B corresponde a los carriles mostrados en el gel de la figura 16A. Slr0495 se refiere a la PPT (BAA10326) de *Synechocystis* sp. PCC 6803, Nppt (ZP_00110892) se refiere a una PPT de *N. punctiforme* ATCC29133 y *nchS* es la PPT que se encuentra en *N. spumigena* NSOR10.

La **figura 17** muestra los espectros obtenidos a partir de espectrometría de masas por nanonebulización de panteteinilación de proteína portadora arilo (ArCP), proteína portadora peptidilo (PCP) y proteína portadora acilo (ACP). **Figura 17A:** Espectro de masas de Arcp¹. **Figura 17B:** Espectro de masas de Arcp panteteinilado después de la incubación con NhcS. **Figura 17C:** Espectro de masas de Mpcp². **Figura 17D:** Espectro de masas de Mpcp panteteinilado después de la incubación con NhcS.

Figura 17E: Espectro de masas de Nppcp³. **Figura 17F:** Espectro de masas de Nppcp panteteinilado después de la incubación con NhcS.

Definiciones

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente exclusivamente". Además, las variaciones de la expresión "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen significados correspondientemente variados.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la referencia a "un" elemento no excluye el plural, a menos que el contexto determine otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "una construcción de ácido nucleico" no debe interpretarse en el sentido de excluir la posibilidad de múltiples copias de tales construcciones de ácidos nucleicos.

La expresión "al menos uno", cuando se usa en el contexto de un grupo de elementos seleccionables, incluye cualquiera y todos los miembros del grupo seleccionado individualmente e incluye cualquier combinación de los miembros del grupo. De forma similar, la expresión "al menos dos", al usarse en el contexto de un grupo de elementos seleccionables incluye cualquier selección de dos o más miembros del grupo en cualquier combinación.

Como se usa en el presente documento, un "compuesto bioactivo" es un compuesto que influye en la estructura biológica, función o actividad de una célula o tejido de un organismo vivo. Un compuesto bioactivo puede, en general, obtener una respuesta biológica o efecto o actividad en el usuario final de destino. Por ejemplo, un

compuesto bioactivo puede tener un efecto beneficioso sobre el metabolismo de un ser humano, planta o animal, y/o proporcionar efectos terapéuticos y/o cosméticos. Los ejemplos de compuestos bioactivos incluyen, pero sin limitación, agentes antivíricos, agentes antifúngicos, agentes anticancerosos, agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores, anestésicos, analgésicos, productos antitumorales, antibióticos, antiolesterolémicos, agentes antiparasitarios, terapias veterinarias, productos agroquímicos, agentes cosméticos, polinucleótidos, proteínas, péptidos, polisacáridos, hormonas, fármacos, vitaminas, esteroides, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, hidratantes, carotenoides, agentes absorbentes de UV, agentes de protección UV, y similares.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10

La invención se refiere a métodos para producir metabolitos secundarios, y en algunas realizaciones, a metabolitos secundarios producidos por los métodos de la invención. A pesar de tener un fondo nulo y no codificar de forma natural los genes no ribosomales péptido sintasa o policétido sintasa, las cianobacterias *Synechocystis* sp. pueden producir metabolitos secundarios al transformarse con un gen péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa. En consecuencia, *Synechocystis* sp. proporciona un excelente potencial como un huésped heterólogo en el que producir metabolitos secundarios.

15

En un aspecto, se proporciona un método para la producción de metabolitos secundarios, comprendiendo el método transformar bacterias *Synechocystis* sp. con uno o más de un gen péptido sintetasa, un gen policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios, cultivar las bacterias *Synechocystis* sp. en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios, y purificar los metabolitos secundarios de las bacterias. El gen péptido sintetasa puede ser un gen no ribosomal péptido sintetasa.

20

Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden seleccionarse entre cualquier especie o cepa adecuada, o derivado de las mismas. Por ejemplo, las bacterias *Synechocystis* sp. pueden ser las cepas PCC6301, 6307, 6701, 6906, 7008 o 9632 (véase Archives of Microbiology, Christiansen y col. 2001). En una realización particular, la *Synechocystis* sp. es PCC6803 (Pasteur Culture Collection, Paris). Se prevé que el método puede ser adecuado para la producción de los metabolitos secundarios, tales como un péptido o policétido, ácido graso o un derivado de los mismos. El péptido puede ser un péptido no ribosómico. Los metabolitos secundarios pueden comprender adicionalmente un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente anticanceroso, un agente inmunosupresor, un anestésico o un analgésico, productos antitumorales, antibióticos, antiolesterolémicos, agentes antiparasitarios, terapias veterinarias y productos agroquímicos y cosméticos. Los ejemplos específicos de dichos agentes incluyen, pero sin limitación, vancomicina, microcistina, nodularina, saxitoxina, ciclosporina y penicilina. Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden seleccionarse entre cualquier especie o cepa adecuada, o derivado de las mismas. Por ejemplo, las bacterias *Synechocystis* sp. pueden ser las cepas PCC6301, 6307, 6701, 6906, 7008 o 9632 (véase Archives of Microbiology, Christiansen y col. 2001). En una realización particular, la *Synechocystis* sp. es PCC6803 (Pasteur Culture Collection, Paris). Se prevé que el método puede ser adecuado para la producción de cualquier metabolito secundario, tal como un péptido, policétido, ácido graso o derivados o combinaciones de los mismos. El péptido puede ser un péptido no ribosómico. Los metabolitos secundarios pueden comprender adicionalmente un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente anticanceroso, un agente inmunosupresor, un anestésico o un analgésico, productos antitumorales, antibióticos, antiolesterolémicos, agentes antiparasitarios, terapias veterinarias y productos agroquímicos y cosméticos. Los ejemplos específicos de dichos agentes incluyen, pero sin limitación, vancomicina, microcistina, nodularina, saxitoxina, ciclosporina y penicilina.

30

El gen péptido sintetasa, gen policétido sintasa y/o gen ácido graso sintasa usados para transformar las bacterias *Synechocystis* sp. pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, los genes péptido sintetasa, policétido sintasa y ácido graso sintasa pueden obtenerse a partir de diversas bacterias y/o hongos diferentes. Los ejemplos de organismos potenciales a partir de los cuales los genes pueden obtenerse incluyen, pero sin limitación, microalgas tales como rodofitas, clorofitas, cromofitas y cianobacterias (por ejemplo, Chroococcales, Chamaesiphonales, Nostocales, Nostocaceae, Rivulariaceae, Scytonemataceae, Stigonematales), estreptomicas, bacilos, y diversas bacterias marinas incluyendo, así como simbiontes microbianas de animales y plantas.

35

A modo de un ejemplo no limitante únicamente, pueden obtenerse secuencias nucleotídicas adecuadas de genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa y sus secuencias de proteínas correspondientes a partir de una fuente cianobacteriana, tales como *Sorangium cellulosum* (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_010162), *Acaryochloris marina* MBIC11017 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso CP000843), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso CP000951), *Nodularia spumigena* CCY 9414 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso

40

45

50

55

NZ_AAVW00000000), *Fulvimarina pelagi* HTCC2506 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso AATP01000000) y *Synechococcus* sp. WH 5701 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NZ_AANO00000000).

- 5 A modo de un ejemplo no limitante adicional, pueden obtenerse secuencias nucleotídicas adecuadas de genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa y sus secuencias de proteínas correspondientes a partir de *Streptomycetaceae* tales como *Mycobacterium ulcerans* Agy99 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_008611), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_003155), *Mycobacterium ulcerans* Agy99 4680 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso CP000325), *Mycobacterium tuberculosis* H3Rv (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_000962) y *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_003888).

A modo de ejemplo no limitante adicional, pueden obtenerse secuencias nucleotídicas adecuadas de genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa y sus secuencias de proteínas correspondientes a partir de *Bacillus* sp. tales como *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_010184), *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_009725) y *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso NC_003450).

20 A modo de ejemplo no limitante adicional, un gen policétido sintasa adecuado o secuencia de proteínas puede obtenerse a partir de *Aspergillus niger* y/o *Aspergillus nidulans* (gen wA, Mayorga y col., Genetics 126 (1990) 73-79 (que puede obtenerse a través de GenBank número de acceso X65866).

25 El destinatario experto entenderá que cada uno de los números de acceso indicados en el presente documento incorporan por referencia todas las secuencias y los números de acceso que puede obtenerse a través del número indicado, tales como secuencias nucleotídicas y e proteínas específicamente identificadas de genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa.

30 Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden transformarse o transfectarse con uno o más de un gen péptido sintetasa, un gen policétido o un gen ácido graso sintasa usando cualquier método adecuado. Dichos métodos se conocen generalmente en la técnica y se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Joseph Sambrook, David W Russell, 3ª Edición, Cold Spring Harbour Press 2001), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F. M. y col. (Eds), John Wiley and Sons, Inc 2007), Molecular Cloning (Maniatis y col., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) y Current Protocols in Microbiology (Coico y col. (Eds), John Wiley and Sons, Inc, 2007).

En realizaciones particulares, el gen péptido sintetasa, policétido sintasa o ácido graso sintasa puede clonarse en un vector. El vector puede ser un vector plasmídico, un vector vírico, un fásmido, un cósmido o cualquier otra construcción de vehículo adecuada para la inserción de secuencias extrañas, su introducción en células y la expresión de las secuencias introducidas. El vector puede ser un vector de expresión que comprende secuencias de expresión de control y procesamiento tales como un promotor, un potenciador, señales de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción.

45 La construcción también puede incluir un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos, tales como cloranfenicol o tetraciclina. El material genético para inserción en la construcción se puede generar, por ejemplo, mediante la realización de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN diana. Los ácidos nucleicos resultantes pueden insertarse entonces en la construcción, por ejemplo, por reacciones de restricción-ligadura o por el método de clonación TA.

50 Los métodos adecuados para la introducción de construcciones de vector y otro material de ácido nucleico extraño en bacterias *Synechocystis* sp. se conocen generalmente en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col. (Eds), Nueva York: John Wiley & Sons, 2007) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook y col. 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).

55 A modo de ejemplo, *Synechocystis* sp. puede transformarse por el método de "choque térmico". En este método, las células se enfrían en presencia de cationes divalentes, tal como Ca^{2+} , que causa la permeabilidad de la pared celular. Las células se incuban en hielo con la construcción y se sometieron brevemente a choque térmico (por ejemplo, a 42 °C durante 0,5-2 minutos) haciendo que la construcción del vector entre en la célula. Como alternativa, *Synechocystis* sp. puede transformarse con la construcción del vector por electroporación, un método que implica

someter a choque brevemente las células con un campo eléctrico haciendo que las células desarrollen en poco tiempo orificios a través de los cuales la construcción puede entrar en la célula. Los mecanismos de reparación de membrana natural cierran rápidamente estos orificios después del choque.

5 El gen o genes péptido sintetasa, policétido sintasa o ácido graso sintasa puede insertarse en el genoma *Synechocystis* sp. por medio de uno o más transposones, u otros elementos móviles. Estos han demostrado movilizar grandes fragmentos de ADN de hasta 59 kb de tamaño. La movilización de transposones está mediada por transposasas, dando como resultado normalmente la inserción del ADN en secuencias diana en el genoma. Se ha descubierto que las transposasas putativas están asociadas a varias agrupaciones de genes biosintéticos tales como las agrupaciones de genes de biosíntesis de microcistina y nodularina. La capacidad de los transposones para

10 movilizar grandes agrupamientos génicos proporciona un sistema de transferencia de ADN adecuado para la transferencia de agrupamientos de genes biosintéticos diseñados a huéspedes nulos para la expresión de metabolitos secundarios.

15 Después de la entrada de la construcción en la célula, las bacterias *Synechocystis* sp. pueden cultivarse en condiciones adecuadas para facilitar la reproducción. Los métodos para el cultivo de bacterias se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Microbiology*, (Coico, y col. (Eds), John Wiley & Sons, Inc., 2007). El cultivo puede realizarse en un medio que contiene un sustrato que facilita la identificación de cepas transformadas, por ejemplo, un antibiótico tal como cloranfenicol, kanamicina o la tetraciclina.

20 Las cepas de *Synechocystis* sp. transformadas pueden seleccionarse y propagarse. Por ejemplo, si el vector diana contiene uno o más marcadores seleccionables, las células bacterianas de *Synechocystis* sp. transformadas pueden identificarse por la expresión del marcador o marcadores. Usando el ejemplo de un gen con resistencia a fármaco, tal como un gen con resistencia a cloranfenicol, los transformantes de *Synechocystis* sp. que crecen en el medio de selección que contiene cloranfenicol se pueden identificar como transformantes. En el caso de transformantes de *Synechocystis* sp. que expresan más de un marcador seleccionable, los transformantes dobles pueden identificarse por la capacidad de crecer en el medio de selección que contiene múltiples determinantes de selección.

Con el fin propósito de ilustración únicamente, un método específico que se puede utilizar para transformar bacterias *Synechocystis* sp. es como se indica a continuación. Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden transformarse con una construcción de eliminación génica que comprende secuencias que son homólogas a las secuencias de ADN de *Synechocystis* que flanquean el gen o genes péptido sintetasa, policétido sintasa o ácidos graso sintasa de interés. Se añade ADN a un volumen de 0,1-0,5 ml de cultivo de *Synechocystis* concentrado seguido de incubación durante 1-6 horas y colocación en placas. Después de 20-24 horas pueden aplicarse condiciones selectivas. Las colonias de transformantes llevan en aproximadamente una semana, y pueden volver a sembrarse en placas entonces con cada vez mayor concentración del antibiótico para el que se ha introducido un marcador de resistencia. Si se requiere un fenotipo mutante puro, todas las copias del genoma de tipo silvestre han de reemplazarse. Dos factores son importantes para obtener fácilmente la segregación: (1) un aumento gradual en la presión de selección de antibióticos, y (2) la selección de las condiciones de crecimiento en las que el fenotipo mutante tiene una ventaja competitiva o no está muy alterado en comparación con el tipo silvestre. Un método conveniente y rápido para la detección de la segregación de genotipos mutantes y de tipo silvestre es preparar ADN a partir de transformantes de *Synechocystis* propagados y amplificar la región de la mutación por PCR.

30

35

40

Se apreciará que, de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, las bacterias *Synechocystis* sp. pueden transformarse con múltiples péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa, lo que permite la generación de un agrupamiento de genes biosintético en el huésped bacteriano de *Synechocystis* sp. El agrupamiento biosintético puede comprender un híbrido de uno o más genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa. El gen policétido sintasa del agrupamiento o híbrido puede ser un gen no ribosomal policétido sintasa.

50 La regulación de la expresión de las secuencias de genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa puede conseguirse por el uso de secuencias reguladoras. Por ejemplo, puede usarse un vector de expresión que comprende secuencias de control y procesamiento de expresión, tal como un promotor, un potenciador, señales de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (donde la expresión de una secuencia polinucleotídica única operativamente al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (donde la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente al promotor se reprime por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. La secuencia reguladora puede regularse por un estímulo externo. Por ejemplo, los promotores inducibles de luz son particularmente útiles debido a la naturaleza fotosintética de las bacterias

55

Synechocystis sp. La presente invención no está limitada a este respecto y pueden usarse diversos promotores inducibles como se conoce por el experto en la técnica. Dichos promotores incluyen promotores inducidos por baja temperatura y por la acción de un compuesto químico, tal como promotores inducibles por triptófano, promotores inducibles por sal, promotores inducibles por nitrito, promotores inducibles por tirosina, y promotores inducibles por arabinosa.

