



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 324 084**

⑫ Número de solicitud: 200703068

⑮ Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **21.11.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.07.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad Pública de Navarra
Campus de Arrosadia, s/n
(OTRI) Edificio El Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Solano, Cristina;
García, Begoña;
Toledo-Arana, Alejandro;
Latasa, Cristina;
Zorraquino, Violeta;
Valle, Jaione y
Lasa, Iñigo**

⑲ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑳ Título: **Procedimiento que permite producir modificaciones múltiples en el cromosoma de bacterias Gram negativas y cepas de *Salmonella* deficientes en síntesis de c-di-GMP obtenidas por el mismo.**

㉑ Resumen:

Procedimiento que permite producir modificaciones múltiples en el cromosoma de bacterias Gram negativas y cepas de *Salmonella* deficientes en síntesis de c-di-GMP obtenidas por el mismo.

El procedimiento permite realizar múltiples modificaciones en el genoma de bacterias Gram negativas de forma sencilla y eficaz, utilizando los plásmidos de la invención, que contienen un gen indicador bajo el control de un promotor constitutivo, un origen de replicación específico para bacterias Gram negativas, un gen que codifica una proteína termosensible esencial para la iniciación de la replicación del plásmido, convirtiendo el origen de replicación en termosensible, y un gen de contra-selección. La invención se refiere también a cepas mutantes de *Salmonella enterica* obtenidas mediante el procedimiento de la invención en las que parte o los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF han sido deletados y al uso de las mismas como vectores de expresión, agentes inmunoterapéuticos y en estudios metabólicos.

ES 2 324 084 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento que permite producir modificaciones múltiples en el cromosoma de bacterias Gram negativas y cepas de *Salmonella* deficientes en síntesis de c-di-GMP obtenidas por el mismo.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar modificaciones en el genoma de una bacteria Gram negativa que permite realizar múltiples modificaciones sucesivas sobre una misma cepa bacteriana de forma sencilla y eficaz, así como a los plásmidos que permiten llevar a cabo dicho procedimiento. La invención se refiere también a dos cepas mutantes de *Salmonella enterica* obtenidas mediante el procedimiento de la invención en las que los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF han sido delecionados (mutante Δ XII::Km y mutante Δ XII::Clo) y a cepas derivadas de las anteriores, o de las cepas intermedias utilizadas para su obtención, que son capaces de expresar una única proteína GGDEF funcional, así como a los posibles usos de las mencionadas cepas mutantes de *Salmonella*.

Estado de la técnica

Las proteínas GGDEF y el c-di-GMP

La primera asociación entre el c-di-GMP y las proteínas GGDEF se realizó durante el estudio de la síntesis de celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente denominada *Acetobacter xylinum*). Un artículo pionero publicado por el grupo de Moshed Benziman (Christensen, 1987) demostró que la actividad de la subunidad reguladora de la celulosa sintetasa se activaba tras la unión del dinucleótido cíclico di-guanidin-monofosfato cíclico, c-di-GMP (Fig. 1). Este trabajo pasó desapercibido hasta que 11 años más tarde, este mismo grupo proporcionó la primera conexión entre la síntesis/degradación del c-di-GMP y las proteínas con dominios GGDEF (dominio relacionado con la actividad diguanilato ciclasa, es decir, con la síntesis de c-di-GMP) y/o EAL (dominio relacionado con la actividad fosfodiesterasa, es decir, con la degradación del c-di-GMP y que puede encontrarse aislado en un polipéptido o combinado con el dominio GGDEF sobre la misma proteína). Mediante genética reversa y utilizando la secuencia de aminoácidos de las proteínas con actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa purificadas, Tal *et al.* (Tal *et al.*, 1998) clonaron y caracterizaron tres operones implicados en el control de los niveles de c-di-GMP en *G. xylinus*. Cada uno de estos operones incluía dos genes, un gen que codificaba una proteína con actividad diguanilato ciclasa, responsable de la síntesis de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP y un gen que codificaba una fosfodiesterasa, responsable de la degradación del c-di-GMP a GMP. El análisis de las secuencias de estas enzimas reveló que las seis proteínas parálogas codificadas por estos tres operones tenían en común la presencia de dos dominios, a los que se denominó GGDEF (anteriormente DUF1, Domain of Unknown Function 1) y EAL (anteriormente DUF2), debido a la presencia muy conservada de estas secuencias de aminoácidos en cada uno de ellos. En base a estos resultados, el grupo de M. Benziman propuso un modelo de regulación de la síntesis de celulosa en el que proteínas con dominio GGDEF serían responsables de la síntesis de c-di-GMP mientras que las proteínas con dominio EAL serían responsables de la degradación del c-di-GMP. El c-di-GMP se uniría a la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa activando de forma alostérica la síntesis de la celulosa.

La reciente secuenciación de los genomas bacterianos ha puesto de manifiesto que el dominio GGDEF es extremadamente abundante, pudiendo contabilizarse hasta 4200 proteínas con dominio GGDEF en las bases de datos. A pesar de su abundancia, la presencia de las proteínas con dominio GGDEF está restringida a las bacterias y no se ha encontrado ninguna proteína con este dominio en Arqueas o Eucariotas (Galperin, 2004). Dentro de las bacterias, existen proteínas GGDEF en la mayoría de los genomas secuenciados desde *Aquifex* y *Thermotoga* hasta las α y γ Proteobacterias. El dominio GGDEF está ausente de los genomas de *Bacteroidetes*, *Chlamidiales* y *Fusobacteria*. La abundancia de proteínas conteniendo este dominio es muy variable entre las distintas especies bacterianas. Así, el genoma de *Escherichia coli* contiene 19 proteínas con dominio GGDEF, el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* contiene 39 proteínas con dominio GGDEF, *Bacillus subtilis* tiene 4, y el pequeño genoma de *Rickettsia prowazekii* contiene una única proteína GGDEF. La bacteria con mayor número de proteínas GGDEF es *Vibrio vulnificus* cuyo genoma contiene 66 proteínas con dominio GGDEF.

Uno de los aspectos más llamativos de las proteínas GGDEF es que, a pesar de su abundancia, la inmensa mayoría de estas proteínas no ha sido relacionada con ninguna función biológica. Así, hasta muy recientemente, ninguna de las 19 proteínas con dominio GGDEF de *E. coli* se había relacionado con alguna función biológica. Una situación similar ocurre con las 39 proteínas del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* o con las 41 proteínas del genoma de *Vibrio cholerae*. Tras este letargo, en los últimos tres años y coincidiendo con el estudio exhaustivo del proceso de formación de biofilms, se han descrito numerosas proteínas con dominio GGDEF implicadas en distintos procesos bacterianos, incluyendo la síntesis de exopolisacáridos y formación del biofilm, procesos de diferenciación en *Caulobacter crescentus*, virulencia de patógenos animales y de plantas y regulación de genes implicados en fotosíntesis en *Synechococcus elongatus* (para revisión consultar (Romling *et al.*, 2005, Ryan *et al.*, 2006, Jenal & Malone, 2006, Tamayo *et al.*, 2007)). De forma general, se ha observado que niveles elevados de c-di-GMP están asociados con una mayor capacidad de la bacteria para adherirse a un sustrato (sesilidad), la formación de biofilm y la expresión de componentes adhesivos de la matriz extracelular, mientras que niveles bajos de c-di-GMP se han relacionado con una mayor motilidad y virulencia.

De forma general, y apoyados en el hecho de que el dominio GGDEF suele estar con frecuencia acompañado de otros dominios sensores (PAS, PAC, MASE2, HAMP), se ha sugerido que las proteínas GGDEF podrían ser miembros de una red de transducción de señal que permitiría adecuar la respuesta a estímulos externos mediante la producción del transmisor secundario de señal, el c-di-GMP. La pregunta que surge inmediatamente es cómo diferentes estímulos pueden dar lugar a respuestas particulares, si todos ellos convergen en la producción de una misma molécula difusible, el c-di-GMP, para transmitir la señal.

La abundancia de proteínas implicadas en la síntesis de c-di-GMP en los genomas bacterianos, y el hecho de que su presencia esté exclusivamente restringida al dominio *Bacteria*, no habiéndose descrito la presencia de proteínas GGDEF en ningún genoma eucariota, ni en ningún genoma de Arqueas hasta ahora secuenciados, convierten a este mensajero de señal y a su ruta de señalización en una diana interesante para el desarrollo de sustancias que bloqueen su síntesis y, en consecuencia, la capacidad de formar biofilms, adherirse a superficies o la virulencia de las bacterias.

Las infecciones causadas por las bacterias del género *Salmonella*, tanto en animales como en seres humanos, han sido causa de gran preocupación durante bastantes años. El desarrollo de cepas atenuadas de *Salmonella* para generar con ellas protección frente a las enfermedades causadas por las bacterias de este género ha suscitado gran interés entre los investigadores, que han intentado averiguar los factores de patogenicidad de estas bacterias para intentar combatirlos. Entre otros, la formación de biofilm es un importante factor de patogenicidad de *Salmonella*, ya que le permite sobrevivir en ambientes fuera del huésped, incluyendo el suelo y el agua, y así pasar con facilidad del aparato digestivo del huésped al ambiente y viceversa. La capacidad de formación de biofilms parece estar ampliamente extendida entre los serotipos de *Salmonella enterica* (una de las principales especies que da lugar a infecciones intestinales) y, particularmente, entre los serotipos Enteritidis (al que se hará referencia de aquí en adelante como *S. Enteritidis*) y Typhimurium (al que se hará referencia de aquí en adelante como *S. Typhimurium*).

Debido a su influencia en la patogenicidad y virulencia, los factores que influyen sobre la capacidad de formación de biofilms por parte de las especies de *Salmonella* y otras especies patógenas tales como *Escherichia coli* han sido objeto de gran interés. Así, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense US2004/017517 reivindica un método para reducir la formación de biofilms en cepas con capacidad para ello pertenecientes a la especie *E. coli* o a los géneros *Salmonella*, *Klebsiella* o a los de gamma-proteobacterias relacionadas, mediante el incremento de los niveles de la proteína CsrA (abreviatura del inglés *carbon storage system*), una proteína inhibidora de la síntesis de glucógeno, proponiendo para ello varias alternativas: el uso de un oligonucleótido modulador de su expresión; el aumento de la expresión y/o traducción de genes implicados en la regulación de la síntesis de dicha proteína CsrA, tales como CsrB, BarA, SdiA y UvrY; el aumento de la actividad de la proteína UvrY mediante el control de su grado de fosforilación o el incremento de la vida media de dicha proteína o de su RNA mensajero. Las proteínas de la familia GGDEF, por su parte, también han sido objeto de interés para dilucidar su papel en la formación de biofilms.

El análisis de los genomas de distintos serotipos de *Salmonella enterica* muestra la presencia de hasta 12 proteínas con dominio GGDEF (Fig. 2A). Tal redundancia de proteínas parálogas en ésta y otras bacterias supone un reto para los estudios funcionales que pretenden dilucidar el papel fisiológico de las rutas de señalización que tienen al c-di-GMP como segundo mensajero. Dos proteínas de esta familia (AdrA y el producto del gen inicialmente identificado como STM1987, indicado en la Fig. 2A como GcpA) han sido implicadas en procesos de síntesis de exopolisacáridos (celulosa) y formación de biofilm (Romling *et al.*, 2000, García *et al.*, 2004). En el caso de STM1987 durante un estudio dedicado a averiguar por qué la cepa SL1344 de *S. Typhimurium* es incapaz de formar biofilms tanto en medios de crecimiento ricos (LB) como en medios deficientes en nutrientes, se encontró que el gen *stm1987* (que codifica una proteína con un dominio GGDEF, GcpA) es esencial para la formación de biofilm en un medio deficiente en nutrientes (García *et al.*, 2004). En este mismo trabajo, se construyeron cepas mutantes, en cada uno de los genes que codifica una proteína que tuviese el motivo GG[DE]EF conservado (donde [DE] indica la presencia de ácido glutámico o de ácido aspártico en esa posición). El genoma de *Salmonella* contiene seis proteínas (STM4551, STM2123, STM1283, STM1703, STM3388, STM2672), además de AdrA y STM1987 que presentan conservado este dominio. El análisis del fenotipo de estos mutantes indicó que ninguno de ellos afectaba a la producción de celulosa o a la formación de biofilm. Sin embargo, la complementación de los mutantes en *adrA* o *stm1987* con cada una de las restantes proteínas GGDEF mostró que la mayoría de las proteínas GGDEF eran capaces de compensar la deficiencia de *adrA* o *stm1987* y por tanto estas proteínas son funcionales y están funcionalmente relacionadas, controlando los niveles del c-di-GMP. Estos estudios mostraron que el c-di-GMP regula, entre otros procesos, la producción de celulosa y la formación de biofilms. Ninguno de los estudios realizados, sin embargo, dio lugar a cepas mutantes que carecieran de más de dos miembros funcionales de la familia de proteínas GGDEF.

La presencia redundante de proteínas GGDEF en el genoma de las bacterias dificulta enormemente la dilucidación de la función particular de cada proteína GGDEF porque no es posible descartar que los restantes miembros de la familia tengan alguna influencia sobre el fenotipo en estudio cuando se inactiva una sola de las proteínas de esta familia o un número reducido de ellas. Así se señala en los estudios del grupo de Ute Römling (Simm *et al.*, 2004, Kader *et al.*, 2006), en los que se concluye que los niveles incrementados de c-di-GMP no sólo afectan a la biosíntesis de celulosa, sino que la elevación de dichos niveles provocada por la sobreexpresión de la proteína AdrA conducen a la activación de la biosíntesis de fimbrias *curli*, otro componente de la matriz extracelular que se produce simultáneamente con la celulosa, debido a que la producción de ambos elementos está regulada positivamente por CsgD. En estos trabajos también se observa que concentraciones elevadas de c-di-GMP permiten superar la regulación negativa que ejerce la temperatura sobre el morfotipo multicelular *rdar* (del inglés *red, dty and rough*), un comportamiento multicelular descrito en *S. enterica* y *Escherichia coli* que refleja la expresión de celulosa y fimbrias de tipo *curli* en la matriz ex-

tracelular. Esta regulación negativa se supera debido a que los niveles elevados de c-di-GMP consiguen que se induzca la expresión de CsgD a 37°C. Como en el caso anterior, los estudios de este grupo se produjeron mayoritariamente con mutantes en los que se había inactivado como máximo una única proteína GGDEF y en ningún caso con cepas en las que se hubieran inactivado más de tres proteínas GGDEF, por lo que sus conclusiones sobre el impacto de las proteínas GGDEF en la fisiología celular se redujeron a confirmar el papel de CsgD como un regulador significativo de la aparición del morfotipo rda y a señalar que el impacto de cada proteína GGDEF en concreto sobre el metabolismo de las bacterias podría estar determinado parcialmente por el nivel de expresión de cada proteína en particular.

Sería interesante encontrar un sistema que permitiera estudiar la función precisa de cada uno de los miembros de la familia GGDEF sin que la presencia de otros miembros de la misma familia perturbara el fenotipo en estudio, preferentemente, la formación de biofilms y su influencia en la patogenicidad. La concepción y, sobre todo, el desarrollo de la herramienta apropiada para tal finalidad se ha visto hasta ahora frenada por los procedimientos utilizados habitualmente para las modificaciones del genoma bacteriano.

15 *Modificaciones del genoma bacteriano en ausencia de marcadores de selección*

La modificación del genoma de las bacterias se realiza actualmente mediante un proceso en el que la zona del genoma que se desea modificar se clona en un plásmido, se somete a la modificación deseada y se introduce nuevamente en el cromosoma de la bacteria mediante un proceso de recombinación homóloga. Para facilitar la selección de las bacterias en las que se ha producido la modificación, se introduce simultáneamente junto con la modificación un gen marcador de selección. Tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina gen marcador de selección a un gen cuya expresión da lugar a una proteína que permite la supervivencia de las bacterias que lo poseen en unas determinadas condiciones de crecimiento, que darían lugar a la paralización de la replicación de las mismas o a la destrucción de su estructura celular en ausencia del producto de dicho gen marcador de selección. El ejemplo típico de gen marcador de selección lo constituyen los genes que confieren resistencia a antibióticos: en presencia del antibiótico, las bacterias que carecen del gen de resistencia no pueden sobrevivir; las bacterias que poseen el gen cuyo producto confiere resistencia a dicho antibiótico, en cambio, son capaces de sobrevivir y replicarse en presencia del antibiótico, lo cual, en teoría, permite seleccionar las bacterias que poseen el gen de resistencia al antibiótico y la eliminación de las bacterias que no lo poseen. Entre los genes de resistencia a antibióticos, los más comúnmente utilizados en los métodos de modificación de los genomas bacterianos son los que confieren resistencia a ampicilina, kanamicina, tetraciclina o cloranfenicol (como el gen *cat*, que codifica una cloranfenicol transacetilasa).

Cuando se utilizan los sistemas basados en selección de bacterias modificadas mediante la presencia de genes de resistencia a antibióticos u otros genes marcadores de selección, cada modificación supone la inserción en el cromosoma de la bacteria de un gen de resistencia a un antibiótico o de otro gen marcador de selección. Este procedimiento presenta serias limitaciones porque el número de marcadores de selección disponible es pequeño, y por tanto el número de modificaciones que se pueden realizar sobre una misma bacteria es limitado.