Las bacterias *Synechocystis* sp. transformadas con uno o más de un gen péptido sintetasa, un gen policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa pueden cribarse para determinar la producción de los metabolitos secundarios. Después, los metabolitos secundarios pueden purificarse. Puede usarse cualquier método adecuado de cribado o purificación, teniendo en cuenta diversos factores tales como características estructurales, enzimáticas, funcionales, de tamaño del metabolito secundario deseado. Se conocen en la técnica métodos y ensayos adecuados para el cribado de bacterias *Synechocystis* sp. transformadas y la purificación de metabolitos secundarios, y se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Protein Science, Coligan y col., (Eds) John Wiley and Sons, Inc. 2007). La etapa de cribado y purificación puede comprender, por ejemplo, métodos de cromatografía, extracción de disolvente acelerada, o espectrometría de masas, o una combinación de los mismos. Los métodos de cromatografía pueden incluir, por ejemplo, cromatografía de fase inversa, cromatografía de fase normal, cromatografía de afinidad, cromatografía en capa fina, cromatografía en contracorriente, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase inversa. Los ejemplos de otros métodos incluyen precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización de calor seguido de centrifugación, isoelectroenfoque, electroforesis en gel, técnicas de precipitación selectiva, y combinaciones de estas y otras técnicas.

Los metabolitos secundarios producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento también pueden diseñarse genéticamente para contener diversas etiquetas de afinidad o proteínas portadoras que facilitan la purificación. Por ejemplo, el uso de etiquetas de histidina y proteínas diseñado en un vector de expresión que comprende un gen péptido sintetasa, un gen policétido sintasa y/o un gen ácido graso sintasa puede facilitar la purificación, por ejemplo, mediante cromatografía de quelato metálico (MCAC) en condiciones nativas y condiciones de desnaturalización. La purificación de metabolitos secundarios también puede "aumentarse" para fines de producción a gran escala.

A modo de ilustración únicamente, una muestra de bacterias *Synechocystis* sp. transformadas con uno o más genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa se puede cribar químicamente mediante análisis usando LC/MS acoplada a detección de matriz de fotodiodos UV. Se realiza la separación y los espectros UV se registran y la información de peso molecular se obtiene por MS con termonebulización, bombardeo con átomos rápidos de flujo continuo, ionización química a presión atmosférica o ionización por electronebulización. La información del fragmento se obtiene mediante experimentos por MS/MS en tándem o MSⁿ de múltiples fases, mientras que se usa LC/RMN para la confirmación de la identidad del compuesto. La purificación también puede realizarse por otros métodos conocidos en la técnica tales como extracción en fase sólida.

El experto apreciará que los métodos descritos en el presente documento no están limitados por los métodos de detección o purificación que se han descrito anteriormente y puede usarse que cualquier otro método para identificar y/o aislar los metabolitos secundarios derivados de las bacterias *Synechocystis* sp. transformadas.

De acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, el metabolito secundario puede ser cualquier compuesto obtenido a partir de la expresión del uno o más genes péptido sintetasa, policétido sintasa o ácido graso sintasa usados para la transformación del huésped bacteriano *Synechocystis* sp. Los genes pueden expresarse en solitario o en combinación. La expresión de uno o más de los genes péptido sintetasa, policétido sintasa o ácido graso sintasa puede combinarse para producir un producto híbrido. Los ejemplos no limitantes de los metabolitos secundarios que pueden producirse de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento se describen en el Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall, John Buckingham, Chapman & Hall/CRC, England CRC Press 1994).

En ciertas realizaciones, el metabolito secundario es un compuesto bioactivo. Por consiguiente, los métodos desvelados en el presente documento incluyen la producción de metabolitos secundarios, incluyendo péptidos, policétidos, ácidos grasos y e híbridos o derivados de los mismos, que son compuestos bioactivos. En general, un compuesto bioactivo es un compuesto que influye en la biológica estructura, función o actividad de una célula o tejido de un organismo vivo. Los inventores han identificado que en algunas especies de *Synechocystis* sp., por ejemplo PCC6803, la producción de metabolitos secundarios puede mejorarse adicionalmente a través del uso de PPT exógena/heteróloga. Preferiblemente, la PPT exógena está integrada de forma estable en el genoma bacteriano de *Synechocystis* sp. Por ejemplo, como se muestra en el presente documento, la PPT de *Nodularia*

spumigena es capaz de diseñarse para actuar en cada una de la síntesis de ácidos grasos, síntesis de glucolípidos de heterocistos y biosíntesis de metabolitos secundarios. Los inventores han demostrado que la PPT de *N. spumigena* fosfopanteteinila proteínas portadoras del agrupamiento del gen sintetasa microcistina en *M. aeruginosa* PCC7806 y el agrupamiento génico de biosíntesis de nostopeptolida en *N. punctiforme*. Otras PPT pueden ser adecuadas para la transformación en *Synechocystis* sp., huéspedes bacterianos, cuyos ejemplos se muestran, pero sin limitación, en las PPT proporcionadas en las figuras en el presente documento.

Los ejemplos de metabolitos secundarios que se pueden producir por los métodos desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, ácidos grasos, macrólidos, amidas y lipopéptidos o híbridos o derivados de los mismos.

Los ácidos grasos que se pueden producir incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos omega 3-poliinsaturados, tales como ácido eicosapentanoico (EPA).

Los lipopéptidos producidos por los métodos desvelados en el presente documento comprenden generalmente uno o más fragmentos derivados de aminoácidos unidos a una o más porciones derivadas de ácidos grasos. El lipopéptido puede ser cíclico o lineal. Un ejemplo de un lipopéptido que se puede producir es hapalosina, un compuesto que se sabe que invierte la resistencia a múltiples fármacos derivados de P-glicoproteína. Los lipopéptidos pueden ser citotóxicos, antitumorales, antivíricos, antibióticos, antimaláricos, antimicóticos, inversores de la resistencia a múltiples fármacos, antialimentadores, herbicidas, agentes inmunosupresores, mejoradores del metabolismo, con efectos de reducción del colesterol, con propiedades antioxidantes.

Otros ejemplos no limitantes de metabolitos que pueden obtenerse de acuerdo con los métodos desvelados en este documento incluyen el antibiótico eritromicina, el inmunosupresor FK506, y el compuesto antitumoral epotilona. Véase también la publicación de patente PCT n.º 93/13663 (eritromicina); Pat. de Estados Unidos n.º 6.303.342 B1 (epotilona); Pat. de Estados Unidos n.º 6.251.636 B1 (oleandolida); la publicación PCT WO 01/27284 A2 (megalomicina); Pat. de Estados Unidos n.º 5.098.837 (tilosina); Pat. de Estados Unidos n.º 5.272.474 (avermectina); Pat. de Estados Unidos n.º 5.744.350 (triol policétido); y la publicación de patente Europea n.º 791.656 (platenolida).

Otros ejemplos no limitantes de metabolitos que pueden producirse de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento incluyen cianovirina-N, boroficina, criptoficina, ácido docosahexaenoico, β-caroteno, ficobiliproteína, ficocianina, polisacáridos e inhibidores de proteasa (por ejemplo micropeptinas, aeruginosinas, microgininas, anabaenopeptinas y microverdinas).

Los metabolitos secundarios producidos de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento pueden poseer actividad sinérgica.

Las PPT desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellas que comprenden los polipéptidos expuestos en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una variante o fragmento de los mismos. El experto apreciará que pueden hacerse variaciones de secuencia, incluyendo tanto las variaciones naturales como variaciones diseñadas, a los polipéptidos que codifican PPT. Por consiguiente, se apreciará que las secuencias desveladas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo las secuencias de PPT proporcionadas en las SEQ ID NOS: 1 y 2, incluyen las variantes y/o fragmentos de las mismas.

El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia sustancialmente similar. Las variantes de secuencia polinucleotídicas y polipeptídicas pueden compartir al menos el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia. En general, las variantes de secuencia polipeptídica poseen actividad biológica cualitativa en común. Las variantes de secuencia polinucleotídica codifican generalmente polipéptidos que generalmente poseen actividad biológica cualitativa en común. También se incluyen dentro del significado del término "variante" homólogos de polinucleótidos y polipéptidos de la invención. Un homólogo de polinucleótido es típicamente de una especie bacteriana diferente pero que comparten sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polinucleótido correspondiente desvelado en el presente documento. Un homólogo de polipéptido se deriva típicamente de una especie diferente, pero que comparte sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido correspondiente desvelado en el presente documento. Por ejemplo, los homólogos de los polinucleótidos y polipéptidos desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellos de diferentes especies de cianobacterias.

Además, el término "variante" también incluye análogos de los polipéptidos desvelados en el presente documento. Un polipéptido "análogo" es un polipéptido que es un derivado de un polipéptido desvelado en el presente documento, cuyo derivado comprende la adición, supresión, sustitución de uno o más aminoácidos, de tal forma que el polipéptido conserva sustancialmente la misma función. La expresión "sustitución aminoacídica conservadora" se refiere a la sustitución o el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares dentro de una cadena polipeptídica (secuencia primaria de una proteína). Por ejemplo, la sustitución del aminoácido cargado ácido glutámico (Glu) por el aminoácido cargado de forma similar ácido aspártico (Asp) será una sustitución de aminoácidos conservadora.

10 En general, el grado de homología de secuencia entre las secuencias de la invención y una "variante" se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos, incluyendo, incluyendo, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software GCG Wisconsin Genetics, Versión 10 (disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, Estados Unidos). Los alineamientos usando estos programas puede realizarse usando los parámetros por defecto.

El programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 de Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias (Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981)). Al usar BESFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar el grado de homología entre las secuencias, los parámetros pueden ajustarse de tal forma que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia nucleotídica de referencia y de tal forma que se permiten los huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

25 GAP usa el algoritmo descrito en Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453, para encontrar el alineamiento de dos secuencias completas que maximiza el número de emparejamientos y minimiza el número de huecos. GAP considera todos los alineamientos posibles y posiciones de huecos y crea el alineamiento con el mayor número de bases emparejadas y los huecos menores. Permite la provisión de una penalización por creación de huecos y una penalización de extensión de hueco en unidades de bases emparejadas. GAP presenta un miembro de la familia de los mejores alineamientos.

Otro método para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de consulta y una secuencia sujeto, también denominada como un alineamiento de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y col. (Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencia, las secuencias de consulta y sujeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN puede compararse convirtiendo U en T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global es en porcentaje de identidad.

40 Además, dentro del alcance de la invención se encuentran los fragmentos de los polipéptidos desvelados en el presente documento. Un "fragmento" de polipéptido es una molécula que comprende un constituyente o es un componente de un polipéptido desvelado en el presente documento o una variante del mismo. Típicamente, un fragmento de polipéptido posee una actividad biológica cualitativa en común con el polipéptido del cual es un constituyente. El fragmento polipeptídico puede tener entre aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 750 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 270 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 250, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o entre aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. El fragmento puede derivarse de la PPT de longitud completa o, como alternativa, puede sintetizarse por algunos medios diferentes, por ejemplo síntesis química.

Los fragmentos de las secuencias polinucleotídicas expuestas en el presente documento también se incluyen dentro del alcance de la invención. Un "fragmento" de polinucleótido es una molécula de polinucleótido que codifica un constituyente o es un constituyente de un polinucleótido de la invención o variante del mismo. Los fragmentos de un polinucleótido no necesariamente han de codificar polipéptidos que conservan la actividad biológica. El fragmento puede ser, por ejemplo, útil como una sonda de hibridación o cebador de PCR. El término "cebador" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido monocatenario capaz de actuar como un punto de inicio de la

síntesis de ADN dirigida por plantilla. Un "oligonucleótido" es un ácido nucleico monocatenario que varía típicamente de longitud de 2 a aproximadamente 100 bases. La longitud exacta de un cebador variará de acuerdo con la aplicación particular, pero varía típicamente de 15 a 30 nucleótidos. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla pero debe ser suficientemente complementaria para hibridar en la plantilla. Los fragmentos de polinucleótidos se pueden derivar de un polinucleótido de la invención. Como alternativa, los fragmentos de polinucleótidos, cebadores y sondas de oligonucleótidos se pueden sintetizar por algunos medios diferentes, por ejemplo métodos de síntesis química (véase, por ejemplo, Narang S. A. y col. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90; Brown, E. L. y col. (1979) Meth. Enzymol. 68:109; y Patente de Estados Unidos n.º 4356270), Beaucage S.L y col. (1981) Tetrahedron Letters, 22: 1859-1862).

10

El destinatario experto entenderá que las secuencias desveladas en el presente documento y variantes y fragmentos de las mismas pueden usarse para cribar otros organismos o muestras de ácido nucleico para detectar la presencia de PPT útiles.

15 A pesar de la necesidad absoluta de PPT en una amplia gama de rutas biosintéticas importantes y fundamentales, estas enzimas han sido difíciles de lograr debido a su baja identidad de secuencia y la falta de proximidad a sus agrupamientos biosintéticos respectivos. Esto ha obstaculizado muchos esfuerzos para expresar productos de policétidos y péptidos no ribosomales en los sistemas de huéspedes heterólogos, en gran parte debido a la incapacidad de las PPT de *E. coli* intrínsecas para activar los sustratos extraños. Esta dificultad se complica aún más por la observación de que los agrupamientos de genes de cianobacterias biosintéticos no codifican predominantemente las PPT co-localizadas. Por ejemplo, los agrupamientos de genes de *Lyngbya majuscula* que codifican barbamida, lingbyatoxina y curacina A no codifican la PPT esencial requerida para su síntesis.

La PPT prototipo para la activación de agrupamientos de genes de metabolitos secundarios es de *Bacillus subtilis*, Sfp. Esta PPT se requiere para la activación de proteínas portadoras incorporadas dentro de la ruta biosintética responsable de la producción de surfactina. Los miembros de esta familia tienen aproximadamente 230 aminoácidos de longitud y se encuentran a menudo asociados a la ruta biosintética en la que actúan. Muestran una amplia gama de especificidades y la especificidad relajada de esta familia se ha aprovechado y manipulado en diversas aplicaciones, tales como visualización de fagémicos catalizada por Sfp y etiquetado por Sfp de proteínas portadoras.

30

El alineamiento de secuencia y los análisis filogenéticos revelan que la PPT de *Synechocystis* sp. PCC6803 está estrechamente relacionada con la amplia gama de PPT Sfp, y a pesar de la falta de producción compleja de metabolitos secundarios en *Synechocystis* sp PCC6803, se prevé que la PPT intrínseca es capaz de activar las proteínas portadoras de dichas rutas metabólicas. La actividad de la PPT de *Synechocystis* sp. expresada de forma heteróloga Slr0495 se ha demostrado actualmente a través de espectrometría de masas de nanopulverización para comprender una masa adicional de 355 Da correspondiente al brazo fosfopanteteinil de CoA al transferirse a una proteína portadora acilo. Los experimentos preliminares han demostrado que Slr0495 activa las proteínas portadoras de peptidilo de *Bacillus subtilis* de un péptido sintetaso no ribosomal, y las proteínas portadoras de acilo de *Nostoc punctiforme* PCC73102 de un policétido sintasa.

40

Los módulos en los péptidos sintetasos tienen varios cientos de aminoácidos de longitud con los genes correspondientes que comprenden los marcos de lectura abiertos más grandes conocidos. Cada módulo dentro de un péptido sintetaso contiene secuencias centrales responsables del reconocimiento, la modificación y el alargamiento de cadena de aminoácidos. Estas secuencias centrales dan como resultado una diversidad significativa de moléculas de origen péptido sintetaso. Las posibles modificaciones incluyen la activación, aciladenilación, tioesterificación, metilación y racemización de los precursores de aminoácidos individuales. Además, el péptido final puede ser lineal, ramificado, ciclado o puede estar integrado con una cadena lateral de policétidos. Hasta la fecha, se han caracterizado más de 300 aminoácidos modificados, incluyendo las formas L y D, que surgen de la formación peptídica de plantilla tio. Se ha demostrado que los genes implicados en la producción de estos complejos enzimáticos grandes también son modulares y contienen dominios responsables del reconocimiento y la modificación de sustrato. Estos operones que codifican péptidos sintetasos se pueden manipular para producir nuevos péptidos novedoso, como se ha demostrado para el diseño genético de policétidos.

Los genes péptido sintetaso se acoplan a promotores fuertes tales como el promotor PpsbA, en vectores especialmente adaptados para alta expresión. Los inventores han desarrollado y usado dichos vectores para la expresión heteróloga de genes pili. Las construcciones están diseñadas de tal forma que la expresión también puede regularse por un estímulo externo específico, tal como la intensidad de la luz. Usando el rasgo captación de ADN natural (transformabilidad) de *Synechocystis* sp. PCC6803, estas construcciones genéticas se introducen en el genoma a través de recombinación homóloga. A medida que la eficiencia de este proceso depende del tamaño de la

55

inserción de ADN, los experimentos de optimización se realizan para desarrollar un protocolo para permitir la integración de diversos agrupamientos de genes dimensionados que codifican diferentes compuestos, que pueden variar de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 40 kb. Los sitios de inserción se dirigen a los genes *pili*, que son responsables tanto de capacidad de transformación como de la motilidad en esta cianobacteria. La inserción de 5 construcciones genéticas en estos sitios logra la cepa no móvil y/o no transformable, que sirven como un "fenotipo indicador" intrínseco, además de la selección de antibióticos. Se usan análisis por PCR e hibridaciones northern con el fin de confirmar integrantes estables. Los experimentos aguas abajo optimizan la expresión de los genes recién integrados. Las estrategias alternativas incluyen la utilización de vectores de expresión basados en fásmid y la transferencia de genes basados en transposones.

10 Se ha demostrado que los transposones y otros elementos móviles movilizan grandes fragmentos de ADN de hasta 59 kb de tamaño. La movilización de transposones está mediada por transposasas, dando como resultado normalmente la inserción del ADN en secuencias diana en el genoma. Se ha descubierto que las transposasas putativas están asociadas a varios agrupamientos de genes biosintéticos, tales como los agrupamientos de genes 15 de biosíntesis de microcistina y nodularina. Utilizando la capacidad de los transposones para movilizar grandes agrupamientos de genes, un sistema de transferencia de ADN es adecuado para la transferencia de agrupamientos de genes biosintéticos diseñados en huéspedes nulos para la expresión de compuestos novedosos. La capacidad de las transposasas para movilizar los agrupamientos de genes se determina a través de ensayos de actividad, tales como conjugaciones de acoplamiento de salida. Las transposasas de cianobacterias que se descubrió que eran 20 activas pueden usarse para optimizar un sistema de transferencia de ADN para la introducción de ADN heterólogo en el huésped *Synechocystis*.

También se proporciona en el presente documento el uso de bacterias *Synechocystis* sp. para la producción de metabolitos secundarios, en el que las *Synechocystis* sp. se transforman con uno o más de un gen péptido sintetasa, 25 un gen policétido sintasa o un gen ácido graso sintasa requerido para la producción de metabolitos secundarios, y las bacterias *Synechocystis* sp. se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios.

Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden transformarse con múltiples genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o 30 ácido graso sintasa, que permiten la generación de un agrupamiento de genes biosintético en el huésped bacteriano de *Synechocystis* sp. transformado. El agrupamiento biosintético puede comprender un híbrido de uno o más genes péptido sintetasa, policétido sintasa y/o ácido graso sintasa. El gen policétido sintasa del agrupamiento o híbrido puede ser un gen no ribosomal policétido sintasa.

35 Las bacterias *Synechocystis* sp. pueden ser *Synechocystis* sp. PCC6803. Las bacterias *Synechocystis* sp. también pueden expresar una PPT exógena, que puede integrarse de forma estable en el genoma de *Synechocystis* sp. La PPT exógena puede ser una PPT cianobacteriana, y puede obtenerse a partir de *Nodularia spumigena*. En una realización, la PPT es de *Nodularia spumigena* NSOR10.

40 Se entenderá que la descripción relativa a los métodos de producción de metabolitos secundarios con bacterias *Synechocystis* sp. transformadas proporcionadas en el presente documento son igualmente aplicables al uso de bacterias *Synechocystis* sp. para la producción de metabolitos secundarios.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un metabolito 45 secundario producido de acuerdo con la invención, junto con un portador, excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En general, pueden prepararse composiciones adecuadas de acuerdo con métodos que se conocen por los expertos en la técnica y, por consiguiente, pueden incluir un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. 50

Estas composiciones pueden administrarse mediante rutas estándar. En general, las composiciones se pueden administrar por la vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), oral o tópica. Más preferiblemente, la administración es por vía parenteral

55 Los vehículos, diluyentes y adyuvantes deben ser "aceptables" en cuanto a ser compatibles con los demás ingredientes de la composición, y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de base vegetal, tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite

de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo, tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tal como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualeno; 5 derivados de celulosa tales como metil celulosa, etil celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcanoles inferiores, por ejemplo etanol o iso-propanol; aralcanoles inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos, tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrolidona; agar; goma de tragacanto o goma de acacia, y vaselina. Típicamente, 10 el portador o portadores formarán del 10 % al 99,9 % en peso de las composiciones.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para administración por inyección, en una forma de una formulación adecuada para la ingestión oral (tal como cápsulas, comprimidos, comprimidos alargados, elixires, por ejemplo), en forma de una pomada, crema o loción adecuada para administración tópica, en una forma 15 adecuada para la administración como una gota ocular, en forma de aerosol adecuado para la administración por inhalación, tal como por inhalación intranasal o por inhalación oral, en una forma adecuada para administración parenteral, es decir, subcutánea, intramuscular o inyección intravenosa.

Con el fin de que la invención pueda entenderse más claramente, se describirán las formas preferidas con referencia 20 a los siguientes ejemplos. Se entenderá que estos ejemplos están destinados a ser ilustrativos y no limitantes de la invención.

Ejemplos

25 Ejemplo 1. Análisis filogenéticos

(1) Creación de la base de datos tipo sfp.

Se recogieron secuencias por búsquedas ENTREZ basadas en palabras, usando cualquier combinación de palabras 30 en relación con fosfopanteteinil transferasas, por ejemplo, proteína portadora acil sintetasa, Sfp, panteteína. Los datos de salida de búsqueda de BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básico, *Basic Local Alignment Search Tool*) y PSI-proteína se utilizaron para extender el conjunto de secuencias, e identificar las secuencias que no se reconocieron a través de búsquedas basadas en palabras. Los genomas disponibles (completos y parciales) del National Centre for Biotechnology Information (NCBI), Joint Genome Institute (JGI) y la 35 Cyanobase (www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html) se sometieron a múltiples detecciones BLAST con una diversidad de secuencias de PPT conocidas de diferentes géneros bacterianos.

(2) Múltiples alineamientos y filogenéticas

40 Las secuencias se alinearon usando una acumulación de programas de GCG y la herramienta de alineamiento de múltiples secuencias de CLUSTAL X. El método de unión de vecinos (N-J) de Saitou y Nei se usó para generar árboles en CLUSTAL X. Los conjuntos de datos se muestrearon de forma repetitiva (1000 eventos de remuestreo), y los árboles resultantes se visualizaron usando un gráfico de NJ y Treeview X. Los alineamientos se crearon para la publicación a través de Boxshade.

45

(3) Extracción, amplificación y secuenciación

Las cepas cianobacterianas (**figura 2**) se obtuvieron a partir de la colección de cultivos cianobacterianos UNSW. El ADN genómico se extrajo a partir de cultivos de cianobacterias como se ha descrito previamente (Neilan y col., 50 *Applied and Environmental Microbiology* (1995) "Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus" 61: 3875-83). La amplificación de fragmentos de PPT de cianobacterias se realizó usando los cebadores PPTF [5'-CAGGAGTAYGGNAARCC-3'] (SEQ ID NO: 3) y PPTR [5'-TTCTCGATRTCDATNCC-3'] (SEQ ID NO: 4) que se diseñaron específicamente para corresponder a los motivos 3 y 4, respectivamente. La secuencias de PPT de heterocistos se amplificaron utilizando PPT2F [5'- 55 GCCCGTGGTAAACAATATTAG-3'] (SEQ ID NO: 5) y PPT2R [5'-GCCTCTTTACAAGTCCA-3'] (SEQ ID NO: 6). El ciclo térmico se realizó en un termociclador GeneAmp PCR 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) como se ha publicado previamente (Neilan y col., *Applied and Environmental Microbiology* (1995), Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. 61: 3875-83) con una temperatura de hibridación de 45-55 °C dependiendo del par de cebadores utilizados. La secuenciación automatizada se realizó

usando el sistema de secuenciación de ciclos PRISM Big Dye y un secuenciador modelo 373 (Applied Biosystems Inc., Estados Unidos). El análisis de secuencia se realizó usando el software Applied Biosystems Autoassembler.

(4) Conservación de secuencias en la familia tipo Sfp

5 Los alineamientos resultantes revelan ejemplos adicionales de secuencias divergentes de los aminoácidos considerados críticos para la función de PPT. Por ejemplo, se aprecia que H⁹⁰ del Motivo 2, asociado a la unión del 3'-fosfato de CoA, está ausente en varias secuencias, incluyendo todas las *Methanosarcina*, algunos *Staphylococcus* sp., y un *Streptomyces* sp. Se muestra un alineamiento de PPT tipo Sfp representativas en la **figura 3**. Se observaron dos subfamilias distintas. El Motivo 4 de la primera subfamilia se representa como F(S/C)KES (en lo sucesivo aquí denominado como "la subfamilia F/KES"). La segunda subfamilia incluyó la secuencia Sfp de *B. subtilis*. Este grupo muestra la secuencia peptídica W(T/C)KEA como el motivo 4 (en lo sucesivo aquí denominado como "la subfamilia W/KEA").

15 (5) Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos presentados muestran distintos clados novedosos y soportan a las subfamilias observadas en los análisis de alineamiento. Las subfamilias de PPT tipo Sfp se separaron y se soportaron por los datos muestreados de forma repetitiva (**figura 4**). La PPT AcpS se utilizó para servir como un valor atípico.

20 Los representantes que albergan múltiples PPT tipo Sfp demostraron tener PPT incluidos en ambas ramificaciones F/KES y W/KEA de la filogenia, incluyendo *Streptomyces*, *Escherichia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Salmonella* (**figura 4**). Las PPT tipo Sfp de organismos sin una PPT tipo AcpS también están presentes en ambos clados. Por ejemplo, se observaron *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* (AAC21831) en las subfamilias F/KES y W/KEA respectivamente. Las PPT encontradas en agrupamientos biosintéticos híbridos (PKS-NRPS) se representan también en ambas subfamilias.

La subfamilia F/KES incluía la mayor parte de PPT asociadas a las péptido sintetasas y la síntesis de sideróforos, incluyendo todas las enzimas enterobactina EntD y el subconjunto de PPT de *Streptomyces* que se describen en Weissman y col., (2004) Identification of a phosphopantetheinyl transferase for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*", *ChemBioChem* 5: 116-25.

La segunda subfamilia del subgrupo W/KEA incluía la PPT de *B. subtilis* Sfp. Este filotipo incluía las diversas PPT biosintéticas de glucolípidos de heterocistos, las PPT de biosíntesis de lisina y las secuencias de PPT de invertebrados y eucariotas. Las enzimas de PPT implicadas en la biosíntesis de policétido son predominantes en el grupo W/KEA, tal como MupN (AAM12928) asociado a la producción de mupirocina en *Pseudomonas fluorescens*.

Ejemplo 2. Alteración génica de PPT de *Synechocystis* (Sppt)

40 Sppt se inactivó por inserción para determinar si fue la única enzima capaz de la fosfopanteteinilación en *Synechocystis* sp. PCC6803. El ADN genómico para la amplificación por PCR se extrajo como se ha descrito previamente (Moffitt, M. C. y B. A. Neilan. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* 70: 6353 -62). Todas las enzimas de restricción se suministraron por New England Biolabs (Ipswich, MA) o Promega (Madison, WI).

45 Un fragmento de 2,5 kb que incluía *Sppt* (slr0495, número de acceso a Swissprot Q55185) se amplificó con los cebadores slrup (5'-GTAAACTCCATTAACGCTGGC-3') (SEQ ID NO: 7) y slrdn (5'-GGTGCAAATCCGTTACATGGA-3') (SEQ ID NO: 8). Este fragmento se clonó en pGEM-T-Easy (Promega) y se digirió con la enzima de restricción Aval. Un casete de resistencia a cloranfenicol (Chl^R) se ligó a este sitio y el plásmido resultante, pGCSlr, se transformó de forma natural en *Synechocystis* sp. PCC6803 para inactivar por inserción *Sppt* usando los métodos descritos en Eaton-Rye, J., 2004 The construction of gene knockouts in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Methods Mol Biol.*; 274: 309-24. La *Synechocystis* sp. PCC6803 de tipo silvestre (WT) también se transformó con un plásmido de desactivación con resistencia a cloranfenicol como un control positivo para la viabilidad de la cepa. En resumen, se centrifugaron aproximadamente 2 ml de células de *Synechocystis* sp. PCC6803 y se lavaron en medio BG-11. Después de la resuspensión en 300 µl de BG-11, se añadieron 3 µg ml⁻¹ de plásmido y las células se incubaron a 25 °C en 30 µmol m⁻² s⁻¹ de luz constante durante 6 horas. Las células se extendieron sobre filtros de nitrocelulosa estériles (0,45 µm, Millipore, Billerica MA) en placas BGTS no selectivas (BG-11, TES 10 mM, tiosulfato sódico al 0,3 %, agar al 1 %). Después de 36 horas, los filtros se transfirieron a placas BGTS selectivas con 10 µg ml⁻¹ de cloranfenicol.

Los transformantes iniciales eran visibles en las placas de cloranfenicol selectivas y se subcultivaron repetidamente bajo una creciente selección (**figura 5A**). Sin embargo, la selección por PCR de estos transformantes reveló que el gen *Sppt* inactivado por inserción no podía segregarse por completo a través de las múltiples copias del genoma (**figura 6**, fila 4). Por el contrario, *Sppt* se altera de forma eficaz en la cepa complementada con NsPPT (Δ NsPPT⁺), (**figura 6**, fila 8). La transformación de la cepa Δ NsPPT⁺ con ddH₂O mostró que esta cepa no era resistente a cloranfenicol antes de la alteración génica con pGCSlr (**figura 5D**).

La falta de segregación completa de *Sppt* por todos los múltiples cromosomas sugiere que *Sppt* es esencial para la fosfopanteteinilación en la síntesis de ácidos grasos. La complementación con la NsPPT de actividad de amplio rango de *Nodularia spumigena* NSOR10 permitió la alteración con éxito de *Sppt*. Esto confirma que se requiere *Sppt* para el metabolismo primario en *Synechocystis* sp. PCC6803. También muestra, por primera vez, la capacidad de NsPPT para activar proteínas portadoras no específicas *in vivo*.

15 Ejemplo 3. Expresión y purificación de *Sppt* y SACP

Sppt y SACP se expresaron y se purificaron para determinar la actividad de *Sppt* a través de ensayos de fosfopanteteinilación. *Sppt* se amplificó por el par de cebadores SynPpF (5'-TGTTTAACTCACCTG-3') (SEQ ID NO: 9) y SynPpR (5'-CCCAAGGTTACGAAAC-3') (SEQ ID NO: 10). El producto de PCR resultante se clonó en pGEM-T (Promega), se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *EcoRV* y se ligó en pET30 (Novagen, San Diego, CA). La síntesis de ácidos grasos *Synechocystis* sp. PCC6803 (FAS) ACP, designados SACP (AcpP BA000022), se amplificó por el par de cebadores ss12084Efw (5'-GGAATTCTGAATCAGGAAATTT-3') (SEQ ID NO: 11) y ss12084Hrv (5'-CTCGGCTCCAAAAAGCTTTGGG-3') (SEQ ID NO: 12), se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y se clonó en pET30. Un SACP truncado, SACP3, se clonó y se expresó para el análisis cinético por HPLC usando los cebadores 2084NdeF (5'-GCATATGAATCAGGAAATTT-3') (SEQ ID NO: 13) y 2083XhoR (5'-CCTCGAGTAATTTACTTTTCGATATGCTCAAC-3') (SEQ ID NO: 14).