Además, en el caso de que se deseen realizar varias modificaciones sobre la misma bacteria, es necesario introducir un gen marcador de selección con cada modificación, generando cepas multirresistentes a antibióticos, con los importantes inconvenientes medio-ambientales que esto conlleva para su posible utilización no confinada.

Para solucionar este problema se han desarrollado distintos procedimientos que permiten eliminar los marcadores de selección mediante la utilización de recombinasas sitio-específicas: recombinasa Cre-lox del fago/plásmido P1 (Ayres *et al.*, 1993), ParA-res (Kristensen *et al.*, 1995), TnpR-res (Camilli *et al.*, 1994) o el sistema FLP-FRT de *Saccharomyces cerevisiae* (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Las recombinasas reconocen secuencias de ADN específicas que se sitúan a ambos lados del marcador de selección, de forma que, tras el proceso de recombinación, el marcador situado entre las secuencias es eliminado junto con una de las secuencias de reconocimiento. Sin embargo, durante la reacción en la que la recombinasa elimina el marcador de selección, una de las secuencias de reconocimiento flanqueantes no se elimina y queda como huella en el genoma. Tras varias rondas de modificación en una misma cepa, el genoma tendrá esparcidas por distintos puntos del mismo secuencias de reconocimiento de la recombinasa. En esta situación, el riesgo de que la recombinasa elimine fragmentos del genoma contenidos entre dos secuencias de reconocimiento en lugar del marcador de selección aumenta significativamente. Otra limitación de esta metodología es que resulta muy difícil realizar pequeñas modificaciones o sustituciones en el interior de un gen, porque el marcador de selección que acompaña a la modificación o la secuencia de reconocimiento de la recombinasa suponen por sí mismas una alteración importante en la secuencia de ADN de la bacteria que se está modificando.

Otra estrategia utilizada para realizar manipulaciones de ADN, en ausencia de genes marcadores de selección, se ha basado en la utilización de sistemas de contra-selección. Aquí, el plásmido en el cual se ha clonado el fragmento de ADN que lleva la modificación que se desea introducir en el genoma de la bacteria, contiene además un gen que codifica una enzima cuya presencia resulta tóxica en presencia de un determinado sustrato en el medio de cultivo: a este gen es al que se le denomina gen de contra-selección. De forma que, una vez que el plásmido ha sido integrado por un proceso de recombinación, la bacteria se crece en presencia del sustrato de contra-selección y, en teoría, sólo las bacterias que pierden el plásmido gracias a un segundo evento de recombinación son capaces de sobrevivir. Varios sistemas de contra-selección han sido utilizados: inhibición del crecimiento en presencia de sacarosa mediada por el gen *sacB* (Ried & Collmer, 1987), inhibición del crecimiento en presencia de ácido fusárico mediada por genes de resistencia a tetraciclina (Maloy & Nunn, 1981), inhibición del crecimiento en presencia de análogos de nucleótidos mediada por fosforibosil transferasas (PRT) (Bitan-Banin *et al.*, 2003, Fabret *et al.*, 2002, Peck *et al.*, 2000).

La selección de las bacterias en las que se ha producido modificación del genoma en dos pasos, es decir, una primera integración del vector que contiene la secuencia con la modificación deseada y la pérdida del vector concomitante a la delección del gen de interés, se ha intentado optimizar con vectores en los que se expresa un gen indicador. Tal como se utiliza en la presente memoria, se denomina gen indicador a un gen que codifica una proteína cuya presencia da lugar a una característica visible, fácilmente identificable, cuando dicha proteína está presente, lo que indica que está presente también el gen que la codifica. A diferencia de los genes de selección o contra-selección, la presencia o ausencia de dicha proteína no es determinante para la supervivencia del organismo hospedador que la contenga en los medios de selección utilizados habitualmente para su crecimiento. Los genes indicadores más habituales son aquellos que codifican una proteína que es capaz de transformar un compuesto en un segundo compuesto que presenta un color diferente, fácilmente identificable. Uno de los genes más utilizados para tal propósito es el gen *lacZ*, que codifica una enzima β -galactosidasa que es capaz de transformar el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) dando lugar a un compuesto de color azul; así, en presencia del gen indicador, los organismos que lo posean (bacterias transformadas con el plásmido de la invención en nuestro caso) aparecerán de color azul cuando se incuben en presencia de X-Gal, mientras que los organismos que no posean dicho gen (bacterias que no hayan sido transformadas por el plásmido) aparecerán de color blanco aunque se incuben en presencia de X-Gal.

Entre los genes indicadores, el más utilizado ha sido el gen *lacZ* de *Escherichia coli*, insertándolo en un plásmido bajo el control de un promotor constitutivo, como sucede con el vector pORI (Leenhouts *et al.*, 1996). En el caso de dicho vector, sin embargo, aunque la presencia o ausencia del gen *lacZ* permite una cribado sencillo de los eventos de recombinación mediante el desarrollo en las colonias de color azul o blanco en presencia de X-Gal, estos plásmidos carecen del gen *repA* que codifica la proteína de iniciación de la replicación y son incapaces de replicarse en las bacterias a menos que se proporcione la proteína RepA *in trans*, por lo que se requieren altas frecuencias de transformación para obtener integraciones, estando limitado el uso de dichos vectores a bacterias con alta eficiencia de transformación.

Otra estrategia utilizada para favorecer la integración del plásmido y su pérdida tras su escisión del cromosoma es la combinación de marcadores de selección, sistemas de contra-selección y orígenes de replicación sensibles a la temperatura, como ocurre en el vector pKO3 (Link *et al.*, 1997), que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol, un gen *sacB* de contra-selección y un origen de replicación termosensible. En estos sistemas, el crecimiento de las bacterias a una temperatura superior a aquella por encima de la cual el origen de replicación del plásmido no funciona como tal, permite la selección de bacterias en las que el plásmido se ha integrado en el cromosoma; posteriormente, tras crecer las bacterias de nuevo a la temperatura permisiva para la replicación del plásmido, las colonias resistentes a sacarosa y sensibles a cloranfenicol serán las que podrán ser susceptibles de que el plásmido se haya escindido, habiendo sido reemplazado el gen del interés por las secuencias previamente alteradas que se deseaba insertar. La práctica ha demostrado que este sistema da lugar a un gran número de falsos positivos y no resulta válido para realizar transformaciones rutinarias que implican varias modificaciones consecutivas en el genoma de una misma bacteria.

Por todo ello, la introducción de modificaciones consecutivas en los genomas de bacterias y, en especial, de bacterias Gram negativas, mediante un método sencillo y que no dé lugar en el genoma a alteraciones adicionales a las que se desea introducir, ha representado un cuello de botella para la modificación genética múltiple del cromosoma de las bacterias. Este mismo problema dificultaba también el desarrollo de herramientas útiles para el estudio de procesos biológicos en los que están implicadas familias de proteínas que, como el caso de la familia de proteínas GGDEF, parecen estar relacionadas en su función. La presente invención proporciona solución a estos problemas.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un método sencillo para la modificación del ADN cromosómico de bacterias Gram negativas sin necesidad de dejar incorporado, adicionalmente a la secuencia modificada que se desea introducir en el genoma o que se desea eliminar del mismo, un marcador de selección o una secuencia de reconocimiento de una recombinasa. Este procedimiento alternativo se basa en la combinación de los sistemas de contra-selección y de presencia de un gen indicador como *lacZ*.

El sistema se basa en la utilización de un plásmido cuya estructura permite la combinación de ambos sistemas de selección. Por ello, es un objeto de la presente invención un plásmido que contiene un gen indicador bajo el control de un promotor constitutivo, un origen de replicación específico para bacterias gram negativas, un gen que codifica una proteína termosensible esencial para la iniciación de la replicación del plásmido convirtiendo el origen de replicación en termosensible (*ori-ts*) y un gen de contra-selección. Se prefiere que el gen indicador sea un gen *lacZ*, el promotor constitutivo sea el promotor del gen *clpB* (*pclpB*) y el gen de contra-selección es el gen *sacB*. En cualquier caso, la presencia adicional de un gen de selección permite una mayor fiabilidad en la selección de las bacterias que han sido transformadas con el plásmido, por lo que son realizaciones preferidas de los plásmidos de la invención aquellos que además incorporan un gen marcador de selección, entre los cuales se prefiere especialmente que el gen de selección sea un gen que confiera resistencia a un antibiótico, por ejemplo, el gen *cat* de resistencia a cloranfenicol. El plásmido pKO3blue, que se utiliza posteriormente en los ejemplos de la presente memoria, responde a todas las preferencias expresadas y es una realización especialmente preferida de los plásmidos de la invención.

Para poder amplificar el plásmido y obtener copias del mismo, es necesario transformar con dicho plásmido una bacteria cualquiera en la que el plásmido sea replicable. Por ello, es también un objeto de la invención una cepa bacteriana transformada con un plásmido de la invención y, particularmente, la cepa *Escherichia coli* XL1Blue pKO3Blue,

transformada con el plásmido pKO3blue y que se ha utilizado para amplificar las copias del plásmido utilizadas en los Ejemplos que se presentan más adelante en la presente memoria.

El nuevo plásmido (pKO3blue) se ha construido sobre la base del plásmido pKO3 en el que se ha clonado un gen *lacZ* de *Bacillus stearothermophilus* que codifica la β -galactosidasa procedente del plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004) (Fig. 3). El gen *lacZ* se expresa constitutivamente, al estar bajo el control del promotor *pclpB* (promotor del gen *clpB* de *Escherichia coli*, que codifica para una chaperona esencial para la recuperación de las lesiones provocadas por las elevadas temperaturas) (Parsell *et al.*, 1994) y se utiliza para seleccionar la inserción/escisión del plásmido durante un proceso de recombinación homóloga que permite introducir en el genoma la modificación deseada, tras haber clonado en dicho plásmido el fragmento de ADN que contiene la modificación (delección, sustitución, inserción) que se desea trasladar al cromosoma de la bacteria.

Este plásmido facilita en gran medida la modificación del cromosoma de bacterias y la selección de bacterias en las que se ha introducido la modificación deseada, pues combina el sistema de contra-selección *sacB*-sacarosa presente en el plásmido pKO3 y la presencia de un origen de replicación termosensible (concretamente, el origen de replicación derivado del plásmido pSC101 (Link *et al.*, 1997) que actúa como origen de replicación en el rango de temperaturas de 25-35°C, pero no es funcional a partir de 43°C, comportamiento que muestra cuando está presente y se expresa el gen *repA*, gen que codifica una proteína termosensible esencial para la iniciación de la replicación del plásmido) junto con la actividad β -galactosidasa introducida en dicho plásmido. Esta combinación facilita enormemente la distinción entre aquellas bacterias en las que el proceso de recombinación se resuelve con la pérdida del plásmido de aquellas bacterias en las que este proceso no se ha producido.

La Fig. 4 ilustra cómo se van produciendo los sucesivos procesos de selección. En primer lugar, tras la transformación de las bacterias con el plásmido, se seleccionan aquellas bacterias que muestran actividad del gen indicador: las colonias con color azul en el caso de colonias creciendo en placas con un medio de cultivo que contiene X-Gal cuando el gen indicador es *lacZ*. Una vez seleccionadas, las bacterias transformadas se incuban a la temperatura restrictiva (43°C en el caso del pKO3blue) en presencia del antibiótico para el cual el plásmido tiene un gen de resistencia. Dado que el origen de replicación del plásmido no es funcional a dicha temperatura, sólo conservarán el plásmido aquellas bacterias en las que el plásmido se integre en el genoma de la bacteria mediante un proceso de recombinación. Para realizar la selección de bacterias en las que se integra el plásmido de aquellas bacterias en las que no se integra el plásmido, se plaquea una alícuota del cultivo en una placa que contenga el sustrato del gen indicador (X-Gal en el caso del *lacZ*) y se seleccionan varias colonias en las cuales el plásmido esté posiblemente integrado (en el caso de *lacZ*, las colonias que hayan incorporado el plásmido en el genoma tendrán color azul debido a la expresión del gen de la β -galactosidasa, *lacZ*). A partir de las colonias seleccionadas en el paso anterior, se comienza el proceso de selección de aquellas bacterias en las que se produce la escisión del plásmido mediante un segundo evento de recombinación, incubando las colonias a una temperatura permisiva (28°C en el caso de bacterias que han integrado el pKO3blue recombinante). En esta etapa, como consecuencia de un segundo proceso de recombinación, en un porcentaje de la población se producirá la escisión del plásmido, perdiéndose la actividad β -galactosidasa y, simultáneamente el gen de contra-selección y el gen que confiere resistencia al antibiótico. Al sembrar diluciones del cultivo en placas que contengan el compuesto que permita la detección de la ausencia o presencia del gen indicador (X-gal para *lacZ*) y en presencia del compuesto de contra-selección (sacarosa para el gen *sacB*), se seleccionan teóricamente sólo aquellas bacterias que hayan perdido el plásmido. En el caso de los procedimientos llevados a cabo con pKO3blue (que tiene como gen indicador *lacZ* y como gen de contra-selección el gen *sacB*), las bacterias se incubarán en presencia de X-gal y sacarosa y las bacterias supervivientes deberán aparecer de color blanco. Es importante señalar que esta etapa representa uno de los pasos limitantes en el proceso de doble recombinación que tiene lugar durante el intercambio alélico y es una etapa que da lugar a un gran número de falsos positivos en los procedimientos anteriores a la técnica descrita en esta invención, desventaja que se ve soslayada gracias al procedimiento de modificación del genoma de bacterias Gram negativas de la invención, que utiliza los plásmidos de la invención previamente descritos. Posteriormente, es conveniente confirmar que la modificación deseada se ha introducido en el cromosoma de la cepa seleccionada, lo cual puede hacerse, por ejemplo, llevando a cabo una reacción de PCR utilizando una pareja de cebadores que permitan la amplificación de la secuencia que supuestamente deba contener el fragmento modificado (oligonucleótidos E y F en la Fig. 5).

Por todo ello, es otro objeto de la invención un procedimiento para la modificación del genoma de una bacteria Gram negativa que comprende las etapas de:

- a) clonar en un plásmido de la invención, dos secuencias de ADN flanqueantes a la región del genoma bacteriano que se desee modificar, de manera que ambas secuencias queden contiguas en dirección 5'-3' o separadas por el fragmento de ADN que se desee sustituir o insertar en el genoma bacteriano;
- b) transformar el plásmido obtenido en la etapa a) en la bacteria cuyo genoma se desee modificar;
- c) seleccionar la cepa transformada en la etapa b) utilizando un medio de cultivo que comprende el compuesto que da lugar a una reacción que es indicativa de que la bacteria en la que se produce dicha reacción ha sido transformada con el plásmido de la etapa a) y a una temperatura que permita la replicación del plásmido y el crecimiento de las bacterias transformadas;

d) seleccionar la cepa que ha insertado en su genoma el plásmido con el que había sido transformada incubándola a una temperatura restrictiva en la cual el plásmido no es capaz de replicarse debido a su mecanismo de replicación termosensible;

e) incubar cepas obtenidas en la etapa d) en un medio que contiene el sustrato que resulta tóxico al actuar sobre el mismo la enzima de contra-selección codificada por el plásmido y del compuesto que da lugar a una reacción que es indicativa de la ausencia del plásmido en el interior de la bacteria, para seleccionar aquellas cepas en las que se haya producido la escisión y pérdida del plásmido.

En este procedimiento, no es necesaria la utilización de marcadores de selección y por tanto el número de modificaciones que se pueden realizar sobre la misma cepa es ilimitado. Es por ello que una realización preferida del procedimiento de la invención es un procedimiento en el que las etapas a) a e) se repiten secuencialmente más de una vez, introduciendo en cada ronda una modificación diferente en el genoma.

El procedimiento no necesita la incorporación de ninguna secuencia de ADN exógeno, por lo que se pueden construir modificaciones mínimas del genoma que conlleven la alteración de un nucleótido particular dentro del genoma de la bacteria. Igualmente, las modificaciones pueden ser de mayor amplitud y consistir en:

- Delección de un fragmento de ADN. En ese caso, las dos secuencias flanqueantes de la región del genoma bacteriano que se desee deleccionar estarán contiguas en el plásmido de la invención con el que se transforme la bacteria.

- Inserción de un fragmento de ADN en una localización concreta del cromosoma. En ese caso, las secuencias flanqueantes que se clonaran en un plásmido en la etapa a) del procedimiento de la invención, serán las secuencias adyacentes, a derecha e izquierda, a la localización concreta del genoma bacteriano en la que se desee insertar el fragmento de ADN, clonándose las secuencias de tal manera que dichas secuencias flanqueantes quedarán en el plásmido separadas por el fragmento de ADN que se quiere insertar:

- Intercambio de secuencias (sustitución de un fragmento del genoma bacteriano por un fragmento de ADN diferente en una localización concreta del cromosoma. En ese caso, las secuencias flanqueantes que se clonaran en un plásmido en la etapa a) del procedimiento de la invención, serán las secuencias adyacentes, a derecha e izquierda, a la localización concreta del genoma bacteriano en la que se desee intercambiar el fragmento de ADN, clonándose las secuencias de tal manera que dichas secuencias flanqueantes quedarán en el plásmido separadas por el fragmento de ADN que se quiere intercambiar). En ese caso, las dos secuencias flanqueantes de la región del genoma bacteriano que se desee sustituir por un fragmento de ADN diferente se clonarán, en el plásmido de la invención con el que posteriormente se transforme la bacteria, de manera que queden separadas por el fragmento de ADN con el que se desee sustituir la región del genoma bacteriano.