Las construcciones se transformaron en BL21(DE3) Rosetta (Novagen) para su expresión. *Sppt* se expresó a 37 °C, con una concentración de inducción de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG), durante 3 horas. SACP y SACP3 se expresaron a 37 °C con IPTG 1 mM durante 20-40 min. Los cultivos se cosecharon a 5.000 x g y los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C. Los sedimentos celulares se suspendieron de nuevo en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4) y se pasaron tres veces a través de una célula de presión French enfriada a 200 psi (1,38 MPa) (Paton Scientific, Victor Harbor, Australia del Sur).

Después de la centrifugación a 20.000 x g durante 30 min, las proteínas se purificaron usando columnas de afinidad HiTrap (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) usando un gradiente de imidazol 300 mM como se ha descrito previamente en Copp J. N., Roberts A. A., Marahiel M. A., Neilan B. A., 2007, Characterization of PPTNs, a cyanobacterial phosphopantetheinyl transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. *J Bacteriol.*: 189(8): 3133-9. Las fracciones que contenían las proteínas purificadas se desalaron con columnas de centrifuga Amicon (Millipore) y se congelaron con glicerol al 8 % para su almacenamiento a -80 °C.

Las concentraciones de proteína se determinaron en base a los coeficientes de extinción calculados: SACP 6,970 cm⁻¹M⁻¹, *Sppt* 53,110 cm⁻¹M⁻¹. Debido a la ausencia de aminoácidos aromáticos en SACP3, la concentración de esta proteína se estableció usando formación de imágenes moleculares (FUJIFILM LAS-3000) en comparación con una curva estándar de concentración BSA conocida.

SACP se expresó y se purificó como una proteína de aproximadamente 17 kDa, determinada por SDS-PAGE. Sin embargo, el análisis de espectrometría de masas reveló que esta proteína era de 14,7 kDa, que correspondía a la masa teórica. La migración inusual de ACP, como se visualizó por SDS-PAGE, se ha descrito previamente en la expresión de una ACP de *Streptomyces* sp. PKS (Crosby y col. (9995) Polyketide synthase acyl carrier proteins from *Streptomyces*: expression in *Escherichia coli*, purification and partial characterisation, *Biochim Biophys Acta.* 16: 32-42). El análisis de espectrometría de masas de SACP3 purificada mostró especies presentes en la apo, holo y holoforma dimerizada (datos no mostrados). La aparición de PCSA fosfopanteteinilada es resultado de la conversión parcial de apo en holo-SACP por las PPT intrínsecas dentro del huésped de *E. coli*. La actividad de fosfopanteteinilación de *Sppt* se confirmó con la mayor conversión de apo en holo-SACP en un ensayo de 10 min (**figura 8B**).

Ejemplo 4. Fosfopanteteinilación en *Sppt in vitro* de SACP

La actividad de Sppt hacia SACP se determinó en un ensayo de fosfopanteteinilación de 10 min a 37 °C como se ha descrito previamente en Copp J. N., Roberts A. A., Marahiel M. A., Neilan B. A., 2007, Characterization of PPTNs, a cyanobacterial phosphopantetheinyl transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. *J Bacteriol.* 189(8): 3133-9. En resumen, las reacciones de 100-200 μ l comprendían Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 12,5 mM, CoA 0,5 mM, 5 DTT 2 μ M, proteína portadora 100 μ M y Sppt 300 nM. Las reacciones se incubaron durante 10 min a 37 °C, se terminaron por la adición de 1 ml de ácido tricloroacético y se precipitaron durante una noche a -20 °C antes de la centrifugación durante 15 min a 18.000 x g. Las muestras se disolvieron en agua:acetonitrilo:ácido fórmico (50:49:1). Se observó fosfopanteteinilación por un aumento en la masa de 340 Da según se visualizó por espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS). Los espectros se adquirieron usando un espectrómetro de 10 masas en tándem híbrido API Qstar Pulsar i (Applied Biosystems) como se ha descrito previamente en Copp J. N., Roberts A. A., Marahiel M. A., Neilan B. A., 2007, Characterization of PPTNs, a cyanobacterial phosphopantetheinyl transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. *J Bacteriol.*: 189(8): 3133-9.

Aunque el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) muestra la SACP 15 purificada a un peso molecular observado de 17 kDa (**figura 7**), la espectrometría de masas reveló que la proteína purificada era de 14,594 kDa (**figura 8A**), correspondiente a una pérdida del residuo metionina N-terminal cuando se compara con la masa teórica de 14,73 kDa. La relación de la holo proteína portadora con respecto a la apo proteína portadora después de la expresión heteróloga en *E. coli* se analizó por espectrometría de masas. SACP se sometió 20 parcialmente a fosfopanteteinilación después de la expresión heteróloga en *E. coli*, con una relación holo:apo de 70:30. Después de la incubación *in vitro* con Sppt, SACP mostró un aumento de la abundancia de la proteína portadora fosfopanteteinilada, lo que indica que Sppt puede activar la SACP específica (**figura 8B**).

Ejemplo 5. Análisis cinético de la actividad de Sppt

25 La inhibición CoA y el rango de actividad de pH para Sppt se determinó usando ensayos de fosfopanteteinilación *in vitro* con la SACP3 truncada. Los ensayos se realizaron como anteriormente en reacciones de 200 μ l que comprendían MES 75 mM (pH 5,5-6,5), Tris (pH 7-8,5) o CAPSO (pH 9-10) y CoA 1-3 mM. Después de la precipitación, los gránulos se suspendieron de nuevo en 30 μ l de Disolvente B al 55 % (acetonitrilo, ácido 30 trifluoroacético al 0,1 %). Una columna de 5 μ m Nucleosil C18 Alltech (250 x 4,6 mm) se equilibró con 55 % del Disolvente B a 45 °C antes de la inyección de la muestra. Las muestras se eluyeron con un gradiente lineal del 55 % al 68 % de Disolvente B durante 15 min con 0,9 ml min⁻¹ de caudal. La absorbancia a 200 nm se controló constantemente. La cantidad de holo-SACP3 formada se determinó mediante un análisis comparativo del área pico de holo-ACP de ensayos de control sin PPT. La holo-SACP3 presente después de la expresión heteróloga en *E. coli* se restó de la cantidad total fosfopanteteinilada.

35 Los ensayos de fosfopanteteinilación, y los análisis por HPLC posteriores, se realizaron para determinar el rango de actividad de pH y CoA de Sppt hacia su proteína portadora SACP3 específica. La actividad óptica para Sppt era de aproximadamente pH 7,7, con un rango de actividad de pH relativamente amplio donde aproximadamente el 25 % de la actividad se conservó a pH 5,5 y 9,8 (**figura 9**). La actividad de Sppt aumentó con las concentraciones de CoA 40 en aumento y alcanzó una actividad máxima con concentraciones mayores de 1500 μ M. El ajuste de Michaelis-Menten de los datos experimentales produjo un valor de K_m de 169,17 \pm 37,48 μ M para Sppt con respecto a CoA y un valor de k_{cat} de 28,41 \pm 2,12 min⁻¹. La eficiencia catalítica de Sppt para CoA era de 0,168 μ M⁻¹ min⁻¹.

Sppt reacciona de forma similar a las PPT tipo AcpS con activación de proteína portadora específica, un alto pH 45 óptimo y bajas eficiencias catalíticas con respecto a CoA. Aunque la mayor parte de las PPT caracterizadas muestran eficiencias catalíticas significativamente mayores, Sppt tiene valores similares a AcpS a partir de *E. coli* que ha indicado valores de K_m de 50 o 150 μ M y un valor de k_{cat} de aproximadamente 10 min⁻¹ (21,40). Las PPT tipo Sfp tales como la Sfp de *B. subtilis* y PcpS de *P. aeruginosa* tienen pH óptimos entre 6-7, mientras que la Sppt 50 óptima es más similar a las PPT de AcpS de *B. subtilis* y *E. coli* con pH óptimos entre 8-9. Esto requisito de alto pH puede permitir interacciones electrostáticas apropiadas entre Sppt y la SACP ácida; y puede explicar su poca activación de la MPCP neutra. La actividad de Sppt óptima a mayores pH también puede reflejar las condiciones ambientales (pH 7-9) que favorecen la formación de eflorescencias de cianobacterias sobre el crecimiento del fitoplancton. El rango de pH de Sppt es más amplio que otras PPT caracterizadas, que pueden reflejar el pH 55 dinámico de los entornos cianobacterianos durante la eutrofización y los ciclos de eflorescencia posteriores.

Ejemplo 6. Fosfopanteteinilación *in vitro* de Sppt de proteínas portadoras no específicas

Se ensayó la capacidad de Sppt para activar proteínas portadoras de una gama de rutas de metabolismo secundario, incluyendo aquellas de cianobacterias formadoras de heterocistos unicelulares y filamentosas. Las

proteínas portadoras ensayadas eran la proteína portadora arilo de *N. punctiforme* ATCC29133 PKS (ArCP) de HetM de la síntesis glucolipídica (NpArCP) y PKS ACP de la biosíntesis de nostopeptolida (NpACP); y la NRPS PCP de *M. aeruginosa* PCC7806 del módulo de carga (McyG) de la síntesis de microcistina (MPCP). La NRPS PCP de *Bacillus brevis* ATCC8185 implicada en la biosíntesis de tirocidina (TycPCP) también se usó para ensayar la capacidad de Spt de fosfopanteteinilar proteínas portadoras de reinos bacterianos alternativos.

La proteína portadora peptidilo, de *M. aeruginosa* PCC7806, MPCP; y la proteína portadora arilo de *N. punctiforme* ATCC29133, NpArCP, y la proteína portadora acilo, NpACP, se expresaron y se purificaron como se ha descrito previamente en Copp J. N., Roberts A. A., Marahiel M. A., Neilan B. A., 2007, Characterization of PPTNs, a cyanobacterial phosphopantetheinyl transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. *J Bacteriol.*: 189(8): 3133-9. La TycPCP de *Bacillus brevis* ATCC8185 se expresó y se purificó de acuerdo con los métodos de Reuter y col. (1999), Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily, *EMBO J.* 18: 6823-6831. Las concentraciones de proteínas se determinaron en base a los coeficientes de extinción calculados: NpArCP $8,250 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, NpACP $13,940 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, MPCP $6,970 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y TycPCP $9,530 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Los ensayos de fosfopanteteinilación se realizaron en reacciones de 30 min y se analizaron por espectrometría de masas ESI descrita en el Ejemplo 4 anterior.

No se detectó ninguna fosfopanteteinilación de NpACP, MPCP, NpArCP y TycPCP por las PPT de *E. coli* después de la expresión heteróloga.

Spt no fue capaz de fosfopanteteinilar la NpArCP de *N. punctiforme* ATCC29133 como se muestra por espectrometría de masas (**figura 10B**). El espectro de MPCP de *M. aeruginosa* PCC7806, después de la incubación con Spt, mostró un pico de masa pequeño correspondiente a la adición de un resto de fosfopanteteinilo de 340 Da (22.319 Da) (**figura 10D**). Este pico de baja intensidad estaba presente consistentemente en experimentos repetidos. La NpACP fosfopanteteinilada no se detectó de forma reproducible después de la incubación con Spt (**figura 11B**) y el pico de masa de 20.153 Da estuvo únicamente ligeramente por encima al del fondo de espectro. Por el contrario, aproximadamente el 54 % de la NRPS TycPCP de *P. aeruginosa* PAO1 se fosfopanteteiniló por Spt (**figura 11D, figura 12**).

La incapacidad de Spt para activar proteínas portadoras no específicas de otras especies se mostró con la NpArCP de la síntesis glucolipídica de *N. punctiforme* ATCC29133. Este resultado no fue sorprendente ya que la *Synechocystis* sp. PCC6803 es incapaz de formar heterocistos o de fijar nitrógeno. La capacidad de Spt para fosfopanteteinilar proteínas portadoras en rutas de NRPS y PKS también se analizó usando MPCP de la síntesis de microcistina en *M. aeruginosa* PCC7806 y NpACP de la síntesis de nostopeptolida en *N. punctiforme* ATCC29133.

Se detectó la fosfopanteteinilación de MPCP y NpACP, pero únicamente ligeramente por encima de la del fondo de espectro. La fosfopanteteinilación de NpACP no puede reproducirse de forma consistente en ensayos de replicación. La incapacidad de Spt para activar proteínas portadoras de rutas de metabolitos secundarios se correlaciona con la falta de productos naturales sintetizados por *Synechocystis* sp. PCC6803. Sin embargo, la presencia de una PPT tipo Sfp en una especie que únicamente codifica proteínas portadoras para FAS plantea cuestiones interesantes con respecto a la evolución de las PPT y la síntesis de metabolitos secundarios en la cianobacterias.

La capacidad de Spt para fosfopanteteinilar la proteína portadora de *Bacillus brevis* ATCC8185 TycPCP era incongruente con la falta de actividad hacia otras proteínas portadoras cianobacterianas. Esto puede explicarse por el tamaño de la TycPCP expresada que era menor de la mitad del tamaño de NpACP y MPCP. Por lo tanto, la capacidad para fosfopanteteinilar las proteínas portadoras MPCP y NpACP mayores puede deberse a las consideraciones electrostáticas y la poca accesibilidad de sitios activos en estas proteínas recombinantes más grandes.

Ejemplo 7. Agrupación génica de HetMNI

Las PPT cianobacterianas presentan un grupo de interés de las PPT debido a la presencia de múltiples metabolitos secundarios, incluyendo biosíntesis de policétido, péptido sintetasa y biosíntesis híbrida de policétido/péptido sintetasa, las PPT asociadas al desarrollo de células expertas para la fijación de nitrógeno (heterocistos), PPT tipo Sfp con la ausencia notable de una PPT tipo AcpS, y PPT tipo Sfp integradas en los agrupamientos de policétido. La mayor parte de los genomas cianobacterianos secuenciados contienen una PPT tipo Sfp singular. Sin embargo, tanto *Nostoc punctiforme* ATCC 2913 como *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 muestran tres PPT distintas dentro de sus secuencias genómicas respectivas.

La gama divergente de PPT en las cianobacterias requirió análisis de secuencia más rigurosos. Se realizó una criba

de cianobacterias para enzimas PPT utilizando los datos de secuencia disponibles de genomas publicados. Los alineamientos de motivos conservados (motivo 3 y 4) de PPT tipo Sfp se direccionaron para el diseño de cebadores PCR redundantes. Los genes de PPT de cianobacterias novedosos se aislaron de especies de cianobacterias formadoras de heterocistos tóxicas, no tóxicas, unicelulares y filamentosas. Un árbol filogénico construido a partir de las secuencias de PPT de cianobacterias publicadas y parciales (**figura 13**) reveló los nuevos filotipos designados A y B. Todas las PPT de cianobacterias se encuentran dentro de la subfamilia W/KEA de PPT tipo Sfp.

Las PPT de cianobacterias formadoras de heterocistos conocidas formaron un clado distinto soportado por datos de remuestreo y se designaron PPT tipo het (**A en la figura 13**). La especie *Nostoc punctiforme* PCC73102 formadora de heterocistos alberga tres PPT de la subfamilia W/KEA en su genoma. La PPT de *N. punctiforme* asociada a los loci génicos *HETMNI* de heterocistos se encuentra en el clado de tipo Het, mientras que las otras dos PPT se encuentran en clados alternativos.

Un segundo clado (**B en la figura 13**) incluye PPT de las especies *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Gloeobacter* y *N. punctiforme*. Varias de las secuencias dentro de este grupo se situaron adyacentes a un gen ATPasa. Como alternativa, las PPT de *G. violaceus* y *N. punctiforme* en este grupo se asociaron ambas a agrupamientos biosintéticos de policétidos.

Secuenciación del locus *HetMNI* de *N. spumigena*

El fragmento de PPT de *N. spumigena* identificado por análisis filogénico como una PPT tipo het potencialmente asociada a la síntesis de heterocistos se seleccionó posteriormente para la caracterización. Una región flanqueante de 3450 pb se secuenció para permitir el análisis de la región genómica circundante, revelando un agrupamiento génico de *HetMNI* relacionado con heterocistos (n.º de acceso al Genbank AY836561).

La clasificación funcional no se ha observado previamente en la filogenética de PPT. El análisis del rango divergente de PPT de cianobacterias PPT ha permitido la designación de las PPT asociadas a la formación de heterocistos. El uso de alineamientos génicos para cribar secuencias de PPT ha permitido la detección de PPT asociadas a heterocistos dentro de los genomas cianobacterianos y la caracterización de un locus de biosíntesis de heterocistos en *N. spumigena* NSOR10.

Ejemplo 8 Aislamiento de PPT de *N. Spumigena*

(1) Medio/Cultivo

Se cultivó *N. spumigena* NSOR10 a temperatura ambiente en un ciclo de luz/oscuridad de 24 horas en medio ASM (véase Provasoli, L., y col. 1957. The development of artificial media for marine algae. Arch Mikrobiol 25: 392-428). Se extrajo ADN como se ha descrito previamente en (Moffitt, M. C. y B. A. Neilan. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. Appl Environ Microbiol 70: 6353 -62).

(2) Amplificación de ADN, secuenciación y análisis

Las reacciones por PCR y su secuenciación se realizaron como se ha descrito previamente en Neilan, B. A. y col. 1994, 16S ribosomal RNA gene sequence and phylogeny of toxic *Microcystis* sp. (cyanobacteria). DNA Seq 4: 333-7. Se utilizó paseo génico basado en saliente "Panhandle" mediante cebadores basados en adaptador y específicos (Moffitt, M. C. y B. A. Neilan. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. Appl Environ Microbiol 70: 6353-62) a la temperatura de hibridación de 45-55 °C para amplificar las regiones genómicas desconocidas que flanquean el fragmento de PPT de (SEQ ID NO: 1). El resultado de BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básico, "Basic Local Alignment Search Tool"), la acumulación de GCG y la herramienta de alineamiento de múltiple secuencia de CLUSTAL X se utilizaron para el análisis y alineamiento de secuencias. Se realizó la secuenciación automatizada usando el sistema de secuenciación de ciclos PRISM Big Dye y un secuenciador modelo 373 (Applied Biosystems Inc., Estados Unidos). El análisis de secuencia se realizó usando el software Applied Biosystems Autoassembler.

(3) Métodos de hibridación de Southern

Se digirieron muestras de ADN genómico puro de *Nodularia spumigena* NSOR10 (~10 µg) durante una noche con *Xba* I o *Xmn* I según las recomendaciones de los fabricantes (Promega, Australia). Las digestiones y los controles

positivos (0,5-1,0 ng de plásmido linearizado pGEM-T-Easy (Promega) se separaron en geles de agarosa al 0,8 % a 60 mV durante aproximadamente 2,5 horas y se transfirieron al vacío a una membrana de nylon (Amersham). El kit de etiquetado de ADN DIG-High Prime (Roche, Australia) se utilizó para hibridaciones Southern. Las sondas de PPT se amplificaron con cebadores específicos como se indica a continuación. Se utilizó el par de cebadores sirup (5'-TGTTAAACTCACCTGTG-3') (SEQ ID NO: 15) y sirdn (5'-CCCAAGGTAACGAAACGA-3') (SEQ ID NO: 16) para amplificar *Slr0495* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. El par de cebadores Npunfw (GGATCCGCGATCGCCAGTCTGAGTTC) (SEQ ID NO: 17) y Npunrv (GAGCTCTTTGTGTAGTAGCGAATTATC) (SEQ ID NO: 18) se utilizó para amplificar una PPT de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. El par de cebadores NpptF (5'-CATGAAAGATATCACGGCGCTT-3') (SEQ ID NO: 19) y NpptR (5'-GAAGATAACAAGCTTGTATTGCC-3') (SEQ ID NO: 20) se usó para amplificar *nchS* de *Nodularia. spumigena*. Las sondas se marcaron por PCR con digoxigenina (DIG) según las instrucciones del fabricante (Roche) y se ensayaron para determinar la eficiencia de 100 f_g a 10ng. Las hibridaciones se realizaron durante una noche a 40 °C, se realizaron lavados de estringencia con SSC al 0,5 % con SDS al 0,1 % a 65 °C, y las señales se analizaron por detección quimioluminiscente con CPSD mediante un analizador de imágenes luminiscentes FUJIFILM LAS-3000.

15

(4) Creación de plásmidos de expresión

La proteína portadora sintasa de heterocistos de *N. sp.* (en lo sucesivo aquí *nhcS*) de *N. spumigena* NSOR10 (AY836561) se amplificó por el par de cebadores NpptF y NpptR (como se describe en "(3) Métodos de hibridación de Southern") anteriormente). El producto amplificado por PCR de 720 pb se clonó en pGEM-T (Promega) y después, este plásmido se digirió y el fragmento apropiado se ligó en pET30 (Novagen) para producir el plásmido de expresión pNhcS.

20

La HetM de *N. punctiforme* PCC73102 se amplificó a partir del locus *hetMNI* de heterocistos codificando la ArCP/cetorreductasa HetM (ZP_00107100). El par de cebadores HetMF (5'-GCCATGGCTATAAACAGTCTTTC-3') (SEQ ID NO: 21) y HetMR (5'-GGGATCCGAGATTCAAGAAACC-3') (SEQ ID NO: 22) se utilizaron para amplificar un fragmento de 1,7 Kb, que se clonó en el vector de determinación de fase pGEM. La restricción posterior y la clonación en el vector de expresión pET30 crearon pHetM. El vector de expresión pArCP se construyó de una manera similar utilizando los cebadores HetMF (como anteriormente) y ArCPR (5'-TAGCTCGAGAACCATTCTTGAC-3') (SEQ ID NO: 23), para amplificar y clonar el dominio ArCP de 260 bp de *hetM* y crear pArCP.

25

La proteína portadora peptidilo de *N. spumigena* NSOR10 (en lo sucesivo aquí PCP) y la proteína portadora acilo (en lo sucesivo aquí ACP) (denominada por la presente Npcp y Nacp) se amplificaron de la *ndaC* de NRPS-PKS híbrida (AAO64404) con el agrupamiento génico *ndaS* responsable de la producción de la hepatotoxina Nodularina (véase Moffitt, M. C. y B. A. Neilan. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. Appl Environ Microbiol 70: 6353 -62). Se utilizaron los pares de cebadores NpcpF (5'-CTCGAGCAGCCTCTACAACCTGCA-3') (SEQ ID NO: 24) y NpcpR (5'-GGATCCGCCAGGAGAACGGCGG-3') (SEQ ID NO: 25) y NacpF (GGAGCTCTTTTCCAAACATTCT) (SEQ ID NO: 26) y NacpR (5'-GGGATCCTCTAAGCATTCCATCAGTC-3') (SEQ ID NO: 27). Los fragmentos resultantes se manipularon como se ha descrito anteriormente para producir pNACP y pNPCP respectivamente.

35

La proteína portadora acilo de síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. (en lo sucesivo aquí FAS ACP), denominada por la presente Sacp (BA000022), se construyó a partir del par de cebadores 2084NdeF (5'-GCATATGAATCAGGAAATTT-3') (SEQ ID NO: 28) y 2084XhoR (5'-CCTCGAGTAATTTACTTTTCGATATGCTCAAC-3') (SEQ ID NO: 29) y se clonó como anteriormente para producir pSACP.

45

La PCP de *Microcystis aeruginosa* se amplificó a partir de la NRPS-PKS híbrida *mcyG* (AAX73195) del agrupamiento génico *mcyS* responsable de la producción de la hepatotoxina microcistina (véase Tittett, D., y col. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem. Biol 7: 753-64). Los cebadores de PCP MpcpF (5'-GGATCCTGAACAGGGA-3') (SEQ ID NO: 30) y MpcpR (5'-CTCGAGATGGCGACGGCTCC-3') (SEQ ID NO: 31) se usaron para construir los vectores de expresión como se ha descrito anteriormente para crear pMPCP.

50

La NRPS PCP de *Nostoc punctiforme* NSOR10, desde este momento denominada Nppcp, (ZP_00110897) se amplificó a partir de un agrupamiento génico no caracterizado. Se plantea la hipótesis de que este locus es responsable de la producción de nostopeptolida en *N. punctiforme* ATCC29133 debido a su similitud con el agrupamiento génico caracterizado en *Nostoc* sp. GSV224 (véase Hoffmann, D., y col. 2003. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. Gene 311:

55

171-80). NosA, un gen NRPS grande en este agrupamiento, comprende cuatro módulos de NRPS. La PCP NosA C-terminal se amplificó a partir del agrupamiento biosintético de nostopeptolida putativo utilizando los pares de cebadores NppcpBF (5'-GGATCCTAAAATCTAGGCTAG-3') (SEQ ID NO: 32) y NppcpSR (5'-GAGCTCAAATTGTTATTTCTT-3') (SEQ ID NO: 33) y se clonó como anteriormente para producir pNpPCP.

5

(5) Expresión de proteínas, purificación y análisis de la actividad enzimática

Los plásmidos de expresión se separaron, se transfectaron en *E. coli* como células huésped y el análisis de expresión se realizó como se indica a continuación. Saccp se expresó a 37 °C durante 2 horas en IPTG 1 mM (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido). NhcS, Arcp y Mpcp se expresaron a 30 °C durante 4 h con IPTG 0,2 mM. Se expresó Nppcp a 22-24 °C, IPTG 0,1 mM durante 6 horas. HetM se expresó a 18 °C, durante una noche con IPTG 0,1 mM, se visualizó como una proteína soluble de 63,3 kDa y se verificó a través de transferencia de western según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Sin embargo, el análisis de HetM a través de espectrometría de masas de atrapamiento iónico por nanonebulización no puede realizarse debido a rendimientos inadecuados. Por lo tanto, el plásmido que codifica el dominio ArCP de *hetM* se construyó y la Arcp de 15,6 kDa se expresó posteriormente con rendimientos adecuados. Los intentos por resolver la baja solubilidad de las proteínas portadoras Nacp y Npcp incluían variaciones en el tiempo de expresión (2-24 horas), la temperatura (18-37 °C) y la concentración de IPTG (0,1-1 mM). Después de la expresión, las células se sedimentaron a 4.000 rpm y se congelaron a -80 °C durante una noche. Después, los sedimentos se descongelaron sobre hielo, se suspendieron de nuevo en 5 ml de Hepes 50 mM (Sigma) pH 7,4 y se sometieron a 3 pases a través de una prensa French enfriada a 1000 psi o se sonicaron a 4 °C, amplitud de 30 %, durante 25 segundos con un pulso de 0,5 segundos. La fracción soluble se recogió después de la centrifugación a 20.000 g durante 30 min a 4 °C. Se utilizó una columna de quelación de Ni Amersham HighTrap para la purificación de las proteínas recombinantes. Las fracciones que contenían la proteína deseada (según se determinó por SDS-PAGE) se agruparon, se desalaron y se congelaron (con glicerol al 8 %) en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C. La concentración de las proteínas purificadas se calculó usando la absorbancia a OD₂₈₀ y los factores de absorbancia respectivos de las proteínas recombinantes (NhcS 37650, HetM 67430, ArCP 8250, Saccp 6970, Mpcp 6970 y Nppcp 13940).

Los ensayos de PPT se realizaron como se ha descrito previamente en Finking, R., y col., (2002) Characterization of a new type of fosfopanteteinil transferasa for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 277: 50293-302). En resumen, una reacción de 100-400 µl que comprende Tris-HCl 50 mM pH 7,4, MgCl 12,5 mM, CoA 0,5 mM, DTT 2 µM, 30 µg de las proteínas transportadoras respectivas (CP) y 300 nM de PPT se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Las reacciones se determinaron mediante la adición de 1 ml de TCA al 10 %. Los ensayos se precipitaron durante una noche a -20 °C antes de la centrifugación a 4 °C, durante 15 min a 16.000 g. Los sedimentos proteicos se analizaron por espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS). Los espectros se adquirieron usando un espectrómetro de masas híbrido API QStar Pulsar i (Applied Biosystems, Foster City CA). Las muestras (~200-400 fmol) se disolvieron en agua:acetronitrilo:ácido fórmico (50:49:1), se cargaron (1 µl) en aguas de nanonebulización (Proxeon, Dinamarca) y la aguja se situó a ~10 mm del orificio. Se usó nitrógeno como un gas de cortina y un potencial de 900 V aplicado a la aguja. Se adquirió una exploración Tof MS (m/z 550-2000, 1 segundo) y se acumuló durante ~1 minuto en un fichero individual. Los espectros se deconvolucionaron usando el método de reconstrucción Bayesiano contenido en el software Analyst QS.

(6) Activación de NpACP por la coexpresión con NPPT en *E. coli*.

45

La PPT de *Nodularia spumigena*, NPPT, se amplificó por PCR usando los cebadores NpptF (5'-TGCATATGACGGCGCTTAATCATT-3') (SEQ ID NO: 34) y NpptR (5'TCTCGAGTCAGTATTGCCAACAC-3') (SEQ ID NO: 35) y se clonó posteriormente en pGEM-T-Easy (Promega). Después, se subclonó NPPT en el vector de expresión pET30a (Novagen) por digestión con NcoI y XhoI (New England Biolabs) para producir pNPPT2. NPPT, completo con el promotor T7 y el terminador transcripcional originalmente de pET30a, se liberó de pNPPT2 con DraIII y SphI (New England Biolabs) y se terminó en romo con la enzima de Klenow (Promega). El fragmento se clonó posteriormente en pRARE linearizado con Aval, con extremo romo y fosforilado (Novagen) para producir pNPPT3.

55 Las construcciones pNPPT3 y pNpACP se transformaron secuencialmente en BL21(DE3) (Novagen) para la coexpresión de las proteínas NPPT y NpACP. En los experimentos de control, NpACP se expresó únicamente con pRARE. Las proteínas NpACP que se coexpresaron con pNPPT3 o pRARE se purificaron en una columna de níquel Hi-Trap y se precipitaron con ácido tricloroacético al 10 %. Las masas moleculares se determinaron con análisis por MS con Nanonebulización.

Ejemplo 9. Actividad de *nhcS*(1) Secuenciación y análisis del locus *HetMNI*

5 Las regiones flanqueantes del fragmento génico de PPT parcial se amplificaron para permitir la secuenciación de 3450 pb del locus *hetMNI* de *N. spumigena* NSOR10 (AY836561). El análisis de secuencia reveló la PPT *nhcS* de 240 aa, una proteína 27.555 Da con un punto isoeléctrico (pI) de 6,1. *NhcS* mostró una similitud del 81 % a *HetI* de *Nostoc* sp. PCC 7120, una similitud del 58 % a *Synechocystis* sp. PCC 6803 Slr0495 y una similitud del 55 % a *Sfp* de *B. subtilis* (**figura 14**). Esta PPT se codifica en orientación inversa con respecto a los genes *hetM* y *hetN*, como se observa en el locus *hetMNI* de las cianobacterias formadoras de heterocistos *Nostoc* sp. PCC 7120, *A. variabilis* ATCC 29413, y *N. punctiforme* ATCC 29133 (**figura 14**).

15 Los productos de proteína predichos de los genes aguas debajo de *nhcS* en los loci *hetMNI* también se analizaron y se compararon con las proteínas análogas. El fragmento parcial del gen PKS iterativo de *N. spumigena* *hetM* se secuenció y mostró una similitud del 90 % con el fragmento correspondiente de *hetM* de *N. punctiforme* (también denominado *hgIB*). El *HetN* de *N. spumigena* es una proteína de 126 residuos que mostró una similitud del 83 % con respecto a la mitad C-terminal de *HetN* de *A. variabilis* (una proteína de 263 residuos). Este dominio codifica una proteína reductasa única que tiene una función en la supresión de heterocistos a través de la inhibición de *HetR* (Li y col., 2002 "Expression of *hetN* during heterocyst differentiation and its inhibition of *hetR* up-regulation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120" FEBS Letters 517: 87-91). No se detectó ningún ORF en al región secuenciada que se extienda 900 pb aguas arriba de *nhcS*.