El procedimiento resulta sencillo y barato y permite construir cepas bacterianas con todas las modificaciones genéticas que se deseen, teniendo como única limitación el efecto negativo en la viabilidad de la bacteria que provoquen las mutaciones generadas.

Cuando la bacteria Gram negativa que se quiere mutagenizar es sensible a la transducción por fagos, el plásmido integrado en el genoma (etapa d) podrá ser transferido a otras cepas mediante el proceso de transferencia horizontal de ADN denominado transducción generalizada, que consiste en la transferencia de ADN entre bacterias a través de un fago vector. El fago transportará del cromosoma de la cepa donadora al cromosoma de la cepa receptora el fragmento de ADN que contiene integrado el plásmido evitando las etapas b) y c) necesarias para la integración del plásmido en la cepa receptora. Posteriormente se realizará la escisión del plásmido mediante el proceso descrito en la etapa e).

En el caso de *Salmonella*, de cada una de las cepas con el plásmido integrado se pueden preparar lisados con el fago P22 siguiendo el protocolo de Maloy *et al.* (Maloy *et al.*, 1996). En el caso de otras bacterias que se quiera mutagenizar, habrá que utilizar un protocolo análogo con el fago pertinente que sea susceptible de producir lisados en ellas.

Cuando la modificación del genoma se produce utilizando plásmidos que contienen, además del gen indicador y el gen de contra-selección, un gen marcador de selección, la fiabilidad de la selección de las bacterias transformadas con el plásmido es mayor. Por ello, son también realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que el plásmido de la etapa a) es un plásmido que adicionalmente contiene un gen de selección, la etapa c) de selección de la cepa transformada en la etapa b) se lleve a cabo utilizando un medio de cultivo que comprenda el compuesto de selección que elimine las bacterias no transformadas con el plásmido de la etapa a) y la etapa d) de selección de cepas que hayan insertado en su genoma el plásmido se lleve a cabo utilizando un medio de cultivo que comprende el mismo compuesto de selección. Se prefiere, como se ha comentado, que el gen marcador de selección sea un gen que confiera resistencia a un antibiótico. Cuando el plásmido de partida de la etapa a) sea el plásmido pKO3blue, que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol, las etapas c) y d) se llevarán a cabo en presencia de dicho antibiótico, cloranfenicol.

Independientemente de que se utilice o no la selección mediante antibióticos u otro gen de selección, si el plásmido utilizado es el plásmido pKO3blue u otro plásmido cualquiera que comprenda *lacZ* como gen indicador, la etapa c) se llevará a cabo creciendo las bacterias sobre una placa de cultivo, en presencia de X-Gal o añadiendo dicho compuesto una vez que han crecido las colonias, pues es el compuesto que da lugar a una reacción indicativa de que la bacteria en la que se produce color azul ha sido transformada con el plásmido de la etapa a). Esto permitirá seleccionar las bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido, pues serán aquellas que aparezcan de color azul tras la incubación con X-Gal. Igualmente, si el plásmido utilizando es pKO3blue u otro plásmido que contenga el origen de replicación termosensible derivado del plásmido pSC101 (es decir, su origen de replicación es el origen de replicación derivado del plásmido pSC101, que puede considerarse termosensible porque el plásmido contiene un gen que codifica una proteína termosensible esencial para la iniciación de la replicación, la proteína RepA termosensible), la etapa d) se llevará a cabo a 43°C o a una temperatura superior a la misma que no cause la muerte de la bacteria, mientras que la etapa a) se llevará a cabo a entre 25-35°C, preferiblemente a 28°-30°C. Por último, en lo que se refiere al gen de contra-selección, cuando el plásmido contenga el gen *sacB*, como es el caso del plásmido pKO3blue, la etapa e) se llevará a cabo en un medio de cultivo que contenga sacarosa, de manera que sobrevivan las bacterias en las que se haya producido la escisión y pérdida del plásmido, que serán aquellas resistentes a la presencia de sacarosa.

Adicionalmente, es conveniente incorporar una etapa en la que se comprueba que el genoma contiene la modificación deseada. Por ello, se prefieren aquellas realizaciones del método de la invención que incorporan una etapa adicional f) en la que se comprueba, mediante amplificación de las secuencias y análisis de los productos obtenidos mediante un método de análisis de secuencias (como puede ser la propia secuenciación o, donde sea aplicable, un método de comprobación del tamaño de los productos de PCR obtenidos como puede ser una electroforesis) que el genoma contiene la modificación deseada. En el caso de producirse deleciones o inserciones de tamaño fácilmente detectable por electroforesis, como puede ser la que se refiera a fragmentos mayores de 500 pares de bases, la simple electroforesis de los productos de PCR en presencia de marcadores de tamaño puede ser suficientemente indicativa de que se ha producido la deleción o la inserción deseada; en el caso de sustituciones puntuales o de intercambio de secuencias de similar tamaño, es preferible recurrir a métodos como la secuenciación para comprobar que se ha producido la modificación deseada.

Como se ha comentado, las modificaciones pueden consistir en deleciones, inserciones o sustituciones. El fragmento o fragmentos de ADN a insertar en el plásmido de la invención en la etapa a) se diseñarán y obtendrán teniendo en cuenta la modificación que se desee realizar en el genoma bacteriano y la localización del genoma en la que se desee producir dicha modificación. En cualquier caso, para que pueda producirse el evento de recombinación, el fragmento de ADN que se desee modificar en el genoma deberá clonarse en el plásmido acompañado por las secuencias flanqueantes a la región del genoma donde se va a introducir la modificación. Si se desea producir una deleción, por ejemplo, lo más práctico es amplificar las secuencias que flanqueen el fragmento del genoma que se desee eliminar del cromosoma bacteriano, diseñando parejas de cebadores adecuadas para ello, y clonar ambas secuencias flanqueantes, una junto a otra, en el plásmido. Utilizando un plásmido así diseñado, cuando se produzca el evento de recombinación y la posterior escisión del plásmido, la escisión podrá producirse de manera que se recupere la secuencia salvaje o de manera que se elimine la secuencia comprendida entre las dos secuencias flanqueantes, siendo necesario un proceso de selección para identificar la cepa deseada. De manera similar puede producirse la sustitución de una secuencia por otra, clonando en el plásmido la secuencia por la que se quiere intercambiar el gen diana, flanqueada por dos secuencias homólogas a las regiones que flanquean al gen diana que se va a sustituir. Para la inserción en el genoma de un fragmento de ADN, dicho fragmento será clonado en el plásmido flanqueado por dos fragmentos de secuencia que estén adyacentes al punto de inserción en el genoma bacteriano: La Fig. 5 muestra un ejemplo de amplificación y clonaje de las secuencias flanqueantes al gen diana en el plásmido pKO3blue, útil para producir la deleción del gen situado en el genoma entre ambas secuencias flanqueantes, las comprendidas entre las parejas de cebadores A/B y C/D. Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción dependerán de cada experimento, así como la posición de los oligonucleótidos con respecto a la modificación que se desea introducir. En el caso de querer sustituir una secuencia del genoma por otra secuencia cualquiera, se podría clonar esa secuencia cualquiera entre las dos secuencias ya clonadas en el plásmido que son flanqueantes a la región del genoma que se quiere sustituir. En el caso de querer insertar una secuencia cualquiera de ADN en el genoma, esa secuencia cualquiera se podría donar entre las dos secuencias ya clonadas en el plásmido que son flanqueantes a la región del genoma en la que se quiere insertar esa secuencia.

Por todo ello, se prefieren las realizaciones del procedimiento de la presente invención que comprenden las etapas previas a cada ronda de modificación de:

- a) amplificar los fragmentos adyacentes a la región del cromosoma que se desea modificar;
- b) insertar ambas secuencias flanqueantes en un plásmido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 de forma que queden contiguas en dirección 5'-3' si se desea realizar una deleción o separadas por el fragmento de ADN que se desee sustituir o insertar en el genoma bacteriano.

Se prefiere que el tamaño de cada uno de los fragmentos adyacentes amplificados sea de al menos 500 nucleótidos, porque la recombinación homóloga es óptima con fragmentos de este tamaño o superiores. No es aconsejable utilizar fragmentos de ADN de un tamaño inferior a 250 nucleótidos, porque disminuye la eficiencia de la integración del plásmido por recombinación homóloga.

Independientemente del método que se utilice para su obtención y la modificación que se pretenda realizar, la transformación de la bacteria con el plásmido podrá realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Se prefieren especialmente la electroporación o el choque térmico.

Aprovechando el procedimiento de la invención, que permite realizar modificaciones múltiples en el genoma de bacterias Gram negativas, los inventores han construido dos cepas de *S. Enteritidis* en las que se han delecionado los 12 genes que codifican las proteínas GGDEF que posee esta bacteria. A la bacteria obtenida se le ha denominado, de forma genérica, mutante Δ XII; los mutantes específicos obtenidos han recibido las denominaciones Δ XII::Km y Δ XII::Clo. La cepa mutante Δ XII es incapaz de sintetizar c-di-GMP (Fig. 7) y, por tanto, toda la cascada de señalización que depende de este transmisor secundario de señal está ausente en esta bacteria. El mutante Δ XII es completamente avirulento (Fig. 8A), pero es capaz de atravesar la barrera epitelial e invadir los órganos (Fig. 8B y 8C) por lo que es un excelente candidato para el desarrollo de vacunas atenuadas para la inmunización frente a infecciones por *Salmonella* spp o como vector de expresión de antígenos de cualquier organismo (xenoantígenos, incluidos alérgenos y fármacos), con fines inmunoprolácticos o inmunoterapéuticos y terapéuticos. Por todo ello, otro objeto adicional de la invención lo constituyen las cepas mutantes de *Salmonella* spp. en la que se han delecionado todos los genes que codifican las proteínas GGDEF. En particular, es una realización preferida de dichos mutantes de la invención aquella en la que la cepa mutante es una cepa mutante de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en la que se han delecionado los doce genes que codifican proteínas GGDEF y, particularmente, los casos específicos de mutante Δ XII cuya obtención se describe posteriormente en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, obtenidos a partir del aislado clínico 3934: los mutantes Δ XII::Km y Δ XII::Clo.

A partir de estas cepas Δ XII::Km y Δ XII::Clo y de cepas intermedias utilizadas para su construcción, los inventores han construido dos cepas derivadas, cada una de las cuales produce una única proteína GGDEF, mediante reinserción del gen correspondiente. En estas dos cepas, la síntesis de c-di-GMP depende de una única proteína GGDEF. Estas cepas tienen un enorme valor para la búsqueda de moléculas químicas que interfieran o bloqueen el metabolismo del c-di-GMP, afectando a su viabilidad, virulencia, capacidad de formación de biofilm, supervivencia en el medio ambiente. Dado que el c-di-GMP se encuentra exclusivamente en bacterias, cualquier gen implicado en su síntesis / degradación representa una diana potencial para el desarrollo de una nueva familia de antimicrobianos. Así, constituyen otro objeto de la invención las cepas de *Salmonella* spp. en cuyo genoma está presente únicamente un gen funcional que codifica proteínas GGDEF, así como las cepas intermedias útiles para su obtención, es decir las cepas mutantes de *Salmonella* spp. en las que se ha delecionado al menos uno de los genes que codifica para proteínas GGDEF utilizando el procedimiento de la invención. De entre ellas, se prefieren las cepas derivadas del serotipo Enteritidis de *Salmonella enterica* (*S. Enteritidis*). En el caso de los mutantes que poseen un único gen funcional que expresa una proteína GGDEF, pueden obtenerse a partir de una cepa mutante Δ XII (Δ XII::Km o Δ XII::Clo) reinsertando en ellas el gen de interés previamente delecionado o a partir de alguna de las cepas intermedias utilizadas para obtener dichas cepas mutantes Δ XII, como pueden ser las cepas Δ I, Δ II, Δ III, Δ IV, Δ V, Δ VI, Δ VII, Δ VIII, Δ IX, Δ X ó Δ XI que se describen más adelante en los Ejemplos de la presente memoria. (Como gen funcional se entiende el gen que es capaz de expresar la proteína codificada en su secuencia y que es capaz de ejercer la función reconocida para dicha proteína en las mismas condiciones en las que lo haría en una cepa de *Salmonella* tipo silvestre).

También es un objeto de la presente invención el uso de cualquiera de estas cepas para el desarrollo de vacunas o para la fabricación de medicamentos destinados a ser utilizados como vacunas. En conexión con el uso anterior, es otro objeto de la presente invención el uso de dichas cepas como vectores de expresión de antígenos de cualquier organismo (xenoantígenos), que pueden ser de otras cepas bacterianas o de otros organismos. También es objeto de la presente invención el uso de dichas cepas como vectores de expresión de fármacos.

Por su gran utilidad en este campo, es un objeto más de la presente invención el uso de dichas cepas mutantes de *Salmonella* para el estudio del metabolismo del c-di-GMP, con particular preferencia por aquellas cepas que expresan una única proteína GGDEF funcional. En particular, constituye un uso específico del anterior el uso para la identificación y desarrollo de sustancias químicas que bloqueen la síntesis de c-di-GMP. Finalmente, otros usos de las cepas mutantes de la invención que constituyen objetos de la invención son el uso para el estudio de los mecanismos de formación y bloqueo de la formación de biofilms y/o de la relación de los biofilms con la virulencia.

La presente invención se explicará con mayor detalle mediante las figuras y ejemplos que aparecen a continuación. En ellos se describe la construcción de una realización preferida de los plásmidos de la invención, el plásmido pKO3blue. El mismo se utilizó para poner en práctica el procedimiento de modificación de la invención, en primer lugar, para conseguir dos mutantes deficientes en los 12 genes que codifican proteínas GGDEF (Δ XII::Km y Δ XII::Clo) para, posteriormente, reintroducir en Δ XII::Km, de forma independiente, los genes previamente delecionados.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la estructura del c-di-GMP.

La Fig. 2 muestra, en la parte (A), la lista de genes que codifican proteínas con dominio GGDEF en el genoma de *S. Enterica*. En la tabla se indica, en la primera columna, el número de la ORF (*Open Reading Frame*: Marco Abierto de Lectura) en el genoma de *S. Typhimurium* LT2, el nombre asignado a dicho gen (segunda columna), el nombre de la proteína (tercera columna), el número de hélices transmembrana (cuarta columna), se representa esquemáticamente la organización de dominios conocidos en estas proteínas (quinta columna) y se indica la conservación del motivo

GGDEF en cada una de ellas. La parte (B) muestra la posición en kilobases de los 12 genes que codifican proteínas con dominio GGDEF en el genoma de *S. Typhimurium* LT2.

La Fig. 3 muestra el mapa de los plásmidos pKO3 (plásmido de la parte superior izquierda), pMAD (plásmido de la parte superior derecha) y pKO3blue (plásmido de la parte inferior). Las etiquetas subrayadas junto a las líneas indican las posiciones de las enzimas de restricción utilizadas para introducir el gen de la β -galactosidasa que contiene el plásmido pMAD en el plásmido pKO3. Las leyendas situadas sobre los plásmidos corresponden a: *repA*: un gen que codifica una proteína termosensible esencial para la iniciación de la replicación del plásmido convirtiendo el origen de replicación (pSC101-ts: origen de replicación termosensible derivado del plásmido pSC101) en termosensible; *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol; *β -gal*: gen *lacZ* que expresa la β -galactosidasa; *sacB*: gen que confiere sensibilidad a la presencia de sacarosa.

La Fig. 4 muestra el proceso de intercambio alélico mediante doble recombinación utilizado para introducir la modificación del genoma de la bacteria Gram negativa que se desea modificar. Para ello, en una primera recombinación homóloga, el plásmido pKO3blue se inserta en el genoma de la bacteria Gram negativa (1ª recombinación) y, posteriormente se escinde (2ª recombinación) para generar la cepa salvaje original o la cepa recombinante que contiene la modificación deseada. El crecimiento en presencia del compuesto de contra-selección, a la temperatura permisiva, permite identificar las bacterias que contienen la modificación deseada: (WT: cepa recombinante idéntica a la cepa silvestre original; MS: cepa mutante que contiene la modificación deseada).

La Fig. 5 muestra un ejemplo del diseño experimental utilizado para preparar la modificación que se desea introducir en el genoma de la bacteria y su clonaje en el plásmido pKO3blue. Las regiones flanqueantes al gen que se desea deletar se amplifican mediante PCR utilizando los oligonucleótidos A, B, C y D. Los fragmentos amplificados se digieren con enzimas de restricción cuya secuencia se ha introducido en la secuencia de los oligonucleótidos B y C (*XhoI*) y se clonan en el plásmido pKO3blue utilizando las enzimas que digieren en los oligonucleótidos A (*NotI*) y D (*BglII*).

La Fig. 6 (A) muestra la capacidad de formación de biofilm del mutante Δ XII::Km (parte derecha de las fotografías, encabezada por " Δ XII") frente a la de la cepa parental (parte izquierda de las fotografías, encabezada por "*S. Enteritidis* 3934"). En el medio rico Luria Bertani (LB) (foto superior) la cepa parental forma un biofilm a modo de película en la interfase medio-aire tras 72 horas de incubación a temperatura ambiente y en condiciones estáticas. La cepa parental también es capaz de formar un biofilm a modo de anillo adherido al vidrio en el medio deficiente en nutrientes denominado ATM (foto inferior de la parte A) en el que la bacteria es incapaz de multiplicarse y en el que se inocula una densidad óptica de 0,4 medida a 590 nm y se incuba durante 4 horas a 37°C con una fuerte agitación. Como se puede observar el mutante Δ XII::Km fue incapaz de formar biofilm en ambos medios. La parte (B) muestra la capacidad del mutante Δ XII::Km para sintetizar celulosa puesta de manifiesto en placas de calcofluor. Tanto la cepa parental como el Δ XII::Km se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente en una placa de LB a la que se añadió calcofluor (200 μ g ml⁻¹). El calcofluor es un fluorocromo capaz de unirse a los enlaces β -glucosídicos presentes en la celulosa, uno de los componentes de la matriz exopolisacáridica que conforma el biofilm de *Salmonella*, de tal forma que las colonias de las cepas capaces de producir celulosa se observan fluorescentes al observarlas bajo luz UV de 360 nm. A diferencia de la cepa parental el Δ XII::Km fue incapaz de producir celulosa. La parte (C) muestra la capacidad del mutante Δ XII::Km para sintetizar celulosa y fimbrias de tipo curli al visualizar la morfología colonial en placas con Rojo Congo. Tanto la cepa parental como el Δ XII::Km se incubaron durante 48 h a 28°C en placas de LB sin sal suplementadas con Rojo Congo (40 μ g ml⁻¹) y Coomassie Brilliant Blue (20 μ g ml⁻¹) y se analizó la morfología colonial. Se han establecido varios morfotipos coloniales en este medio en función de la capacidad de producir celulosa y fimbrias tipo curli, ambos componentes esenciales del biofilm en *Salmonella*. Cuando la cepa es capaz de sintetizar celulosa y fimbrias tipo curli las colonias se observan rojas y rugosas (morfotipo rdar: *red, dry and rough*, roja, seca y rugosa), si la cepa no es capaz de sintetizar celulosa pero si fimbria tipo curli el morfotipo es bdar (*brown, dry and rough*, marrón, seca y rugosa), si la cepa es incapaz de sintetizar fimbrias tipo curli pero si es capaz de producir celulosa el morfotipo es pdar (*pink, dry and rough*, rosa, seca y rugosa) y por último si la cepa es incapaz de sintetizar tanto celulosa como fimbrias tipo curli el morfotipo es saw (*smooth and white*, lisa y blanca). El mutante Δ XII::Km presentó una morfotipo saw frente al morfotipo rdar de la cepa parental lo que puso de manifiesto la incapacidad del Δ XII::Km para producir celulosa y fimbrias tipo curli. La parte (D) y (E) muestran el análisis de la movilidad en el mutante Δ XII::Km. *Salmonella* es capaz de desplazarse sobre la superficie de un medio sólido (swarming) (parte D). Para estudiar esta capacidad se inoculó 5 μ l de un cultivo ON a 37°C de la cepa parental y del mutante Δ XII::Km en una placa de LB con 0,5% de agar y 0,5% de glucosa y se incubó ON a temperatura ambiente. A diferencia de la cepa parental el mutante Δ XII::Km no fue capaz de desplazarse sobre la superficie. *Salmonella* también es capaz de nadar en el interior de un medio semisólido (swimming) (parte E). Para estudiar esta capacidad se inoculó 5 μ l de un cultivo ON a 37°C de la cepa parental y del mutante Δ XII::Km en una placa de LB con 0,3% de agar y se incubó ON a temperatura ambiente. A diferencia de la cepa parental el mutante Δ XII::Km no fue capaz de desplazarse en el interior del medio.

La Fig. 7 muestra los niveles de c-di-GMP mediante HPLC en la cepa silvestre (*S. Enteritidis* 3934) (gráficos superiores) y el mutante Δ XII::Km (gráficos inferiores). Los gráficos de la parte derecha corresponden a muestras en las que se inyectó c-di-GMP para comprobar la localización del pico correspondiente a este compuesto. Se observa que la cepa salvaje acumula una cantidad de c-di-GMP de 1,46 pmoles/mg después de 24 horas de incubación en placas de LB sin sal a 28°C. Nótese que los niveles de c-di-GMP en el Δ XII::Km no son detectables. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes.

La Fig. 8 muestra el estudio de la virulencia de la bacteria mutante $\Delta XII::Km$. La parte (A) muestra el estudio de supervivencia. Se indica en ordenadas el porcentaje de ratones BALB/c, infectados por vía oral con 10^9 ufc (unidades formadoras de colonia) de la cepa silvestre 3934 (círculos sin relleno, o) o de la cepa mutante $\Delta XII::Km$ (cuadrados rellenos, ■) que sobreviven tras el número de días post-infección que se indica en abscisas. Nótese que todos los ratones infectados con la cepa salvaje mueren antes del día 12 post-infección, mientras que ninguno de los ratones infectados por la cepa $\Delta XII::Km$ muere. La parte (B) muestra el ensayo de asa intestinal, en el que se indica el logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonia que se detectan por asa (log ugcs/asa) tras realizar a tres ratones un ligamiento de un fragmento de intestino delgado que contenga una o varias placas de Peyer, inocular una cantidad de 10^7 ufc, incubar durante 90 minutos, sacrificar al animal, cortar el trozo de intestino comprendido entre las dos ligaduras, y analizar la cantidad de bacterias que han sido capaces de atravesar la barrera intestinal y colonizar las células del epitelio: la barra sin relleno corresponde a la cepa silvestre 3934 (WT), mientras que la barra con relleno oscuro corresponde a la cepa mutante $\Delta XII::Km$ (ΔXII). La parte (C) muestra un gráfico correspondiente al ensayo de colonización de órganos, en el que se muestra en ordenadas el logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonia que se detectan por órgano (log ufc/s/órgano) tras inocular oralmente 5 ratones BALB/c con una dosis subletal de 10^4 ufc y sacrificar los animales tras 5 días de infección y cuantificar la cantidad de ufc en bazo (primer par de barras) e hígado (segundo par de barras). Como en el caso anterior, la barra sin relleno corresponde a la cepa silvestre 3934 (WT), mientras que la barra con relleno oscuro corresponde a la cepa mutante $\Delta XII::Km$ (ΔXII).

La Fig. 9 muestra una esquematización del genoma de la cepa mutante *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm4551$ en la que el gen *csgA* se ha sustituido por un gen indicador para realizar ensayos de identificación de sustancias que inhiban la síntesis de c-di-GMP mediante la medida de la actividad enzimática de dicho gen indicador en presencia de la sustancia química de ensayo. Los genes tachados son los genes delecionados en dicha cepa.

La Fig. 10 muestra los Southern Blot realizados para comprobar la deleción de dos de los genes GGDEF (los genes *stm1987* y *stm3388*) en el mutante $\Delta XII::Km$. En la primera calle se corrió DNA de la cepa parental en la que se observar una banda correspondiente a la hibridación de la sonda con el gen *stm1987* (fotografía izquierda) y el gen *stm3388* (fotografía derecha) respectivamente. La segunda calle se corresponde al mutante $\Delta XII::Km$, en el que se ha delecionado el gen con el que hibrida la sonda utilizada, por lo que las sondas no son capaces de hibridar y por ultimo la tercera calle corresponde a las cepas $\Delta XII+stm1987$ y $\Delta XII+stm3388$ respectivamente, en las que se demuestra que se ha resturado la presencia de estos genes en el genoma de estas cepas. Los mismos resultados se observaron en los Southern Blot que se realizaron para cada uno de los 12 genes GGDEF.

Ejemplos

Los presentes ejemplos muestran la construcción del plásmido pKO3blue y el uso del mismo, en conjunción con el procedimiento de la invención, para realizar modificaciones en el genoma de una bacteria Gram negativa, concretamente, para la obtención de las cepas de *S. Enteritidis*.

Ejemplo 1

Construcción del plásmido pKO3blue

El plásmido se construyó clonando un gen que codifica la (β -galactosidasa en un plásmido que posee un origen de replicación termosensible (véase la Fig. 3). En este caso, se ha clonado el gen de la β -galactosidasa de *Bacillus stearothermophilus* obtenido desde el plásmido pMAD en el plásmido pKO3 (Link *et al.*, 1997). Para ello, el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004), que contiene la secuencia que codifica la β -galactosidasa bajo el promotor p_{clpB}, se digirió con BamHI/StuI y se clonó el gen de la β -galactosidasa entre los sitios de restricción BamHI/SmaI del plásmido pKO3.

Para facilitar la amplificación de este plásmido, se transformó mediante electroporación la cepa de *E. coli* XL1 Blue con el plásmido recombinante obtenido, obteniéndose la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue pKO3blue, que se depositó en la Colección Española de Cultivo Tipo, otorgándosele el número de acceso CECT 7241, según se refleja en el apartado de "Depósito de Microorganismos".

Cualquier otro plásmido conteniendo un origen de replicación termosensible y otro gen indicador podría servir para la misma finalidad.

Ejemplo 2

Obtención del plásmido recombinante con el que se transforman las bacterias

Para obtener el plásmido con el que transformar las bacterias, se procedió al clonaje en el plásmido resultante, pKO3blue, de dos fragmentos de ADN de aproximadamente 500 nucleótidos cuya secuencia correspondía, en cada caso, a las zonas adyacentes a la región del cromosoma que se desea modificar (véase la Fig. 5). Estos fragmentos se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizando las parejas de nucleótidos NB y C/D aplicables en cada caso según el gen que se deseaba delecionar. A y B forman una pareja de cebadores que permiten la amplificación de una de las regiones flanqueantes del gen que se desea eliminar, mientras que C y D forman una segunda pareja de cebadores que permiten la amplificación de la región flanqueante situada en el extremo contrario del gen que se desea delecionar.

ES 2 324 084 A1

La amplificación se realizará de forma que al fusionar ambos fragmentos en el plásmido se producirá la modificación que se desea introducir en el cromosoma de la bacteria: sustitución, delección o inserción de una secuencia. En el caso de la construcción del mutante $\Delta XII::Km$ y del mutante $\Delta XII::Clo$, todas las modificaciones deseadas consistieron en delección de genes, concretamente, los de la familia GGDEF. Así, la modificación deseada en cada una de las 12 rondas de modificación efectuadas fue la delección del fragmento de secuencia situado en el genoma entre las regiones flanqueantes AB y CD. Cada uno de los genes GGDEF fue delecionado completamente desde el codón de inicio de la traducción (ATG o GTG) hasta el codón de parada de la traducción y 6 nucleótidos de la secuencia por delante del codón de inicio y por detrás del codón de parada también fueron delecionados y sustituidos por la secuencia de una diana XhoI (incorporada en los oligos B y C correspondientes). El gen *yeaJ* se delecionó mediante recombinación con un fragmento lineal de ADN introduciendo un cassette de resistencia a un antibiótico mediante el método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Por un lado un fragmento del gen *yeaJ* fue delecionado por la inserción de un cassette de Kanamicina obteniéndose el mutante $\Delta XII::Km$ y por otro lado el gen *yeaJ* fue delecionado completamente desde el codón de inicio hasta el codón de parada introduciendo un cassette de resistencia a Cloranfenicol obteniéndose el mutante $\Delta XII::Clo$.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la amplificación de los fragmentos en cada uno de los genes delecionados, y los oligonucleótidos empleados para mutar el gen *yeaJ* mediante el método de Datsenko & Wanner se muestran a continuación en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligonucleótidos utilizados para realizar la delección de cada uno de los genes que codifican las proteínas GGDEF de S. Enteritidis

Id Genoma/ Tamaño del gen (nt)	Nombre Gen	Oligonucleótidos	Puntos de apareamiento de los oligonucleótidos (nt)*	Tamaño de los fragmentos amplificados (nt)
STM0385 1113 nt	<i>adrA</i>	A: 01-A (SEQ ID NO:1) B: 01-B (SEQ ID NO:2) C: 01-C (SEQ ID NO:3) D: 01-D (SEQ ID NO:4)	-610 -6 +6 +499	AB: 618 CD: 505
STM1283 1494 nt	<i>yeaJ</i>	A: YeaJ-Km Fw (SEQ ID NO:7) B: YeaJ-Km Rv (SEQ ID NO:8) C: 02 Clo-Fw (SEQ ID NO:9) D: 02 Clo-Rv (SEQ ID NO:10)	1000 1494 1 1494	
STM1703 1983 nt	<i>yciR</i>	A: 03-A (SEQ ID NO:13) B: 03-B (SEQ ID NO:14) C: 03-C (SEQ ID NO:15) D: 03-D (SEQ ID NO:16)	-620 -6 +6 +477	AB: 628 CD: 483
STM1987 1713 nt		A: 04-A (SEQ ID NO:19) B: 04-B (SEQ ID NO:20) C: 04-C (SEQ ID NO:21) D: 04-D (SEQ ID NO:22)	-608 -6 +6 +507	AB: 616 CD: 513
STM2123 2991 nt	<i>yegE</i>	A: 05-A (SEQ ID NO:25) B: 05-B (SEQ ID NO:26) C: 05-C (SEQ ID NO:27) D: 05-D (SEQ ID NO:28)	-610 -6 +6 +498	AB: 618 CD: 504
STM2410 2190 nt	<i>yfeA</i>	A: 06-A (SEQ ID NO:31) B: 06-B (SEQ ID NO:32) C: 06-C (SEQ ID NO:33) D: 06-D (SEQ ID NO:34)	-625 -6 +6 +466	AB: 633 CD: 472

Id Genoma/ Tamaño del gen (nt)	Nombre Gen	Oligonucleótidos	Puntos de apareamiento de los oligonucleótidos (nt)*	Tamaño de los fragmentos amplificados (nt)
STM2672 1221 nt	<i>yfiN</i>	A: 07-A (SEQ ID NO:39) B: 07-B (SEQ ID NO:40) C: 07-C (SEQ ID NO:41) D: 07-D (SEQ ID NO:42)	-598 -6 +6 +488	AB: 606 CD: 494
STM3375 1941 nt	<i>yhdA</i>	A: 08-A (SEQ ID NO:45) B: 08-B (SEQ ID NO:46) C: 08-C (SEQ ID NO:47) D: 08-D (SEQ ID NO:48)	-603 -6 +6 +516	AB: 611 CD: 522
STM3388 2100 nt		A: 09-A (SEQ ID NO:51) B: 09-B (SEQ ID NO:52) C: 09-C (SEQ ID NO:53) D: 09-D (SEQ ID NO:54)	-609 -6 +6 +508	AB: 617 CD: 516
STM3615 1974 nt	<i>yhjK</i>	A: 10-A (SEQ ID NO:57) B: 10-B (SEQ ID NO:58) C: 10-C (SEQ ID NO:59) D: 10-D (SEQ ID NO:60)	-607 -6 +6 +496	AB: 615 CD: 502
STM4551 1065 nt		A: 11-A (SEQ ID NO:63) B: 11-B (SEQ ID NO:64) C: 11-C (SEQ ID NO:65) D: 11-D (SEQ ID NO:66)	-617 -6 +6 +553	AB: 625 CD: 561
STM2503 2214 nt		A: 12-A (SEQ ID NO:69) B: 12-B (SEQ ID NO:70) C: 12-C (SEQ ID NO:71) D: 12-D (SEQ ID NO:72)	-610 -6 +6 +506	AB: 618 CD: 512

*El número hace referencia a la localización del primer nucleótido del extremo 5' del oligonucleótido. El signo negativo significa que la secuencia de apareamiento del oligonucleótido está por delante del codon de iniciación y el signo positivo que está por detrás del codon de parada. Si no presenta signo indica que la secuencia de apareamiento del oligonucleótido está en la región codificante considerándose 1 el primer nucleótido del codon de inicio de la región codificante del gen.

Las condiciones de las reacciones de PCR para amplificar las regiones AB y CD y para comprobar el clonaje de los fragmentos AB y CD en el plásmido pGEMt-easy fueron las siguientes:

30
ciclos { Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C
Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: 45 segundos a 72 °C
Extensión final: 10 minutos a 72 °C

ES 2 324 084 A1

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR utilizando las correspondientes parejas de oligonucleótidos A/B y C/D se clonaron en el plásmido pGEMt-easy. El plásmido que contenía el producto de amplificación obtenido con los oligonucleótidos NB se digirió con las enzimas de restricción NotI-XhoI y el plásmido conteniendo el producto de amplificación obtenido con los oligonucleótidos C/D se digirió con las enzimas de restricción XhoI-BglII. Los productos de la digestión se resolvieron en geles de agarosa y los fragmentos AB y CD se purificaron desde un gel de agarosa utilizando un kit comercial.