(2) Hibridación de Southern

25 Se utilizaron sondas de Southern para determinar el número de PPT codificadas dentro del genoma NSOR10 de *N. spumigena*. Las sondas se construyeron a partir de una diversa gama de PPT de cianobacterias, incluyendo *nhcS*, *slr0495* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (BAA10326) y una PPT de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (ZP_00110892). Estas PPT se colocan en distintos clados filogenéticos cianobacterianos. La eficiencia y especificidad de las sondas se detectó a 10 pg según se verificó a través de controles (no mostrados). Las hibridaciones realizadas con la sonda *nhcS* revelaron una banda singular de *N. spumigena* NSOR10 (**figura 16**) y no se detectó hibridación alguna con las sondas *slr0495* o *nppt*. En conjunto, estos experimentos sugieren que *nhcS* es la única PPT codificada por *N. spumigena* NSOR10.

35 (3) Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Con el fin de confirmar la actividad de panteteinil transferasa de *nhcS*, esta enzima se expresó como una proteína soluble etiquetada con His de 27,6 kDa. La *ArCP* del locus *hetMNI* en *N. punctiforme* ATCC29133 se escogió debido a la similitud de los genes *hetMNI* con *N. spumigena* NSOR10. No se observó panteteinilación de *ArCP* después de la expresión heteróloga en *E. coli*. *Sacp* se expresó como una proteína de 14,8 kDa. Después de la expresión de la *ACP* en *E. coli*, el 40 % de la proteína estaba en la forma holo. La producción de *Nacp* y *Npcp* soluble a partir de *N. spumigena* NSOR10, a pesar de las múltiples variaciones en los parámetros de expresión, no produjo una proteína soluble para el análisis como se dedujo por transferencia western (no mostrada). Se expresaron *Mpcp* y *Nppcp* como proteínas de 22,0 kDa y 20,8 kDa respectivamente; no se observó panteteinilación después de la expresión en *E. coli*.

(4) Análisis de la actividad de *nhcS*

50 La actividad se detectó por espectrometría de masas de ionización a través de la adición de masas de 350 da, en relación con la incorporación del brazo panteteinilo de CoA transferido por la PPT a la CP (**figura 17**).

La actividad de *NhcS* se confirmó inicialmente utilizando la *ArCP* *HetM* específica del agrupamiento génico *hetMNI* asociado (en *N. punctiforme* ATCC29133). La conversión de la apo-*ArCP* (15,75 kDa) en la holo-*ArCP* (16,05 kDa) se observa en la **figura 17B**), y muestra la función de esta enzima en la síntesis de glucolípidos de heterocistos.

55 El análisis enzimático de la actividad de *NhcS* hacia las PCP de metabolitos secundarios de NRPS se ensayó con *Nppcp* y *Mpcp*. Los análisis de espectrometría de masas muestran la adición de 350 Da del resto panteteinilo de CoA a cada una de las CP respectivas ensayadas. La expresión con éxito de la PCP de la Nostopeptolida (*nosA*) y los agrupamientos génicos biosintéticos de Microcistina (*mcyG*) permitieron la detección y el análisis de la

fosfopanteteinilación de *nhcS* en el metabolismo secundario. La panteteinilación completa de Mpcp se consiguió en un ensayo de 30 min. Nppcp se panteteiniló, mostrando que *nhcS* puede activar proteínas portadoras de rutas biosintéticas que no están presentes en *N spumigena* NSOR10.

- 5 Las reacciones de control se realizaron sin *nhcS*. No hubo panteteinilación detectable de las PCP después de la expresión heteróloga en *E. coli*.

Por lo tanto, *NhcS* puede actuar en cada una de FAS, síntesis de glucolípidos de heterocistos y biosíntesis de metabolitos secundarios, tal como el péptido híbrido policétido/no ribosomal nodularina. La capacidad de *nhcS* para
10 activar CP de metabolitos secundarios no específicas tiene gran potencial para la aplicación en campos biotecnológicos. La panteteinilación de proteínas portadoras no específicas de huéspedes alternativos demuestra la aplicación de esta PPT para la síntesis activa de agrupamientos biosintéticos de una diversa gama de especies.

Ejemplo 10. Complementación de *Synechocystis* sp. PCC6803 con NsPPT

15 La PPT de *Nodularia spumigena* NSOR10, *NsPPT* (número de acceso al Genbank AY646183), se expresó bajo el control de un promotor inducible por nitrato, PnirA, de *Synechococcus* sp. cepa PCC7942, para complementar la actividad de *Sppt* *in vivo* (34). PnirA se amplificó con los cebadores nirAF (5'-TTCTAGATCCCTCTCAGATCAAAAAG-3') (SEQ ID NO: 36) y nirAR (5'-TGCATATGGGATTCATCTGCCTAC-3')
20 (SEQ ID NO: 37) y el fragmento se clonó en pET30a con *Xba*I y *Nde*I para producir pPnirA (Novagen). *NsPPT*, se amplificó con los cebadores NpptF (5'-TGCATATGACGGCGCTTAATCATT-3') (SEQ ID NO: 34) y NpptR (5'-TCTCGAGTCAGTATTGCCAACAC-3') (SEQ ID NO: 35) y posteriormente se clonó en pPnirA con *Nde*I y *Xho*I. *NsPPT*, completo con el promotor PnirA y el terminador de la transcripción T7, se liberó de esta construcción con *Dra*III y *Sph*I y se terminó en romo con la enzima de Klenow (Promega) para la ligadura en pKW1188 linearizado con
25 *Pst*I, que alberga las regiones flanqueantes génicas del fotosistema II de *slr0168* y un casete de resistencia a kanamicina. El plásmido resultante se transformó de forma natural en *Synechocystis* sp. PCC6803 para la recombinación homóloga en *slr0168*.

Los transformantes se seleccionaron en placas BGTS complementadas con 10 µg ml⁻¹ de kanamicina. La cepa
30 complementada con NsPPT se designó *Synechocystis* sp. PCC6803 Δ*NDPPT*⁺(Δ*NDPPT*⁺). El plásmido de desactivación de *Sppt*, pGCSlr, se transformó de forma natural en esta cepa para la alteración del gen *Sppt*. ddH₂O también se transformó en Δ*NDPPT*⁺ como un control negativo. Las colonias complementadas con NsPPT se cribaron por PCR para determinar la segregación completa de la alteración del gen *Sppt* usando los cebadores slrup y slrdown. La complementación y los experimentos de desactivación se realizaron tres veces por duplicado.

35 Cualquier descripción de los documentos de la técnica anterior en el presente documento, o las declaraciones en el presente documento derivadas o basadas en estos documentos, no es una admisión de que los documentos o declaraciones derivadas sean parte del conocimiento general común de la técnica relevante en Australia o en otro lugar.

40 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> NewSouth Innovations Pty Limited
- 45 <120> Métodos para producir metabolitos secundarios
- <130> 803756C
- <160> 37
- 50 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 239
- 55 <212> PRT
- <213> *Nodularia spumigena* NSOR10
- <400> 1

ES 2 615 629 T3

Met Thr Ala Leu Asn His Leu Trp Leu Pro Val Pro Thr Asn Leu Thr
1 5 10 15
Leu Leu Pro Asn Asp Val His Ile Trp Arg Ile His Leu Asp Val Pro
 20 25 30
Glu Ala Gln Gln Gln Asn Leu Leu Ala Thr Leu Ser Gly Asp Glu Leu
 35 40 45
Thr Arg Ala Asn Arg Phe His Phe Gln Glu His Arg Gln Arg Phe Ile
 50 55 60
Ala Gly Arg Gly Ile Leu Arg Ser Ile Leu Gly Ser Tyr Leu Gly Ile
65 70 75 80
Glu Pro Gln Arg Val Leu Phe Asp Tyr Gln Glu Arg Gly Lys Pro Ile
 85 90 95
Leu Ala Asp Ser Leu Ala Lys Ser Gly Leu Trp Phe Asn Leu Ser His
 100 105 110
Ser Gln Gly Leu Ala Leu Cys Ala Val Asn Tyr His Asn Arg Ile Gly
 115 120 125
Ile Asp Leu Glu Tyr Ile Arg Arg Met Ser Asp Val Glu Ala Leu Ala
130 135 140
Lys Arg Phe Phe Leu Pro Arg Glu Tyr Asp Val Val Arg Ser Leu Ser
145 150 155 160
Asp His Gln Gln Gln Glu Ile Phe Phe Arg Tyr Trp Thr Cys Lys Glu
 165 170 175
Ala Tyr Leu Lys Ala Thr Gly Glu Gly Leu Ala Gln Leu Glu Gln Val
 180 185 190
Glu Val Leu Leu Asn Pro Thr Glu Pro Ala Gln Leu Gln Thr Ser Glu
 195 200 205
Ser Trp Ser Leu Phe Glu Leu Arg Ala Ala Glu Asp Tyr Phe Ala Ala
210 215 220
Val Val Val Glu Gly Ser Gly Cys Asn Leu Gln Cys Trp Gln Tyr
225 230 235

<210> 2
<211> 277
<212> PRT
<213> Synechocystis sp. PCC6803
<400> 2

5

ES 2 615 629 T3

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

ES 2 615 629 T3

```

          130              135              140
Gln Glu Val Gln Gln Leu Glu Ser Leu Glu Gly Glu Lys Arg Thr Lys
145              150              155              160

Leu Phe Tyr Gln Leu Trp Thr Ala Lys Glu Ala Phe Leu Lys Ala Thr
          165              170              175
Gly Lys Gly Ile Ser Gly Gly Leu Asn Gln Val Ile Pro Asp Glu Asn
          180              185              190
Leu Ala Lys Tyr Gln Tyr Leu Pro Asp Ser Gly Asp Thr Asn His Trp
          195              200              205
Arg Leu Ser Ser Gln Pro Leu Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Asp Asn
          210              215              220
Tyr Trp Met Ala Ile Ala Trp Cys Thr Asn Glu Val Asn Gln Val Glu
225              230              235              240
Ser Asn Tyr Leu Pro Asn Ile Gln Pro Phe Gln Trp Pro Arg Asn Leu
          245              250              255
His Ser Leu Pro Ser Phe Arg Tyr Leu Gly Lys Gly Glu Phe Gln His
          260              265              270
Thr Gly Gly Arg Tyr
          275

```

```

5 <210> 3
  <211> 17
  <212> ADN
  <213> Artificial

10 <223> Basado en la secuencia de PPT de cianobacterias
   <221> misc_feature
   <222> (12)..(12)

   <223> n es a, c, g, o t

15 <400> 3
   caggagtayg gnaarcc          17

20 <210> 4
   <211> 17
   <212> ADN
   <213> Artificial

25 <223> Basado en la secuencia de PPT de cianobacterias
   <221> misc_feature
   <222> (15)..(15)

   <223> n es a, c, g, o t

   <400> 4

```

ES 2 615 629 T3

ttctcgatrr cdatncc 17

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

5

<223> Basado en la secuencia de PPT de heterocistos

<400> 5
gcccgaggta aacaaatatt ag 22

10

<210> 6
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

15

<223> Basado en la secuencia de PPT de heterocistos

<400> 6
gcctctttac aagtcca 17

20

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

25

<223> Basado en la secuencia de Synechocystis sp. PCC6803

<400> 7
gtaaactcca ttaacgctgg c 21

30

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

35

<223> Basado en la secuencia de Synechocystis sp. PCC6803

<400> 8
ggtgcaaatc cgttacatgg a 21

40

<210> 9
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

45

<223> Basado en la secuencia de Synechocystis sp. PCC6803

<400> 9
tgtttaaact cacctg 16

50

<210> 10
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

55

<223> Basado en la secuencia de Synechocystis sp. PCC6803

ES 2 615 629 T3

<400> 10
 cccaagggtta cgaaac 16

5
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <223> Basado en la secuencia de síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. PCC6803 (SACP) (AcpP BA000022)

<400> 11
 ggaattctga atcaggaaat tt 22

15
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

20
 <223> Basado en la secuencia de síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. PCC6803 (SACP), (AcpP BA000022)

<400> 12
 ctcggtcca aaaagcttg gg 22

25
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30
 <223> Basado en la síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. PCC6803 (SACP) (AcpP BA000022)

<400> 13
 gcatatgaat caggaaatt 20

35
 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

40
 <223> Basado en la síntesis de ácidos grasos de *Synechocystis* sp. PCC6803 (SACP) (AcpP BA000022)

<400> 14
 cctcgagtaa ttactttcg atatgctcaa c 31

45
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

50
 <223> Basado en la secuencia de *Synechocystis* sp. PCC 6803 Slr0495

<400> 15
 tgtttaaact cacctgtg 18

55
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 615 629 T3

<223> Basado en la secuencia de *Synechocystis* sp. PCC 6803 Slr0495

5 <400> 16
ccaaggtaa cgaaacga 18

<210> 17
<211> 26
10 <212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de PPT de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

15 <400> 17
ggatccgca tcgccagtct gagttc 26

<210> 18
<211> 27
20 <212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia inversa de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

25 <400> 18
gagctcttg tgtagtagcg aattatc 27

<210> 19
<211> 22
30 <212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de *Nodularia. Spumigena* nchS

35 <400> 19
catgaaagat atcacggcgc tt 22

<210> 20
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de *Nodularia. Spumigena* nchS

45 <400> 20
gaagataaca agcttgatt gcc 23

<210> 21
<211> 24
50 <212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en el locus hetMNI de heterocistos que codifica la ArCP/cetorreductasa HetM (ZP_00107100)

55 <400> 21
gcatggcta taaaacagtc ttc 24

<210> 22
<211> 22

ES 2 615 629 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <223> Basado en el locus hetMNI de heterocistos que codifica la ArCP/cetorreductasa HetM (ZP_00107100)

<400> 22
gggatccgag attcaagaaa cc 22

10 <210> 23
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

15 <223> Basado en el locus hetMNI de heterocistos que codifica la ArCP/cetorreductasa HetM (ZP_00107100)

<400> 23
tagctcgaga accatcttgc ac 22

20 <210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

25 <223> Basado en la secuencia híbrida de NRPS-PKS ndaC (AA064404) dentro del gen ndaS

<400> 24
ctcgagcagc ctctacaact gca 23

30 <210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

35 <223> Basado en la NRPS-PKS ndaC híbrida (AA064404) dentro del agrupamiento génico ndaS

<400> 25
ggatccgcca ggagaacggc gg 22

40 <210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

45 <223> Basado en la secuencia híbrida NRPS-PKS ndaC (AA064404) dentro del agrupamiento génico ndaS

<400> 26
ggagctctt tccaacatt ct 22

50 <210> 27
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

55 <223> Basado en la secuencia híbrida NRPS-PKS ndaC (AA064404) dentro del agrupamiento génico ndaS

<400> 27
gggatctct aagcattcca tcagtc 26

ES 2 615 629 T3

5 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia portadora acilo de síntesis de ácidos grasos de Synechocystis sp.

10 <400> 28
gcatatgaat caggaaatt 20

15 <210> 29
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia portadora acilo de síntesis de ácidos grasos de Synechocystis sp.