Los fragmentos purificados se ligaron simultáneamente con el plásmido pKO3blue digerido con las enzimas NotI-BglII y se transformó mediante electroporación la cepa de *E. coli* XL1Blue con el plásmido recombinante obtenido.

Los transformantes obtenidos se analizan mediante PCR utilizando como cebadores la pareja formada por A y D y las siguientes condiciones:

30 ciclos {
Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C
Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: 90 segundos a 72 °C
Extensión final: 10 minutos a 72 °C

Posteriormente se purificó el plásmido de un clon positivo.

Ejemplo 3

Utilización del procedimiento de modificación cromosómica para la delección de genes que codifican proteínas con dominio GGDEF en el genoma de S. Enteritidis 3934

El plásmido pKO3blue obtenido en el Ejemplo 2 conteniendo los fragmentos AB y CD se introdujo mediante electroporación en la cepa *S. Enteritidis* 3934 (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7236) y las bacterias electroporadas se incubaron durante 4 h a 28°C en medio líquido, después se sembraron en placas con un medio de cultivo conteniendo cloranfenicol (20 µg/ml), y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) (40 µg/ml) y se incubaron a 28°C durante 72 h. La cepa de *S. Enteritidis* transformada se seleccionó como una colonia azul (véase la Fig. 4).

Una vez seleccionada, la cepa se inoculó en medio líquido precalentado a 43°C conteniendo cloranfenicol (20 µg/ml) y se incubó a 43°C durante 48 h para permitir la integración del plásmido en el cromosoma de la bacteria por un proceso de recombinación homóloga (Recombinación tipo Campbell). Dado que el plásmido tiene un origen de replicación termosensible, no es capaz de replicarse a 43°C y sólo podrán crecer en presencia de cloranfenicol a 43°C, aquellas bacterias que integren el plásmido en el cromosoma. 75 µl del cultivo se plaquearon mediante agotamiento por estrías en una placa precalentada a 43°C que contenía un medio de cultivo con cloranfenicol (20 µg/ml) y X-gal (40 µg/ml) y se incubó a 43°C durante 48 horas. Tras la incubación, se seleccionaron de seis a nueve colonias (según el gen) en las cuales el plásmido estaba posiblemente integrado (colonias azules) y se replicaron en placas precalentadas a 43°C que contenían un medio de cultivo con cloranfenicol (20 µg/ml) y X-gal (40 µg/ml) y se incubó a 43°C durante 48 horas. Las colonias que habían incorporado el plásmido en el genoma mostraban color azul debido a la expresión constitutiva del gen de la β-galactosidasa. La integración del plásmido fue comprobada por PCR utilizando los oligos A y F (vease Fig. 5), y utilizando las siguientes condiciones de PCR para amplificar la region cromosómica comprendida entre los oligos A y F:

30 ciclos {
Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C
Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: de 2 minutos y medio a 3 minutos y medio a 72 °C
(Dependiendo de la proteína a analizar)
Extensión final: 10 minutos a 72 °C

ES 2 324 084 A1

Se seleccionaron aquellas que no presentaban amplificación y que por lo tanto llevaban el plásmido integrado. Las cepas con el plásmido integrado se guardaron en glicerol a -80°C.

A partir de dos integrados (colonias azules) se comenzó el proceso de escisión, incubándolos en medio líquido sin antibiótico a 28°C durante 24 horas. En esta etapa, como consecuencia de un segundo proceso de recombinación, en un porcentaje de la población se producirá la escisión del plásmido perdiéndose la resistencia a cloranfenicol y la actividad β -galactosidasa. Se sembraron diluciones del cultivo en placas de cultivo conteniendo X-gal y sacarosa (5%), y las placas se incubaron 24 horas a 28°C.

Una serie de colonias blancas (por ejemplo 24) se seleccionaron y se repicaron en placas de cultivo con cloranfenicol (20 μ g/ml) y en placas de cultivo conteniendo X-gal y sacarosa (5%). Se seleccionaron las colonias cloranfenicol sensibles y de estas colonias se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos E y F (véase la Fig. 5) y se utilizaron las siguientes condiciones en las reacciones de PCR:

30 ciclos {
Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C
Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: de 2 minutos y medio a 4 minutos y medio a 72 °C
(Dependiendo de la proteína a analizar)
Extensión final: 10 minutos a 72 °C

El tamaño del fragmento obtenido en la amplificación permite identificar aquellas colonias que han incorporado en el cromosoma la mutación deseada (dibujo situado en la parte inferior derecha en la Fig. 4) y descartar aquellas colonias en las que tras la segunda recombinación recuperan la copia salvaje del gen (dibujo situado en la parte inferior izquierda en la Fig. 4). El producto de la PCR se digiere con la enzima XhoI y además se secuenciar para garantizar su especificidad.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 324 084 A1

Los oligonucleótidos E y F utilizados para cada gen deleciónado y el tamaño de los fragmentos amplificados por ellos se muestran en la Tabla 2:

TABLA 2

Oligonucleótidos E y F utilizados para comprobar el estado de los genes GGDEF en los mutantes intermedios con deleciones en dichos genes y en los mutantes $\Delta XII::Km$ y $\Delta XII::Clo$

Genoma ID	Nombre del gen	Oligonucleótidos E F	Tamaño del producto de la PCR: Cepa salvaje/ mutante XII	Tamaño de los productos de la digestión del producto de PCR del mutante XII con la enzima XhoI
STM0385	<i>adrA</i>	01-E (SEQ ID NO:5) 01-F (SEQ ID NO:6)	2427 pb/1310 pb	745 pb/565 pb
STM1283	<i>yeaJ</i>	yeaJ Fw (SEQ ID NO:11),	2379 pb/3338 pb (Km)	/
		yeaJ Rv (SEQ ID NO:12)	2379 pb/1899pb (Clo)	/
STM1703	<i>yciR</i>	03-E (SEQ ID NO:17) 03-F (SEQ ID NO:18)	3375 pb/1386 pb	711 pb/675 pb
STM1987		04-E (SEQ ID NO:23) 04-F (SEQ ID NO:24)	2998 pb/1279 pb	716 pb/563 pb
STM2123	<i>yegE</i>	05-E (SEQ ID NO:29) 05-F (SEQ ID NO:30)	4317 pb/1320 pb	722 pb/598 pb
STM2410	<i>yfeA</i>	06-E (SEQ ID NO:35) 06-F (SEQ ID NO:36)	3520 pb/1324 pb	715 pb/609 pb
STM2672	<i>yfiN</i>	07-E (SEQ ID NO:43) 07-F (SEQ ID NO:44)	2602 pb/1375 pb	717 pb/658 pb
STM3375	<i>yhdA</i>	08-E (SEQ ID NO:49) 08-F (SEQ ID NO:50)	3281 pb/1334 pb	717 pb/617 pb
STM3388		09-E (SEQ ID NO:55) 09-F (SEQ ID NO:56)	3448 pb/1342 pb	730 pb/612 pb
STM3615	<i>yhjK</i>	10-E (SEQ ID NO:61) 10-F (SEQ ID NO:62)	3378 pb/1398 pb	709 pb/689 pb
STM4551		11-E (SEQ ID NO:67) 11-F (SEQ ID NO:68)	2468 pb/1398 pb	717 pb/681 pb
STM2503		12-E (SEQ ID NO:73) 12-F (SEQ ID NO:74)	3519 pb/1300 pb	717 pb/583 pb

Una vez confirmada la modificación introducida en el cromosoma de la cepa por PCR, digestión del producto de PCR y secuenciación del producto de PCR, el proceso se puede repetir tantas veces como se desee. Para realizar modificaciones sobre genes cuya alteración puede afectar la termosensibilidad de la bacteria huésped, se podrán modificar las temperaturas para cada una de las etapas.

Este procedimiento fue seguido, en primer lugar, para producir una delección en el gen *adrA* (*stm0385*). Posteriormente se fueron produciendo delecciones en los genes *stm1987*, *yciR*, *yegE*, *yfiN*, *yhdA*, *stm3388*, *yhjK*, *stm4551*, *yfeA* y *stm2503*. De esta manera se generó una colección de mutantes individuales en los que se provocaron delecciones en cada una de los genes que codifican proteínas GGDEF en el genoma de *S. Enteritidis*.

Tal como se ha comentado previamente, para conseguir la mutación secuencial de varios genes y si la cepa Gram negativa que se quiere mutagenizar es sensible a la transducción por fagos se puede utilizar el siguiente procedimiento: Al construir las cepas en las que se ha delecionado/insertado/alterado cada uno de los genes diana de forma individual utilizando el proceso descrito anteriormente, pueden guardarse en glicerol a -80°C las cepas en las que el plásmido pKO3blue está integrado en estos genes diana. Estas cepas deben ser incubadas a 43°C y en presencia de cloranfenicol para evitar que el plásmido se escinda. Partiendo de un mutante individual en un gen A, se lleva a cabo un proceso de transducción utilizando un lisado obtenido a partir de una cepa que contiene el plásmido pKO3blue integrado en uno de los genes diana, por ejemplo el gen B. El fago transporta el plásmido integrado junto a la región flanqueante del cromosoma y por recombinación homóloga de las regiones flanqueantes se integra el plásmido en la cepa en la que se ha producido previamente la mutación del gen A para proceder a la modificación del gen B. Posteriormente se procede a la escisión del plásmido mediante el proceso descrito anteriormente. De esta manera se obtiene un doble mutante en los genes A y B. Este proceso se puede repetir secuencialmente tantas veces como se desee y en el orden que se desee.

En este ejemplo, para conseguir la mutación secuencial de cada uno de los genes que codifican estas proteínas se siguió el siguiente procedimiento: Una vez confirmada la delección del gen *stm0385* (*adrA*), esta cepa fue sometida a un proceso de transducción utilizando un lisado del fago P22 obtenido a partir de la cepa que contiene el plásmido pKO3blue integrado en el gen *stm1987*. Posteriormente se procedió a la escisión del plásmido mediante el proceso descrito anteriormente. De esta manera se obtuvo un doble mutante en los genes *adrA* y *stm1987*. Este proceso se repitió secuencialmente con cada uno de los genes *yciR*, *yegE*, *yfiN*, *yhdA*, *stm3388*, *yhjK*, *stm4551*, *yfeA* y *stm2503*. El gen *yeaJ* se delecionó mediante recombinación con un fragmento lineal de ADN introduciendo un cassette de resistencia a Kanamicina o a Cloranfenicol mediante el método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) y de esta forma se obtuvieron las dos cepas que carecen de los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF: Δ XII::Km y Δ XII::Clo, respectivamente. En este proceso, junto al mutante completo, se genera una colección de cepas intermedias, que se caracterizan por carecer sucesivamente de un gen que codifica una proteína GGDEF:

Δ I: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA*

Δ II: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987*

Δ III: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km

Δ IV: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR*

Δ V: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE*

Δ VI: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN*

Δ VII: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA*

Δ VIII: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388*

Δ IX: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK*

Δ X: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551*

Δ XI: *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551* Δ *yfeA*

Δ XII::Km : *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551*

Δ *yfeA* Δ *stm2503*

Δ XII::Clo : *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Clo Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551*

Δ *yfeA* Δ *stm2503*

La ausencia de los genes que codifican para las proteínas GGDEF se confirmó mediante Southern blot (Fig. 10). El DNA cromosómico del mutante Δ XII::Km fue purificado, digerido con las enzimas de restricción PstI y SalI, sometido a electroforesis en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon utilizando métodos ya establecidos (Ausubel *et al.*, 1990). Se utilizaron como sondas fragmentos de cada uno de los genes que codifican las correspondientes proteínas GGDEF que fueron amplificados con los oligos que se presentan en la Tabla 3 y las siguientes condiciones de PCR:

Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C

30
ciclos

Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C

Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 52 °C

Extensión: de 45 segundos a 72 °C

Extensión final: 10 minutos a 72 °C

El marcaje de las sondas y la hibridación del DNA se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo suministrado con el *PCR-DIG DNA-Labeling and Chemiluminiscent Detection Kit* (Boehringer Mannheim).

La ausencia de los genes que codifican para las proteínas GGDEF se confirmó también mediante PCR utilizando los oligonucleótidos E y F de las regiones flanqueantes de cada uno de los genes como se ha explicado anteriormente.

TABLA 3

Oligonucleótidos utilizados para generar los fragmentos de los genes GGDEF que se utilizaron como sondas en la técnica de Southern Blot

Id Genoma	Nombre Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del fragmento amplificado (nt)
STM0385	<i>adrA</i>	<i>adrA</i> int.Fw (SEQ ID NO:77) <i>adrA</i> int.Rv (SEQ ID NO:78)	421
STM1283	<i>yeaJ</i>	<i>yeaJ</i> int.Fw (SEQ ID NO:79) <i>yeaJ</i> int.Rv (SEQ ID NO:80)	270
STM1703	<i>yciR</i>	<i>yciR</i> int.Fw (SEQ ID NO:81) <i>yciR</i> int.Rv (SEQ ID NO:82)	576
STM1987		DGC II.Fw (SEQ ID NO:83) DGC III.Rv (SEQ ID NO:84)	639
STM2123	<i>yegE</i>	<i>yegE</i> VI.Fw (SEQ ID NO:85) <i>yegE</i> V.Rv (SEQ ID NO:86)	621
STM2410	<i>yfeA</i>	<i>yfeA</i> sonda Fw (SEQ ID NO:87) <i>yfeA</i> sonda Rv (SEQ ID NO:88)	507
STM2672	<i>yfiN</i>	<i>yfiN</i> III.Fw (SEQ ID NO:89) <i>yfiN</i> III.Rv (SEQ ID NO:90)	427
STM3375	<i>yhdA</i>	<i>yhdA</i> int.Fw (SEQ ID NO:91) <i>yhdA</i> int.Rv (SEQ ID NO:92)	558
STM3388		<i>stm3388</i> IV.Fw (SEQ ID NO:93) <i>stm3388</i> V.Rv (SEQ ID NO:94)	483
STM3615	<i>yhjK</i>	<i>yhjK</i> int.Fw (SEQ ID NO:95) <i>yhjK</i> int.Rv (SEQ ID NO:96)	610
STM4551		<i>stm4551</i> III.Fw (SEQ ID NO:97) <i>stm4551</i> II.Rv (SEQ ID NO:98)	626
STM2503		<i>stm2503</i> int.Fw (SEQ ID NO:99) <i>stm2503</i> int.Rv (SEQ ID NO:100)	495

La distinción de la cepa mutante Δ XII::Km o Δ XII::Clo de cualquier otra cepa se puede realizar mediante la reacción de PCR anteriormente descrita utilizando los oligonucleótidos E y F, que hibridan en las zonas flanqueantes de cada uno de los genes, y digestión con la enzima de restricción XhoI. El tamaño de los fragmentos de ADN resultado de la reacción de amplificación y digestión con XhoI para cada gen son los recogidos en la Tabla 2.

Este proceso puede ser utilizado para delecionar la secuencia de genes que se desee, y en el orden que se desee, con la única limitación que el efecto de la delección puede tener sobre la viabilidad de la bacteria.

Una vez terminado el proceso, se observa que la cepa deficiente en la familia completa de proteínas GGDEF Δ XII::Km:

- No presenta niveles detectables de c-di-GMP medidos mediante HPLC y espectrometría de masas, como puede comprobarse en la Fig. 7, que muestra los niveles de c-di-GMP mediante HPLC en la cepa silvestre (*S. Enteritidis* 3934) y el mutante Δ XII::Km. La cepa salvaje acumula una cantidad de c-di-GMP de 1,46 pmoles/mg después de 24 horas de incubación en placas de LB sin sal a 28°C. Nótese que los niveles de c-di-GMP en el Δ XII::Km no son detectables. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes. Las muestras se analizaron utilizando un sistema de HPLC Waters 2695 Alliance y se inyectaron en una columna de fase reversa 100C₁₈ 10 μ m 25 x 0,46 y una precolumna WP300C₁₈. La columna se eluyó a una velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando un gradiente de 0% a 15% de B en 30 minutos (A, Acetato de amonio; B, acetonitrilo:agua (1:1)).

- El mutante Δ XII::Km es inmóvil, deficiente en la formación de biofilm, deficiente en la síntesis de celulosa y de fimbrias de tipo curli. Esto puede comprobarse en la Fig. 6, en la que se compara el comportamiento de la cepa silvestre *S. Enteritidis* 3934 (parte izquierda de las fotos de la serie A a E) con el de la cepa mutante Δ XII::Km (parte derecha de las fotos de la serie A a E).