20 <400> 29
cctcgagtaa ttactttcg atagctcaa c 31

25 <210> 30
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de PCP de Microcystis aeruginosa

30 <400> 30
ggatcctgaa caggga 16

35 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de PCP de Microcystis aeruginosa

40 <400> 31
ctcgagatgg cgacggctcc 20

45 <210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de NRPS PCP de Nostoc punctiforme NSOR10

50 <400> 32
ggatcctaaa atctaggcta g 21

55 <210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de NRPS PCP de Nostoc punctiforme NSOR10

<400> 33

ES 2 615 629 T3

gagctcaaat tgttattct t 21

5 <210> 34
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de NPPT de Nodularia spumigena

10 <400> 34
tgcatatgac ggcgcttaac catt 24

15 <210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia de NPPT de Nodularia spumigena

20 <400> 35
tctcgagtca gtattgccaac cac 23

25 <210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en el promotor inducible por nitrato PnirA de Synechococcus sp. cepa PCC7942

30 <400> 36
ttctagatcc ctctcagatc aaaaag 26

35 <210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<223> Basado en la secuencia PnirA del promotor inducible por nitrato de Synechococcus sp. cepa PCC7942

40 <400> 37
tgcatatggg atcatctgc ctac 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de metabolitos secundarios, comprendiendo el método:
- 5 (a) transformar las bacterias *Synechocystis* sp. con uno o más de un gen policétido sintasa, un gen péptido sintetasa, o un gen ácido graso sintasa requeridos para la producción de metabolitos secundarios;
(b) cultivar las bacterias *Synechocystis* sp. en condiciones adecuadas para la expresión del uno o más genes requeridos para la producción de los metabolitos secundarios; y
(c) purificar los metabolitos secundarios de las bacterias,
- 10 en el que dichas bacterias *Synechocystis* sp. expresan una fosfopanteteinil transferasa exógena (PPT) de *Nodularia spumigena*.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente antes de la etapa (c), la etapa
15 de cribar las bacterias *Synechocystis* sp. para determinar la producción de metabolitos secundarios.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el metabolito secundario es un policétido, un ácido graso o un híbrido o derivado de los mismos.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos seleccionados entre el grupo que consiste en un agente antimicrobiano, un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente anticanceroso, un agente inmunosupresor, un anestésico, un analgésico, un producto antitumoral, un antibiótico, un anticolesterolémico, un agente antiparasitario, un agente terapéutico veterinario, un producto agroquímico, y un cosmético.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho gen está ligado operativamente a un promotor inducible activo en *Synechocystis* sp.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el promotor es inducible variando la intensidad de la
30 luz a la que las bacterias se exponen durante el cultivo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las bacterias se transforman con múltiples genes péptido sintetasa, policétido sintasa, o ácido graso sintasa formando un agrupamiento de genes biosintéticos.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la PPT exógena está integrada de forma estable en el genoma de *Synechocystis* sp.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la PPT comprende la secuencia aminoacídica como
40 se expone en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la *Synechocystis* sp. es *Synechocystis* sp. PCC6803.

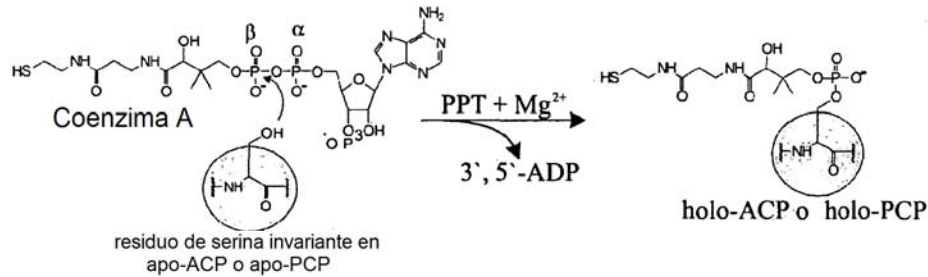


Figura 1

Especies cianobacterianas	Fuente de secuencia de PPT	Cebadores utilizados	Número de acceso
<i>Anabaena cylindrica</i> . NEIS 19	Este estudio	PPTF/R	AY646191
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC29413	Genoma	N/a	ZP_00161864
<i>Crocosphaera watsonii</i> WH8501	Genoma	N/a	ZP_00176116
<i>Cylindrospermum</i> CENA 33	Este estudio	PPTF/R	AY646192
<i>Gleobacter violaceus</i> PCC7421	Genoma	N/a	BAC89892
<i>Gleobacter violaceus</i> PCC7421	Genoma	N/a	BAC92166
<i>Gleobacter violaceus</i> PCC7421	Genoma	N/a	BAC90792
<i>Nodularia harveyana</i> UTEX-B2093	Este estudio	PPT2F/2R	AY646190
<i>Nodularia spumigena</i> BY1	Este estudio	PPT2F/2R	AY646186
<i>Nodularia spumigena</i> L575	Este estudio	PPT2F/2R	AY646189
<i>Nodularia spumigena</i> NSBR01	Este estudio	PPT2F/2R	AY646184
<i>Nodularia spumigena</i> NSLA01	Este estudio	PPT2F/2R	AY646187
<i>Nodularia spumigena</i> NSLA02A4	Este estudio	PPT2F/2R	AY646188
<i>Nodularia spumigena</i> NSOR10	Este estudio	PPT2F/2R	AY677619
<i>Nostoc piscale</i> CENA 21	Este estudio	PPTF/R	AY646193
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133	Genoma	N/a	ZP_00107102
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133	Genoma	N/a	ZP_00110098
<i>Nostoc punctiforme</i> ATCC29133	Genoma	N/a	ZP_00110892
<i>Nostoc sp.</i> PCC7120	Genoma	N/a	P37695
<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1375	Genoma	N/a	AAP99138
<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1986	Genoma	N/a	CAE18537
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	Genoma	N/a	CAE21796
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	Genoma	N/a	ZP_00164844
<i>Synechococcus</i> PCC7002	Genoma	N/a	NC_003488
<i>Synechococcus</i> WH8102	Genoma	N/a	CAE08676
<i>Synechocystis</i> PCC6803	Genoma	N/a	BAA10326
<i>Synechocystis</i> PCC7008	Este estudio	PPTF/R	AY646194
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP1	Genoma	N/a	BAC09281
<i>Trichodesmium erytheaum</i> IMS101	Genoma	N/a	NP_0032797