- El mutante Δ XII::Km es avirulento. Estudios de virulencia en ratones BALB/c, en los que 10⁹ bacterias se inoculaban por vía oral a ratones hembra BALB/c de 20 g, mostraron que el mutante Δ XII::Km es avirulento (véase la Fig. 8). En la parte (A), lotes de ratones BALB/c fueron infectados por vía oral con 10⁹ ufc (unidades formadoras de colonia) y se determinó el número de animales que sobrevivían tras 24 días post-infección. Todos los ratones infectados con la cepa salvaje murieron antes del día 12 post-infección, mientras que ninguno de los ratones infectados por la cepa Δ XII::Km murió. La parte (B) muestra el ensayo de asa intestinal, en el que, sobre tres ratones anestesiados se realizó un ligamiento de intestino delgado de aproximadamente 1 cm, se inoculó una cantidad de 10⁷ ufc y se incubó durante 90 minutos. Tras la incubación, el animal se sacrificó, se cortó el trozo de intestino comprendido entre las dos ligaduras y se analizó la cantidad de bacterias que habían sido capaces de atravesar la barrera intestinal y colonizar las células del epitelio, siendo menor en el caso del mutante Δ XII::Km (barra con relleno), pero cercano a 10³ ufc por asa. La parte (C) corresponde al ensayo de colonización de órganos; para ello, se inocularon oralmente 5 ratones BALB/c con una dosis subletal de 10⁴ ufc y tras 5 días de infección los animales se sacrificaron y se cuantificó la cantidad de ufc en órganos diana como bazo e hígado; tanto en hígado como en bazo, las bacterias detectadas fueron más de 3 órdenes de magnitud inferiores en el caso del mutante Δ XII::Km (barras con relleno) con respecto a la cepa de tipo silvestre (barras sin relleno).

Ejemplo 4

Utilización del procedimiento de modificación cromosómica para la inserción de genes que codifican proteínas con dominio GGDEF en el genoma de S. Enteritidis 3934 Δ XII::Km

Otra utilidad del procedimiento de modificación de la invención es la inserción de genes o cualquier fragmento de ADN en el cromosoma de una bacteria mediante un proceso de recombinación homóloga.

Un ejemplo lo representa la inserción de los genes *stm1987* y *stm4551* en el genoma de bacterias mutantes generadas en el Ejemplo anterior, para obtener las cepas *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*stm1987*, *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*stm4551*.

En el caso de la primera de ellas, para su obtención, el gen *stm1987* se insertó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la delección de genes en el apartado anterior, aunque variando los cebadores de amplificación y el fragmento insertado en el plásmido pKO3blue: se amplificó el gen *stm1987* utilizando la pareja de oligonucleótidos 04-A (SEQ ID NO:19) y 04-D (SEQ ID NO:22) y las siguientes condiciones de PCR:

Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C

30 ciclos { Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: de 3 minutos a 72 °C

Extensión final: 10 minutos a 72 °C

y se clonó en el plásmido pGEMt-easy. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción NotI-BglII. El producto de la digestión se resolvió en geles de agarosa y el fragmento conteniendo el gen *stm1987* así como las regiones de ADN adyacentes a dicho gen (2816 pb) se purificó desde un gel de agarosa utilizando un kit comercial. El fragmento purificado se ligó en el plásmido pKO3blue digerido con las enzimas NotI-BglII y se transformó la cepa de *E. coli* XLI Blue mediante electroporación. Los transformantes obtenidos se analizaron mediante PCR utilizando los oligos 04-A (SEQ ID NO:19) y 04-D (SEQ ID NO:22) y las condiciones de PCR descritas anteriormente y se purificó el plásmido

ES 2 324 084 A1

de un clon positivo. Este plásmido se introdujo mediante electroporación en la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII::Km. La cepa de *S. Enteritidis* 3934 Δ XII::Km transformada se seleccionó como una colonia azul en placas con un medio de cultivo conteniendo cloranfenicol (20 μ g/ml), y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) (40 μ g/ml) a 28°C.

Una vez seleccionada, la cepa se incubó a 43°C en medio líquido en presencia de cloranfenicol (20 μ g/ml) durante 48 horas para permitir la integración del plásmido en el cromosoma de la bacteria por un proceso de recombinación homóloga (Recombinación tipo Campbell). Dado que el plásmido tiene un origen de replicación termosensible, no es capaz de replicarse a 43°C y sólo podrán crecer en presencia de cloranfenicol a 43°C, aquellas bacterias que integren el plásmido en el cromosoma. 75 μ l del cultivo se plaquearon en una placa precalentada a 43°C que contenía un medio de cultivo con cloranfenicol (20 μ g/ml) y X-gal (40 μ g/ml) y se incubó a 43°C durante 48 horas. Tras la incubación, se seleccionaron seis colonias en las cuales el plásmido estaba posiblemente integrado (colonias azules) y se replicaron en placas precalentadas a 43°C que contenían un medio de cultivo con cloranfenicol (20 μ g/ml) y X-gal (40 μ g/ml) y se incubaron a 43°C durante 48 horas. Las colonias que habían incorporado el plásmido en el genoma tenían color azul debido a la expresión constitutiva del gen de la β -galactosidasa.

Tras la incubación, a partir de dos integrados (colonias azules) se comienza el proceso de escisión, incubándolos en medio líquido sin antibiótico a 28°C durante 24 horas. En esta etapa, como consecuencia de un segundo proceso de recombinación, en un porcentaje de la población se producirá la escisión del plásmido perdiéndose la resistencia a cloranfenicol y la actividad β -galactosidasa. Se sembraron diluciones del cultivo en placas de cultivo conteniendo X-gal y sacarosa (5%), y las placas se incubaron 24 h a 28°C.

Se seleccionaron 24 colonias blancas para realizar una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos 04-E (SEQ ID NO:23) y 04-F (SEQ ID NO:24) y las siguientes condiciones:

Desnaturalización: 5 minutos a 94 °C

30 ciclos { Desnaturalización: 45 segundos a 94 °C
Hibridación de los cebadores: 1 minuto a 54 °C
Extensión: de 3 minutos a 72 °C

Extensión final: 10 minutos a 72 °C

El tamaño del fragmento obtenido en la amplificación permitió identificar aquellas colonias que habían recuperado en el cromosoma el gen *stm1987* y descartar aquellas colonias en las que tras la segunda recombinación se había recuperado la delección presente en el Δ XII::Km.

La inserción del gen *stm1987* se confirmó mediante amplificación del gen *stm1987* utilizando los oligonucleótidos 04-E (SEQ ID NO:23) y 04-F (SEQ ID NO:24) y las condiciones de PCR descritas anteriormente y la especificidad del producto de amplificación de la reacción de PCR se determinó mediante secuenciación del producto de PCR.

Este mismo proceso también se realizó con otros 8 genes que codifican para proteínas GGDEF de *S. Enteritidis*: *adrA*, *yeaJ*, *yciR*, *yegE*, *yfiN*, *yhdA*, *stm3388*, *yhjK*, utilizando en cada caso los oligonucleótidos correspondientes, según lo descrito en las Tablas 1 y 2. Nótese que en el caso del gen *yeaJ* se utilizó la pareja de oligonucleótidos 02-H (SEQ ID NO:75) y 02-I (SEQ ID NO:76).

La cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*stm4551* fue construida a partir del mutante intermedio Δ IX (*S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK*) en el que se delecionó el gen *stm2503* utilizando el procedimiento descrito en esta invención y en la que posteriormente se mutó el gen *yfeA* mediante la inserción de un cassette de cloranfenicol utilizando el método de Datsenko y los oligonucleótidos 06-Clo Fw (SEQ ID NO:37) y 06-Clo Rv (SEQ ID NO:38). De esta forma se obtuvo la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*::Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm2503* Δ *yfeA*-Clo a la que se ha denominado *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*stm4551* y que sólo produce una única proteína GGDEF.

La cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*yfeA* fue construida a partir del mutante intermedio Δ X (*S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*-Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551*) en el que se delecionó el gen *stm2503* utilizando el procedimiento descrito en esta invención. De esta forma se obtuvo la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*-Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551* Δ *stm2503* a la que se ha denominado *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*yfeA* y que sólo produce una única proteína GGDEF.

La cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+*stm2503* fue construida a partir del mutante intermedio Δ X (*S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA* Δ *stm1987* Δ *yeaJ*-Km Δ *yciR* Δ *yegE* Δ *yfiN* Δ *yhdA* Δ *stm3388* Δ *yhjK* Δ *stm4551*) en el que se delecionó el gen *yfeA* utilizando el procedimiento descrito en esta invención. De esta forma se obtuvo la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ *adrA*

$\Delta stm1987 \Delta yeaJ$ -km $\Delta yciR \Delta yegE \Delta yfiN \Delta yhdA \Delta stm3388 \Delta yhjK \Delta stm4551 \Delta yfeA$ a la que se ha denominado *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm2503$ y que sólo produce una única proteína GGDEF.

De esta forma se generó una colección de 12 cepas que se caracterizan por producir cada una de ellas, una única proteína GGDEF:

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+stm1987$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+stm4551$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+adrA$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yeaJ$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yciR$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yegE$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yfeA$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yfiN$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yhdA$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+stm3388$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+yhjK$

Salmonella Enteritidis 3934 $\Delta XII+stm2503$

La inserción de fragmentos de ADN en el cromosoma de cualquier bacteria Gram negativa puede realizarse siguiendo el procedimiento similar al descrito en este ejemplo.

Ejemplo 5

Utilización de la cepa S. Enteritidis 3934 $\Delta XII+stm4551$ para la identificación de sustancias químicas que inhiban la síntesis de c-di-GMP

Todo el c-di-GMP que es capaz de sintetizar la cepa *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm4551$ depende de la presencia de la proteína STM4551. La producción de c-di-GMP por esta proteína activa la expresión de genes concretos que se han identificado mediante experimentos con microarrays. Uno de los genes cuya expresión se activa con más intensidad en presencia de *stm4551* es el gen *csgA*. Este gen se ha sustituido por el gen indicador *lacZ*, aunque podría ser sustituido por cualquier otro gen indicador (gus, GFP). La cepa *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm4551$ en la que el gen *csgA* ha sido sustituido por *lacZ* presenta unos niveles de actividad β -galactosidasa medidos según el método de Miller modificado por Maloy (Maloy *et al.*, 1996) de 400 unidades, cuando la cepa crece en pocillos de una placa de ELISA en medio LB tras 24 horas de incubación a 28°C.

Cuando la cepa *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm4551$ se complementa con un plásmido que sobreproduce el gen *yciR*, que codifica una proteína con actividad fosfodiesterasa, capaz de degradar el c-di-GMP, los niveles de actividad β -galactosidasa disminuyen hasta unos valores de 20 unidades, cuando la cepa crece en pocillos de una placa de ELISA en medio LB tras 24 horas de incubación a 28°C.

Para determinar si un determinado compuesto químico es capaz de interferir con el c-di-GMP, se añaden distintas concentraciones de ese compuesto en los pocillos de una placa de ELISA en la que se ha inoculado la cepa testigo. Para determinar que el compuesto no afecta al crecimiento de la bacteria, se mide el crecimiento de la bacteria mediante lectura de la densidad óptica a 600 nm. Los compuestos que afectan al crecimiento de la bacteria se descartan, y de aquellos compuestos que no afectan al crecimiento se mide la actividad β -galactosidasa siguiendo el procedimiento descrito por Griffith *et al.* (Griffith & Wolf, 2002). Aquellas sustancias cuya presencia bloquee la transcripción del gen indicador y, consecuentemente, la actividad de la proteína expresada por dicho gen, serán posibles candidatos para el desarrollo de drogas que bloqueen el c-di-GMP.

La Fig. 9 hace referencia a la estructura del genoma de la cepa *S. Enteritidis* 3934 $\Delta XII+stm4551$ en la que el gen *csgA* ha sido sustituido por *lacZ*, válida para la identificación de sustancias químicas que inhiban la síntesis de c-di-GMP.

Depósito de microorganismos

Las cepas *S. Enteritidis* 3934 Δ XII::Clo, *S. Enteritidis* 3934 Δ XII::Km, *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+stm1987, *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+stm4551 y la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue conteniendo el plásmido pKO3blue han sido depositadas en la Colección Española de Cultivo Tipo (Burjassot, Valencia, España) siguiendo las normas del Tratado de Budapest para el depósito de microorganismos para fines de patentes en las siguientes fechas y se les ha asignado el siguiente número de acceso:

Material	Fecha de Depósito	Número de acceso
<i>S. Enteritidis</i> 3934 Δ XII::Clo	27 de Febrero de 2007	CECT 7238
<i>S. Enteritidis</i> 3934 Δ XII::Km	27 de Febrero de 2007	CECT 7237
<i>S. Enteritidis</i> 3934 Δ XII+stm1987	27 de Febrero de 2007	CECT 7239
<i>S. Enteritidis</i> 3934 Δ XII+stm4551	27 de Febrero de 2007	CECT 7240
<i>Escherichia coli</i> XL1Blue pKO3blue	27 de Febrero de 2007	CECT 7241

La presente invención no está limitada al ámbito de los microorganismos depositados en la patente dado que estos representan una ilustración puntual de un aspecto de la invención. Cualquier microorganismo o plásmido que sea funcionalmente equivalente a los descritos en la invención se incluye dentro de la invención.

Referencias bibliográficas

Arnaud, M., A. Chastanet & M. Débarbouillé, (2004) A new vector for efficient allelic replacement in naturally non transformable low GC% Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, (1990) Current protocols in molecular biology. In. New York: *John Wiley & Sons*, pp.

Ayres, E. K., V. J. Thomson, G. Merino, D. Balderes & D. H. Figurski, (1993) Precise deletions in large bacterial genomes by vector-mediated excision (VEX). The trfA gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several gram-negative hosts. *J Mol Biol* **230**: 174-185.

Bitan-Banin, G., R. Ortenberg & M. Mevarech, (2003) Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the pyrE gene. *J Bacteriol* **185**: 772-778.

Camilli, A., D. T. Beattie & J. J. Mekalanos, (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2634-2638.

Cherepanov, P. P. & W. Wackernagel, (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.

Christensen, G. D., (1987) The coagulase-negative staphylococci: little brother grows up. *J Am Geriatr Soc* **35**: 469-471.

Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.

Fabret, C., S. D. Ehrlich & P. Noirot, (2002) A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **46**: 25-36.

Galperin, M. Y., (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552-567.

Garcia, B., C. Latasa, C. Solano, F. G. Portillo, C. Gamazo & I. Lasa, (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**: 264-277.

Griffith, K. L. & R. E. Wolf, Jr., (2002) Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 397-402.

Jenal, U. & J. Malone, (2006) Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. *Annu Rev Genet*.

Kader, A., R. Simm, U. Gerstel, M. Morr & U. Romling, (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616.

Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin & V. De Lorenzo, (1995) Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol* **177**: 52-58.

Leenhouts, K., G. Buist, A. Bolhuis, A. ten Berge, J. Kiel, I. Mierau, M. Dabrowska, G. Venema & J. Kok, (1996) A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol Gen Genet* **253**: 217-224.

Link, A. J., D. Phillips & G. M. Church, (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.

Maloy, S. R. & W. D. Nunn, (1981) Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **145**: 1110-1111.

Maloy, S. R., V. J. Stewart & R. K. Taylor, (1996) Genetic analysis of pathogenic bacteria: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N.Y.*

Parsell, D. A., A. S. Kowal, M. A. Singer & S. Lindquist, (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.

Peck, R. F., S. Dassarma & M. P. Krebs, (2000) Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Mol Microbiol* **35**: 667-676.

Ried, J. L. & A. Collmer, (1987) An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* **57**: 239-246.

Romling, U., M. Gomelsky & M. Y. Galperin, (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**: 629-639.

Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark & J. Reinkoster, (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella ryphimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**: 10-23.

Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey & J. M. Dow, (2006) Cyclic Di-GMP Signaling in Bacteria: Recent Advances and New Puzzles. *J Bacteriol* **188**: 8327-8334.

Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz & U. Romling, (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**: 1123-1134.

Tal, R., H. C. Wong, R. Calhoon, D. Gelfand, A. L. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana & M. Benziman, (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* **180**: 4416-4425.