Figura 2

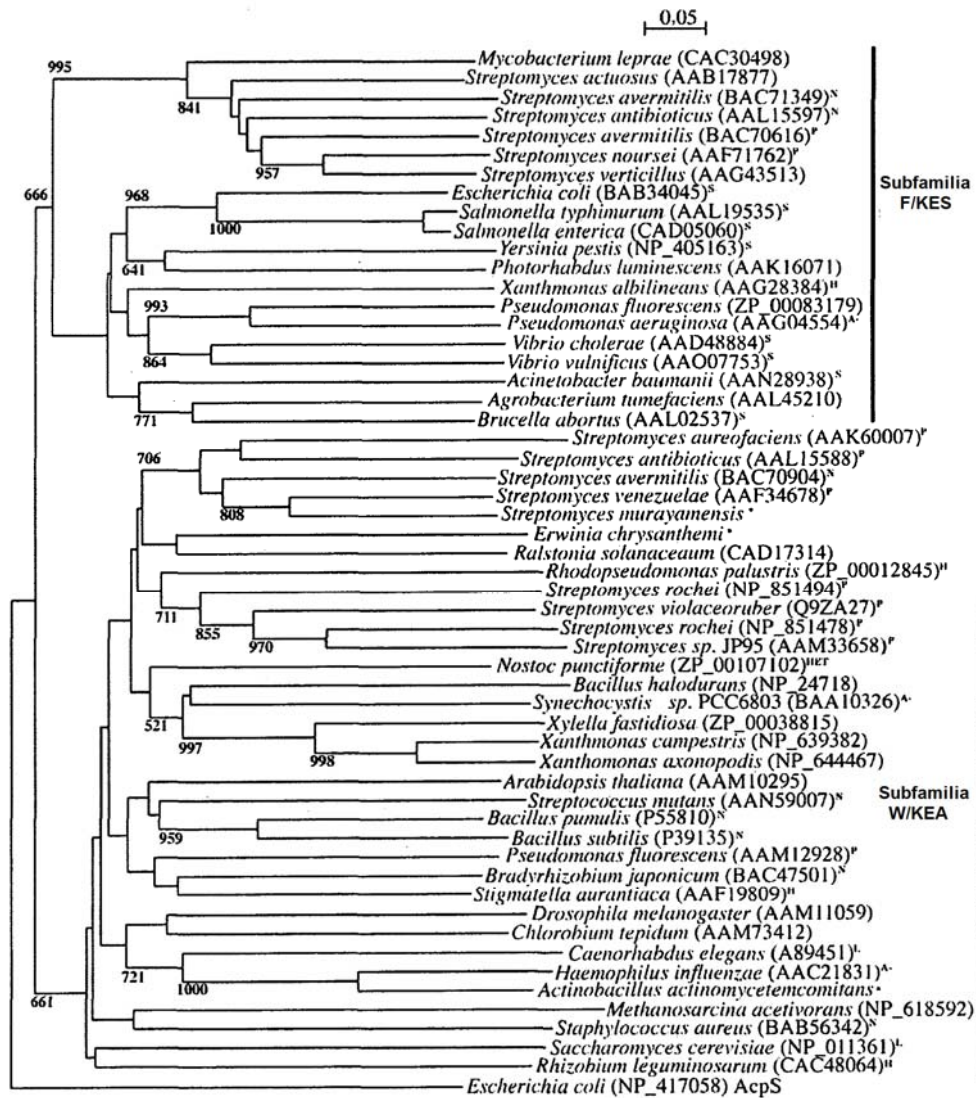


Figura 4

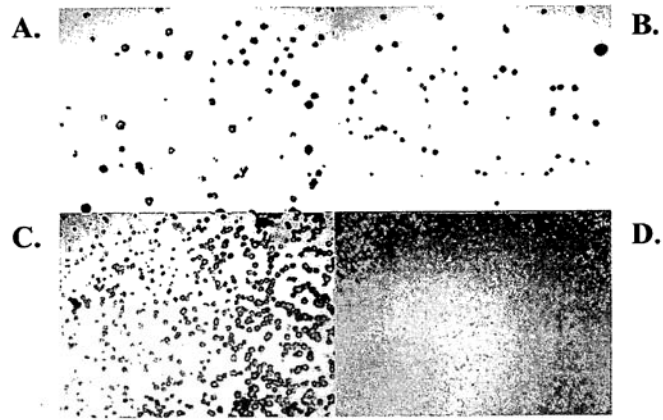


Figura 5

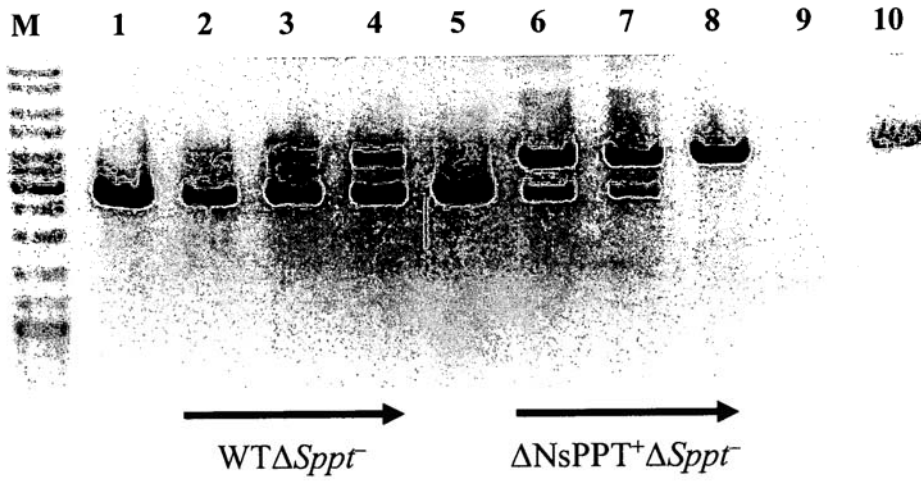


Figura 6

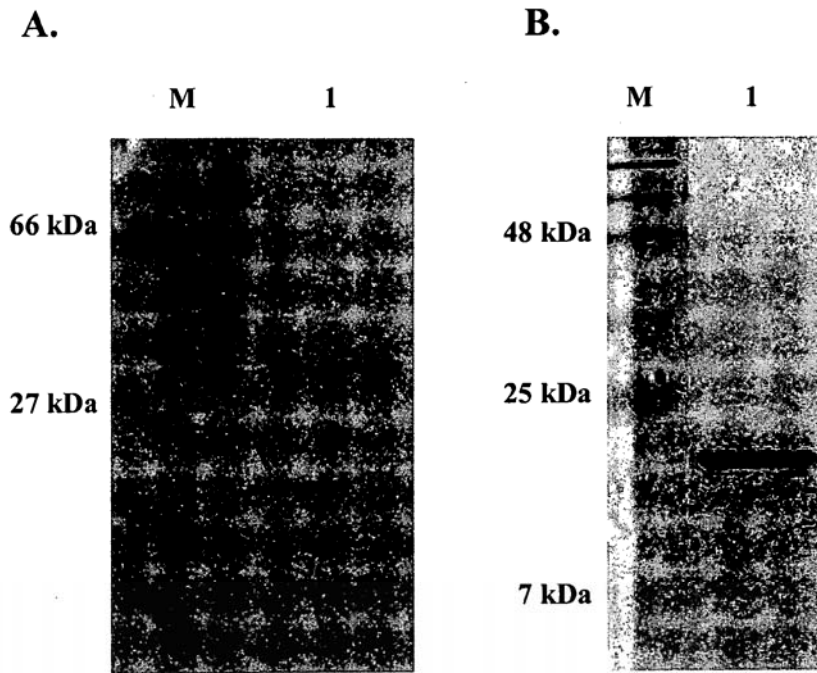


Figura 7

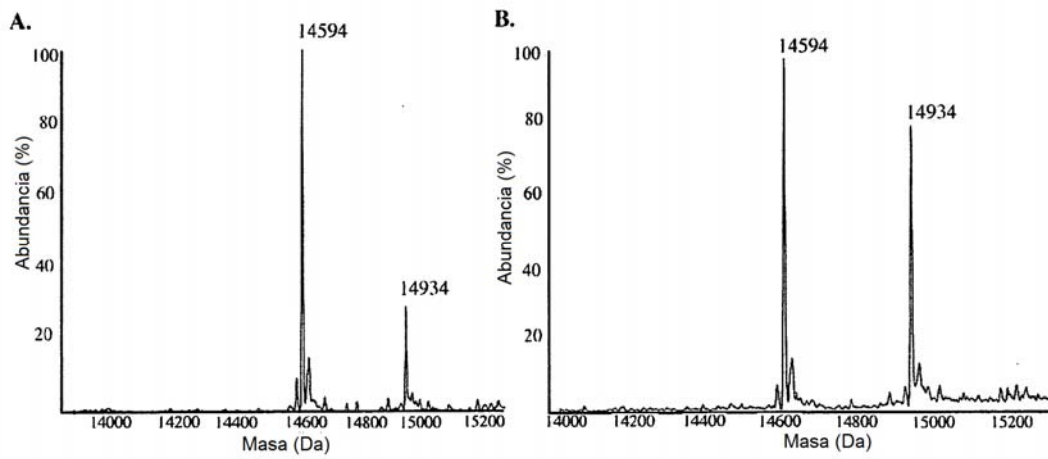


Figura 8

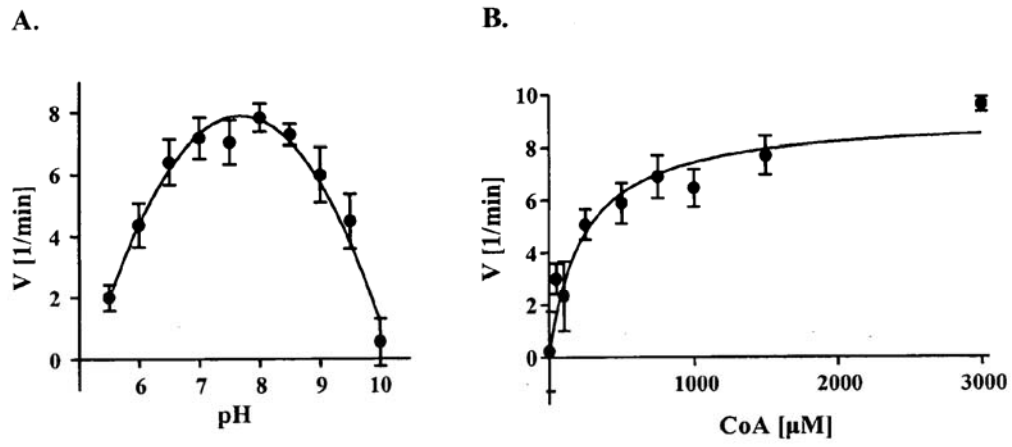


Figura 9

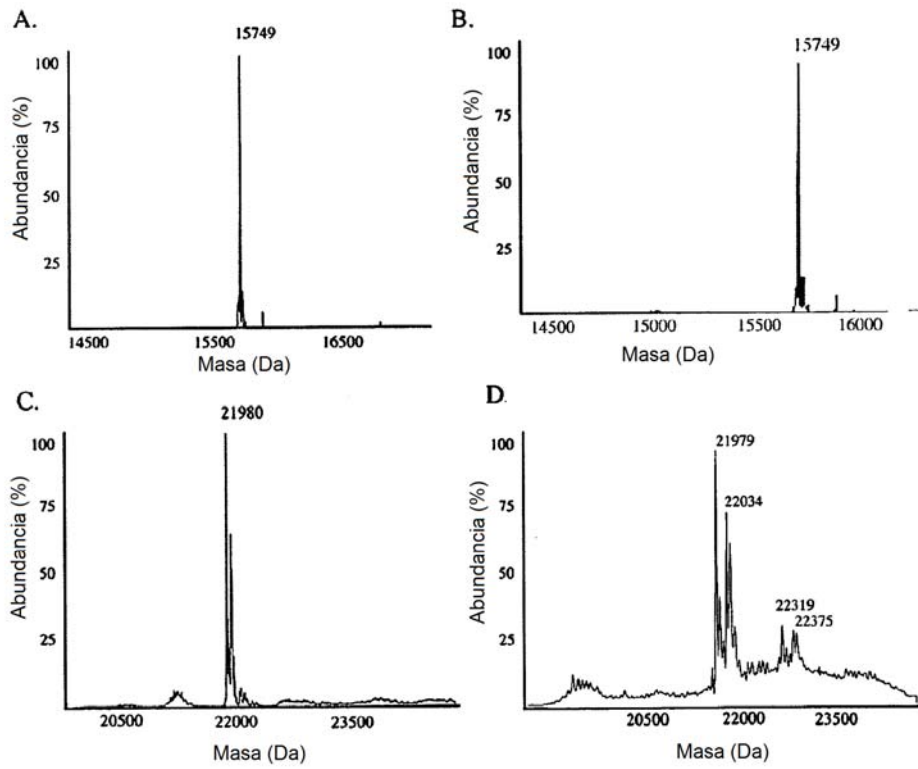


Figura 10

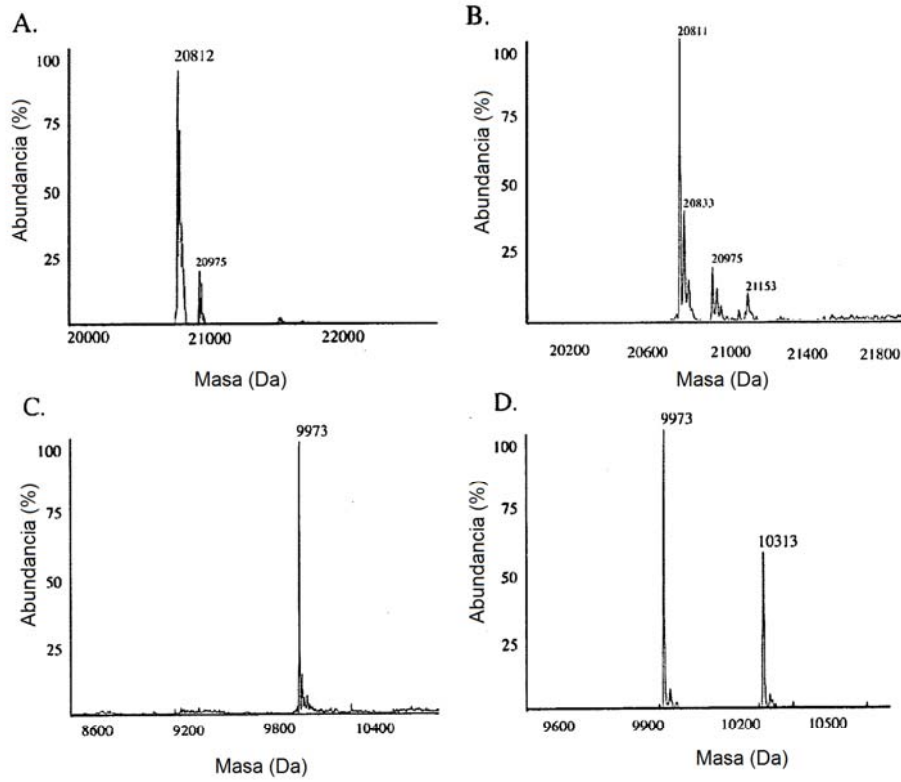


Figura 11

Proteína portadora (CP)	Masa esperada (Da)	Masa de apo-CP observada (Da)	Masa de holo-CP observada (Da)*	% de holo-CP (estimado) [†]
NpArCP glucolípido sintasa	15.751	15.749	ND	0%
MPCP microcistina NRPS	21.978	21.978	22.319	8%
NpACP nostopeptolida PKS	20.812	20.812	21.153	5%
TycPCP tirocidina NRPS	9.970	9.973	10.313	54%

Figura 12

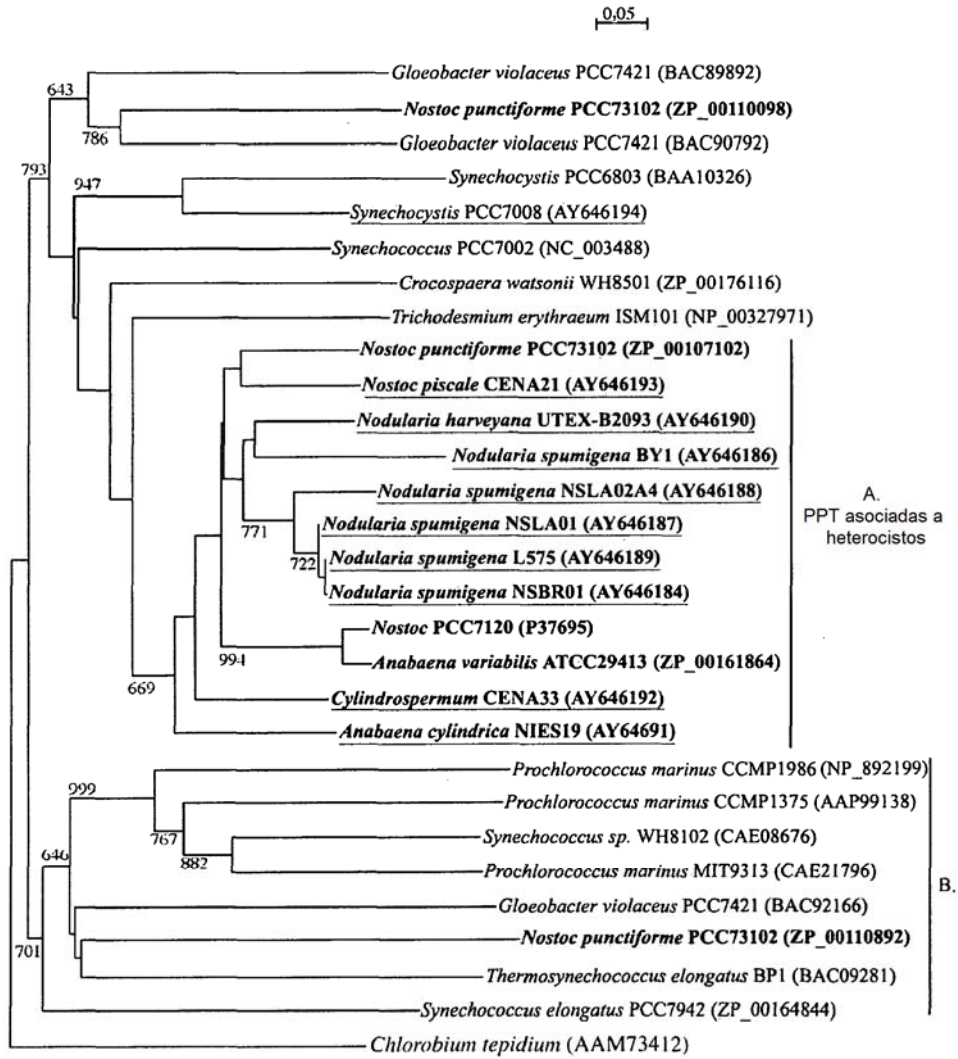


Figura 13

```

NhcS      1  MTALNHLWLFVPTNLTLLPNDVHIWRIHLDVPEAQQNLATLSGDELTRANRFHFOEHR
all5359  --MLQHTWLPKPPNLLLSDEVHLWRIPLDQESLQLLAATLSSELARANRFVFEHR
slr0495  ---MLPQP-----QIWLCETDRF--LIPGYQALLSSEMARGERYQRPQDK
Sfp      -----MCLSSNVN---QHNDTTVVVGTISSLHSRKEEVYSLSSDERQRAERMKSSVYA

NhcS      61  QRFIAGRGILRSILGSVLGHEPQRVLDYQERGKPILADSLAKSGLWFNDSHSQLALCA
all5359  RRFIAGRGILRSILGYLGVEPGQVKDYESRGKPILGDRFAESGLLFNDSHSQNLALCA
slr0495  QRFLTMRLALRILARQLDCLPQOLOTYGPQGKPELVDRERRS-PWFNVAHSGNYGLIG
Sfp      ERFKLIRGYLRFLLSTVLALPSNOIHETYGKYGKPIVEN---NDYFFNVSHAKDYFLIG

NhcS      121  VNYHNRIGIDLEYIRRMSDVEALAKRFFLPREYDVVRSISDHQQEIFFRYWTCKEAYLK
all5359  VNYTRQIGIDLEYLRFTSDLESLAKRFFLPREYELLRSLPDEQKQIFFRYWTCKEAYLK
slr0495  LSTEGEIGVDLQIMLPKPHYLKLAKRFFAPOEVQOLESLEGEKRTKLFYQLWTAKEAFLK
Sfp      LHETAVLGVDIECPRPFP--PKVHPFFHQDEINLLASVDPDQMRLWLSLWTRKEALGK

NhcS      181  ATGEGLAQ-LEQVEVLNPTEPAQLQTSESWSLFELRA-----AEDYFAAVVEGSGC
all5359  ATGDGIAK-LEEIEIALTPTEPAKLQTAPASLLELVP-----DDNCVAAVAVAGFGW
slr0495  ATGKGISGGLNQVIPDENLAKYQYLPDSGDTNHWRLSSQPADQGSNDNYWMAIAWCTNEV
Sfp      AVGEGLSS---NIGKQSVLSDTIHYNGREYVLTQHDE-----SYVKTICLEGKSV

NhcS      233  NLQCWQY-----
all5359  QPKFWHY----- (81%)
slr0495  NQVESNYLPNIQPFQWPRNLDSLP (58%)
Sfp      Q----- (55%)

```

Figura 14

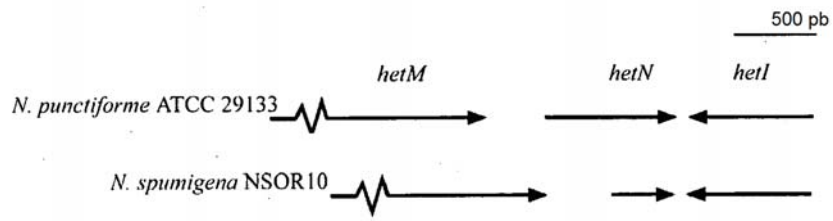


Figura 15

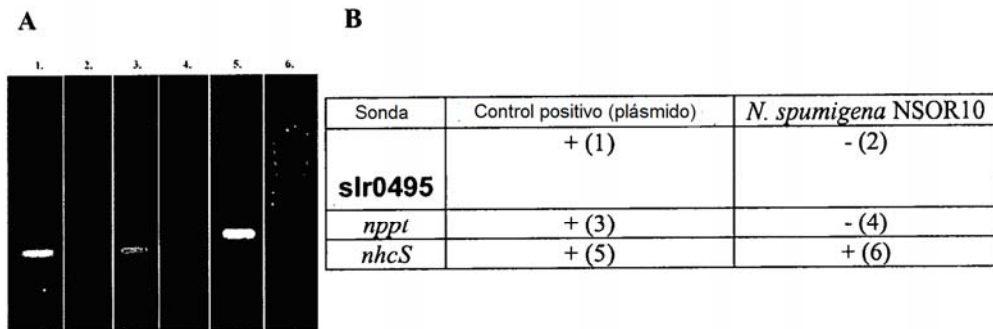


Figura 16

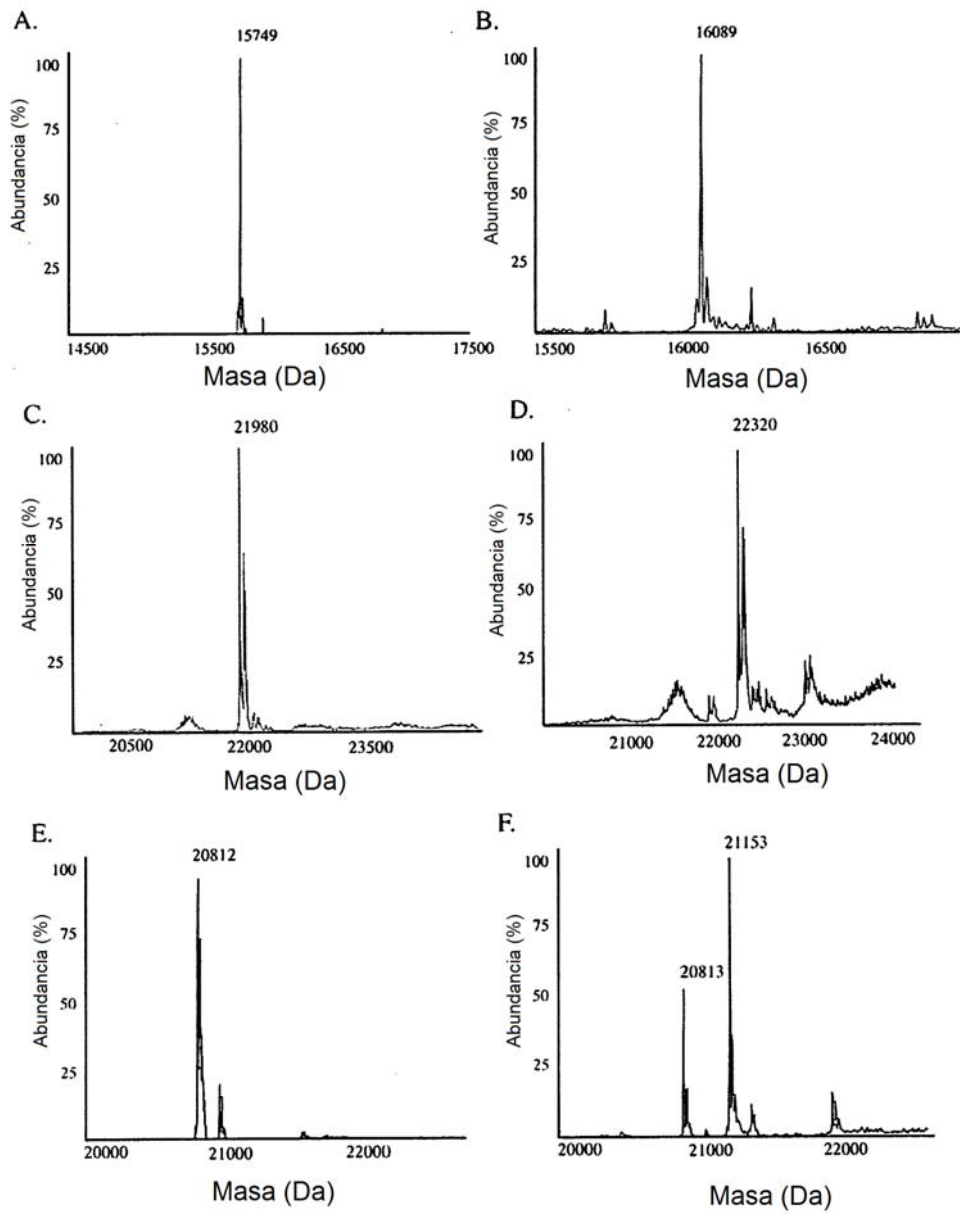


Figura 17