Tamayo, R., J. T. Pratt & A. Camilli, (2007) Roles of Cyclic Diguanylate in the Regulation of Bacterial Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *Salmonella spp.* en la que se han delecionado todos : los genes que codifican las proteínas GGDEF.
2. Cepa mutante según la reivindicación 1, que es una cepa mutante del serotipo Enteritidis de *Salmonella enterica*.
3. Cepa mutante según la reivindicación 2, que es el mutante Δ XII::Km o el mutante Δ XII::Clo.
4. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como intermedio para la obtención de cepas mutantes en las que reinserta uno o más genes que codifican proteínas GGDEF.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que la cepa mutante es el mutante Δ XII::Km o el mutante Δ XII::Clo.
6. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado como vacuna.
7. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como vector de expresión de antígenos de cualquier organismo (xenoantígenos).
8. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como vector de expresión de un fármaco.
9. Una cepa mutante de *Salmonella spp.* en la que se ha delecionado al menos uno de los genes que codifica para proteínas GGDEF.
10. Cepa según la reivindicación 9, que es una cepa mutante del serotipo Enteritidis de *Salmonella enterica*.
11. Cepa según la reivindicación 10, que se selecciona del grupo de las cepas Δ I, Δ II, Δ III, Δ IV, Δ V, Δ VI, Δ VII, Δ VIII, Δ IX, Δ X, Δ XI.
12. Cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que se ha reinsertado uno de los genes que codifica para proteína GGDEF previamente delecionado.
13. Cepa según una cualquier de las reivindicaciones 9 a 12, en cuya genoma está presente únicamente un gen funcional que codifica para proteínas GGDEF a partir del cual se expresa una proteína GGDEF funcional.
14. Cepa según la reivindicación 13, que se ha generado reinsertando en el mutante Δ XII::Km uno de los genes que codifica para proteínas GGDEF previamente delecionado.
15. Cepa según la reivindicación 14, que es la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+stm 1987.
16. Cepa según la reivindicación 13, que es la cepa *S. Enteritidis* 3934 Δ XII+stm4551.
17. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado como vacuna.
18. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 como vector de expresión de antígenos de cualquier organismo (xenoantígenos).
19. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 como vector de expresión de un fármaco en el interior de células diana con fines terapéuticos.
20. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 para el estudio del metabolismo del c-di-GMP.
21. Uso según la reivindicación 20 para la identificación y desarrollo de sustancias químicas que bloqueen la síntesis de c-di-GMP.
22. Uso según la reivindicación 20 ó 21, en el que la cepa mutante es una cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16.
23. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, para el estudio de los mecanismos de formación y/o bloqueo de la formación de biofilms.
24. Uso de una cepa mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 para el estudio de la relación de los biofilms con la virulencia.

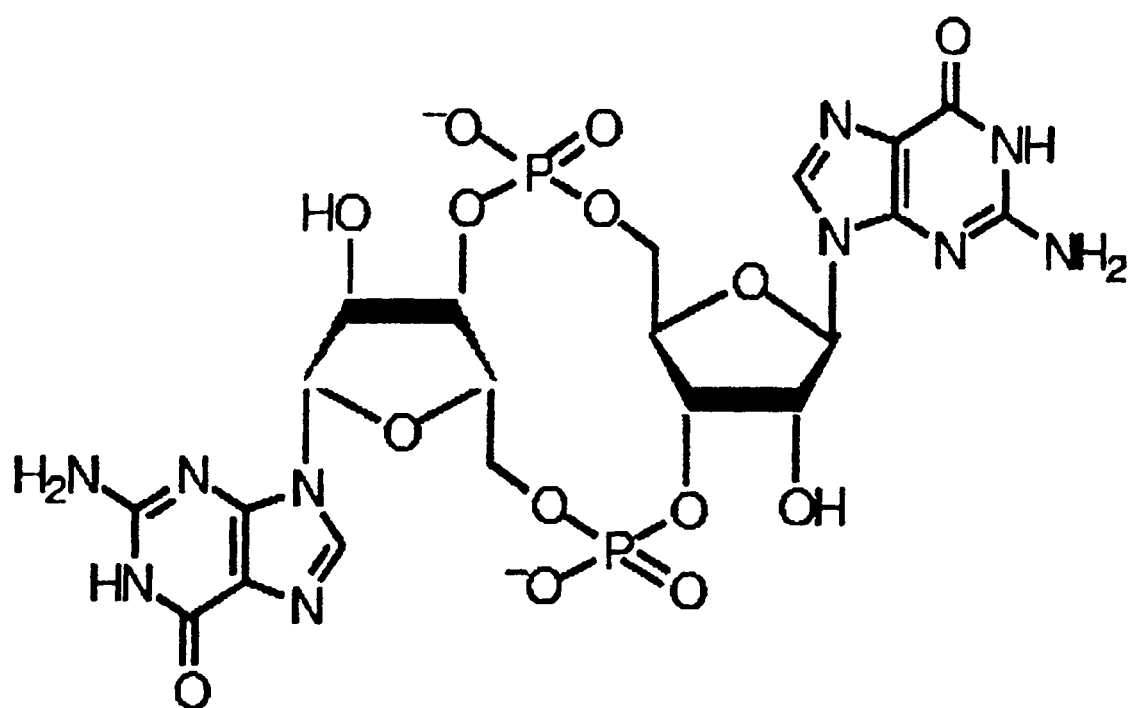
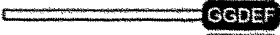
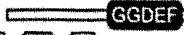
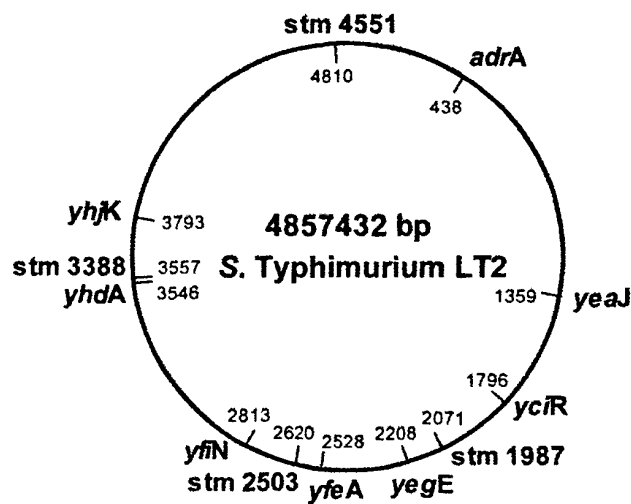


Fig. 1

A

Genoma ID	Nombre gen	Proteína Gcp	Hélices TM	Organización de los dominios	Motivo GGDEF
STM1987		GcpA	2		GGEEF
STM4551		GcpB	5		GGEEF
STM2123	<i>yegE</i>	GcpC	10		GGDEF
STM0385	<i>adrA</i>		4		GGDEF
STM1283	<i>yeaJ</i>	GcpD	2		GGDEF
STM1703	<i>yciR</i>	GcpE	0		GGDEF
STM3388		GcpF	7		GGDEF
STM2672	<i>yfiN</i>	GcpG	2		GGDEF
STM3615	<i>yhjK</i>		2		SGYDF
STM3375	<i>yhdA</i>		2		HRSDF
STM2410	<i>yfeA</i>		8		PGSEL
STM2503			8		SGHDL

B**Fig. 2**

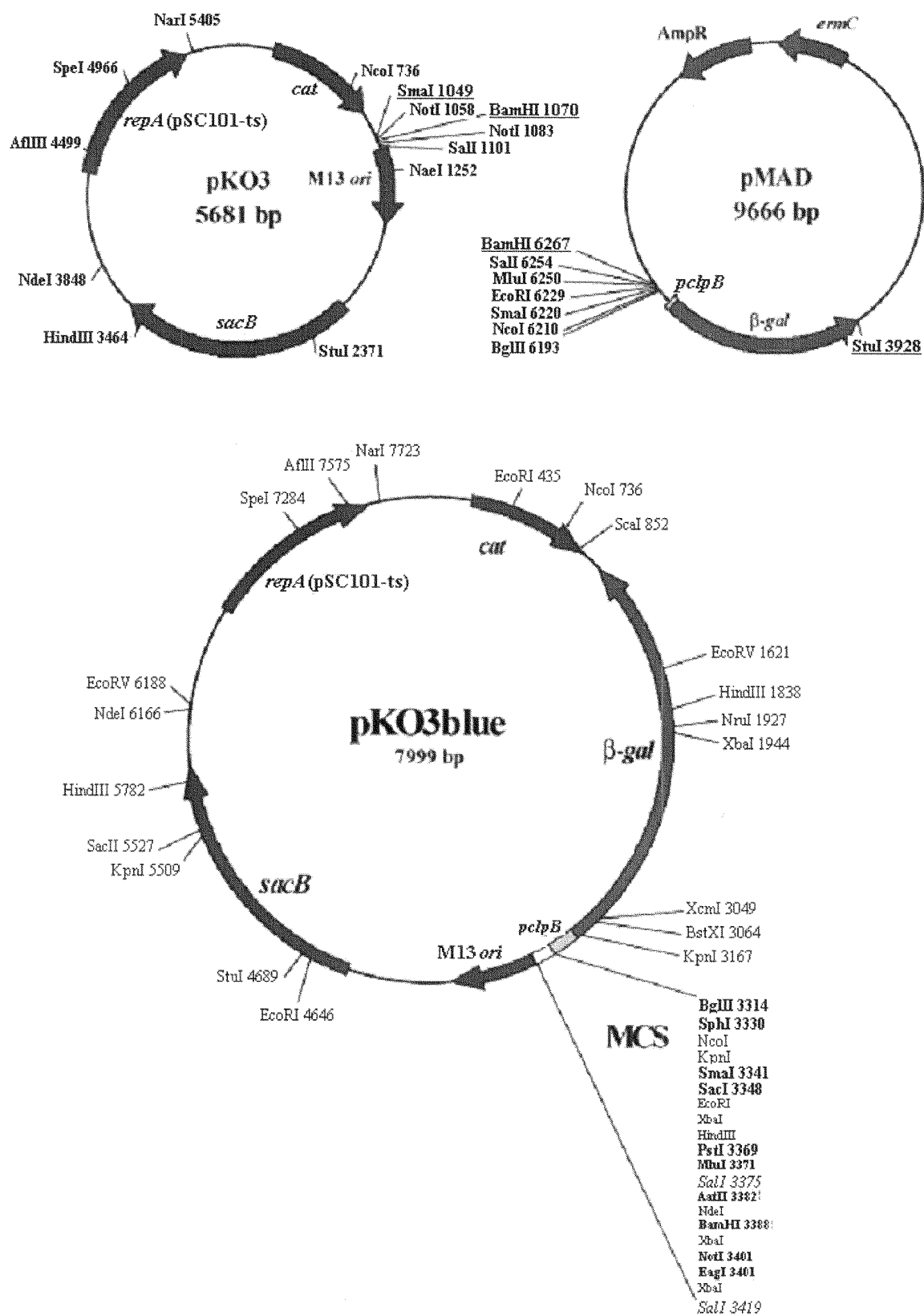


Fig. 3

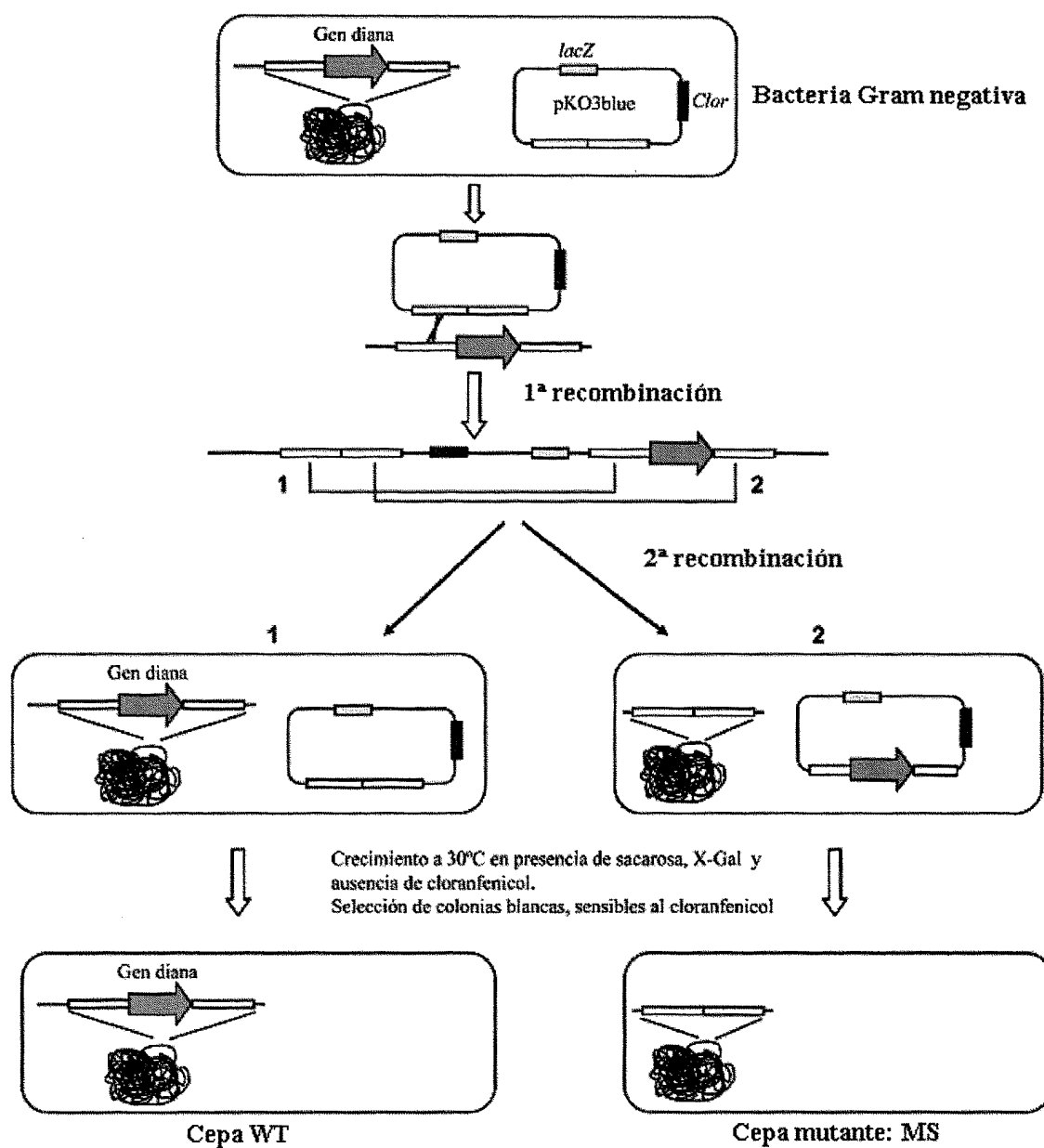


Fig. 4

Construcciones en pKO3Blue

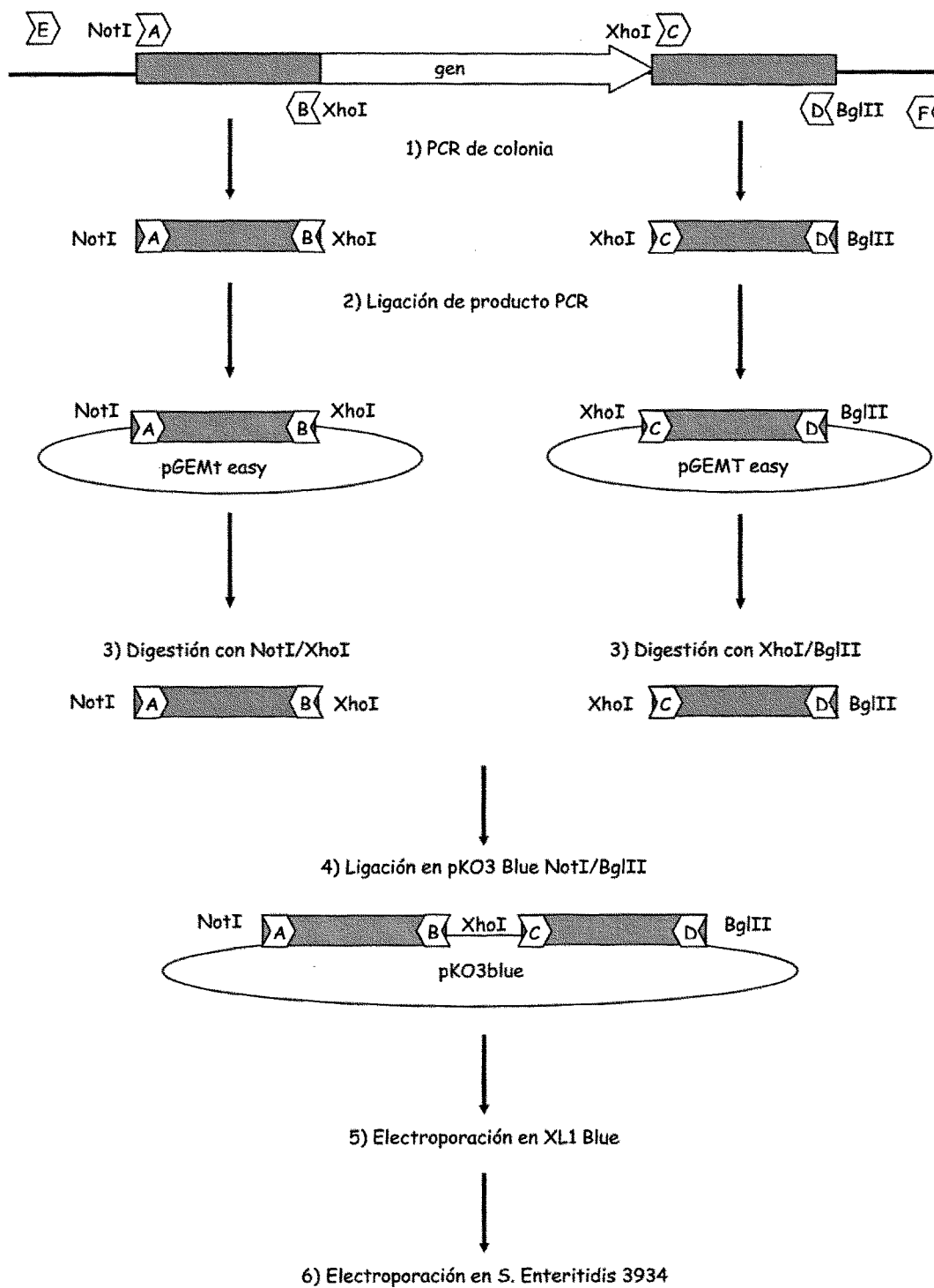


Fig. 5

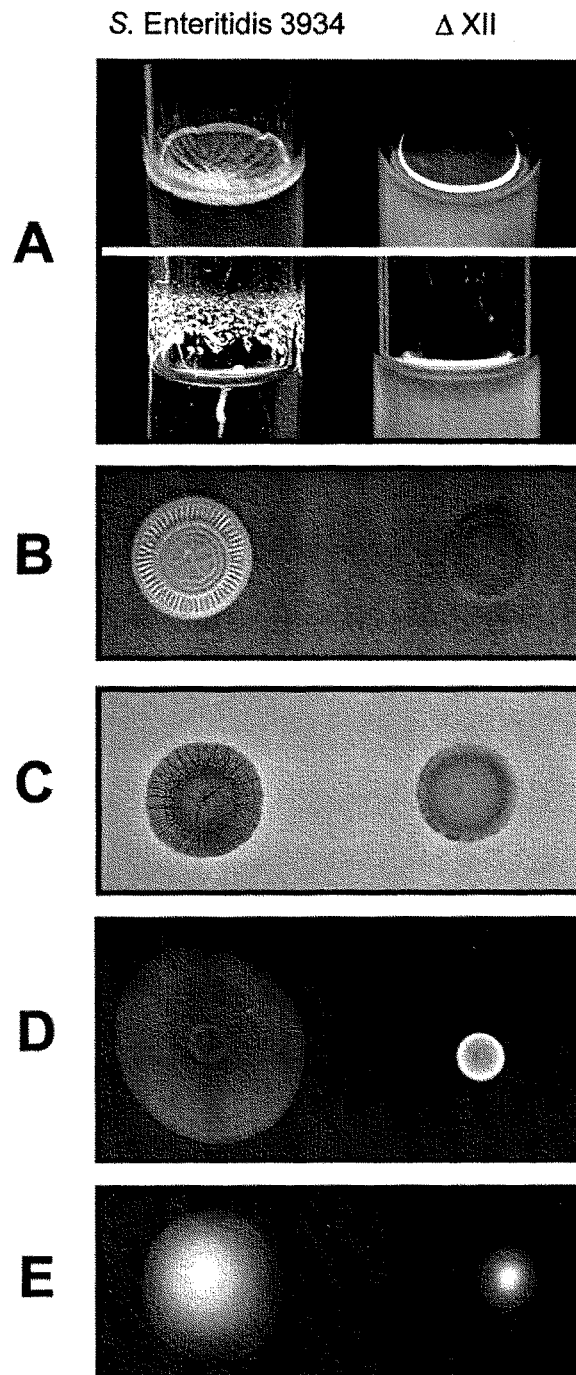


Fig. 6

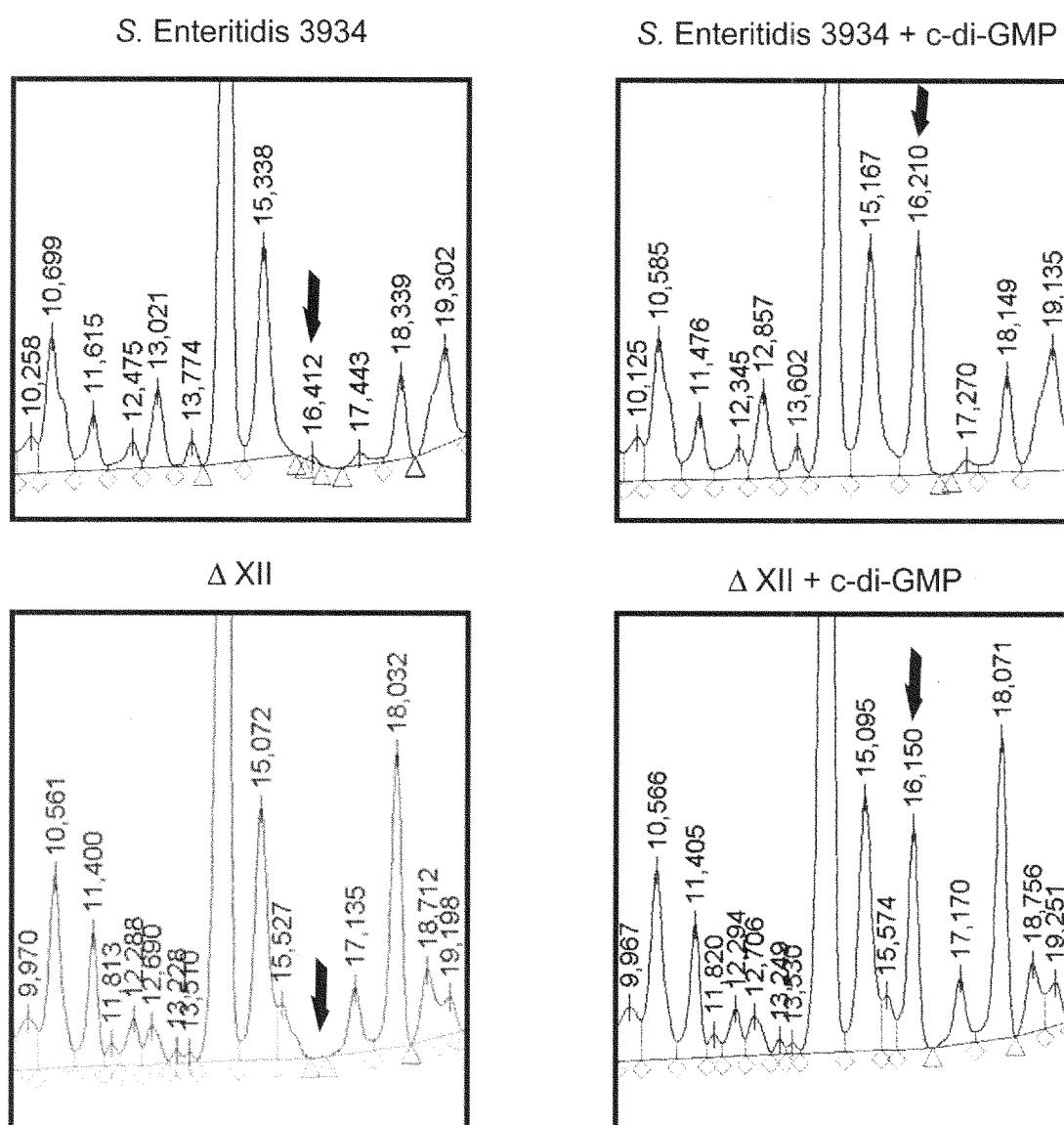
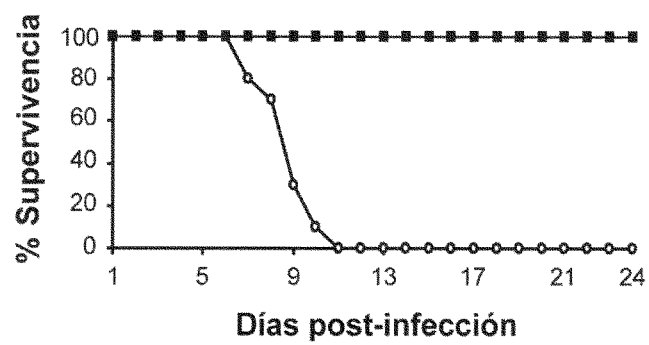
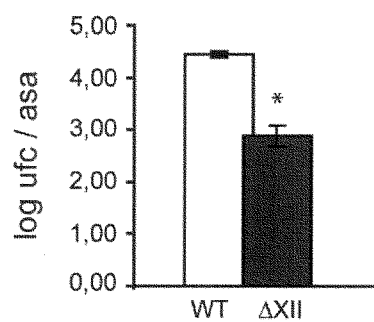


Fig. 7

A



B



C

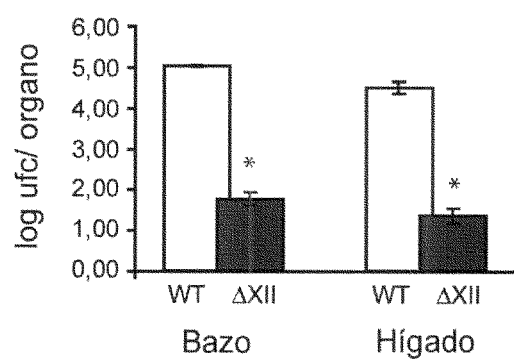


Fig. 8

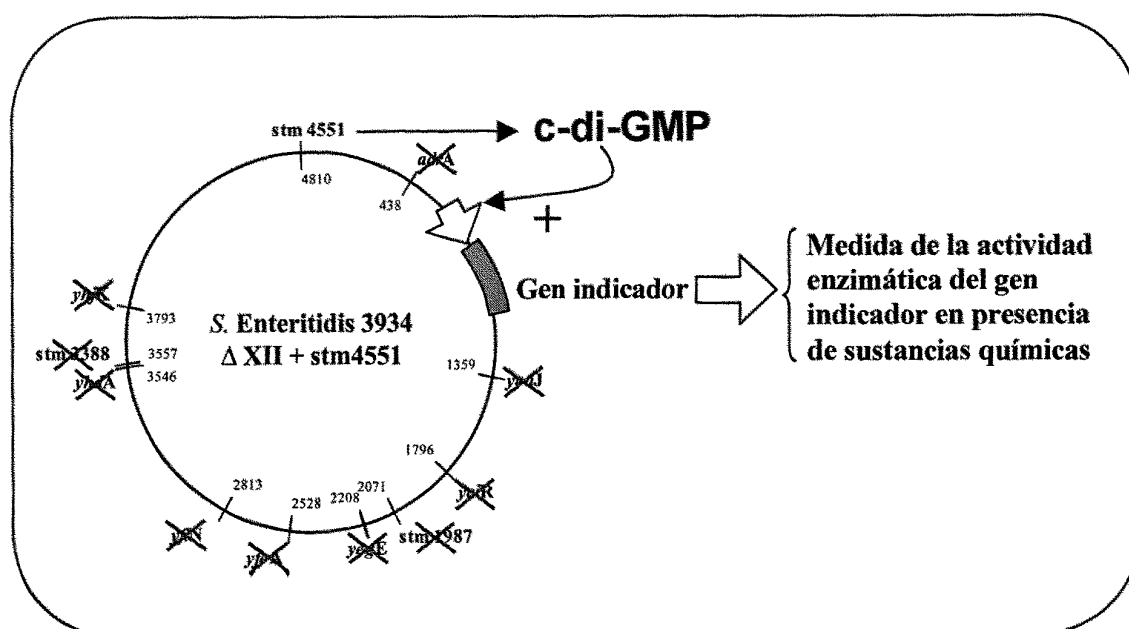


Fig. 9

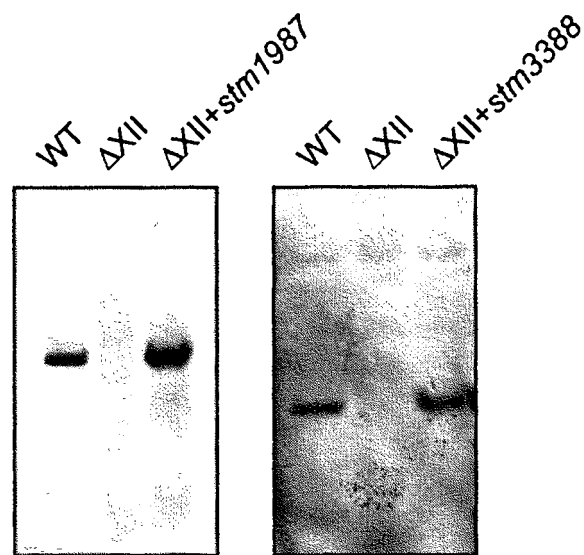


Fig. 10



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 324 084

⑫ Nº de solicitud: 200703068

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.11.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCIA B et al. Role of the GGDEF protein family in Salmonella cellulose biosynthesis and biofilm formation. Molecular Microbiology. 2004, Vol 54(1), páginas 264-277. Especialmente, página 264, columna 1 - página 266, columna 2; página 268, columna 2 - página 271, columna 1; página 274, Tabla 2.	9-11
X	KADER A et al. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Molecular Microbiology. 2006, Vol 60(3), páginas 602-616. Especialmente, página 602, columna 1; página 605, columna 1 - página 607, columna 2; página 610, columna 2 - página 611, columna 2.	9-11
A	SIMM R et al. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology. Mayo 2007, Vol 189(9), páginas 3613-3623. Especialmente, página 3613, resumen.	1-8, 12-24
A	SIMM R et al. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. Journal of Bacteriology. Oct 2005, Vol 187(19), páginas 6816-6823. Especialmente, página 6816, resumen.	1-8, 12-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.07.2009

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8, 12-24	SÍ
	Reivindicaciones	9-11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-8, 12-24	SÍ
	Reivindicaciones	9-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCIA B et al. Molecular Microbiology. 2004, Vol 54(1), páginas 264-277	2004
D02	KADER A et al. Molecular Microbiology. 2006, Vol 60(3), páginas 602-616	2006
D03	SIMM R et al. Journal of Bacteriology. Mayo 2007, Vol 189(9), páginas 3613-3623	2007
D04	SIMM R et al. Journal of Bacteriology. Oct 2005, Vol 187(19), páginas 6816-6823	2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga la obtención por ingeniería genética de cepas mutantes de *Salmonella* ssp, en las que se han deletado los genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, refiriéndose explícitamente a las cepas de *Salmonella* enterica serotipo Enteritidis, XII::Km (CECT nº 7237) y XII::Clo (CECT nº 7238). La invención se refiere también a la construcción de cepas mutantes por reinserción de genes previamente deletados, como son las dos cepas derivadas del mutante XII a la que se ha insertado respectivamente el gen *stm1987* o el gen *stm4551*, obteniendo las cepas depositadas en la CECT nº 7239 y nº 7240, conteniendo ambas una única proteína GGDEF. Estas cepas pueden ser empleadas como vectores de expresión, para fabricación de un medicamento o vacuna, para estudios de la síntesis y metabolismo del c-di-GMP así como de los mecanismos de formación de biopelícula y determinar su relación con la virulencia (reivindicaciones 1-24)

El documento D01 se refiere a la función de las proteínas GGDEF en la biosíntesis de celulosa y formación de biopelícula en cepas de *Salmonella* enterica. Empleando la cepa de *S. typhimurium*, SL1344, que no es capaz de formar biopelícula en diferentes condiciones de cultivo, se identifican los genes *stm1987* y *mirA*, capaces de restaurar la habilidad de formación de la biopelícula en dicha cepa cuando se expresan desde el plásmido pBR328 (ver página 264, columna 1 - página 266, columna 2; página 268, columna 2 - página 271, columna 1; página 274, Tabla 2)

El documento D02 estudia la función de las proteínas con dominio GGDEF en la expresión del morfotipo *rdar* en *S. enterica* serotipo Typhimurium. Empleando la cepa de *S. enterica* serotipo Typhimurium UMR1, que expresa el morfotipo *rdar* común y con la ayuda de plásmidos y mutantes deficientes en uno o varios de los genes (hasta triple mutante) que codifican para las proteínas *AdrA*, *stm2123* y *stm3388*, se establece la participación de estas proteínas en la expresión de *CsgA* y *GscD* (ver página 602, columna 1; página 605, columna 1 - página 607, columna 2; página 610, columna 2 - página 611, columna 2)

El documento D03 estudia la función de las proteínas con dominio EAL y GGDEF-EAL en la producción del mensajero secundario di-guanidin-monofosfato-cíclico (c-di-GMP), regulador del morfotipo *rdar* en *S. enterica* serotipo Typhimurium. La eliminación, mediante construcción de mutantes con ayuda de plásmidos y uso de técnicas de ingeniería genética, de cuatro de las quince proteínas con dominio EAL y GGDEF-EAL regula la expresión de este morfotipo, así como la expresión de la proteína *CsgD*, que tiene una función determinante en esta expresión (ver todo el documento)

El documento D04 estudia la función de varias proteínas con dominio GGDEF-EAL, implicadas en la transducción y en la producción del mensajero secundario c-di-GMP. Ciertas proteínas con este dominio regulan la formación de matrices extracelulares del morfotipo *rdar* en *Salmonella* enterica serotipo Typhimurium (ver todo el documento)

Hoja adicional

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 9-11

El documento D01 se considera el mas cercano al estado de la técnica ya que anticipa función de las proteínas con dominio GGDEF en la biosíntesis de celulosa y formación de biopelícula en cepas de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, identificando una serie de genes y proteínas implicadas en este proceso. Tanto el documento D01 como el D02, anticipan la obtención de cepas mutantes deficientes en uno o más genes con dominio GGDEF.

En consecuencia, según lo expuesto en los documentos D01 y D02, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 9-11 carece de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

1.2. REIVINDICACIONES 1-8, 12-24

Por otra parte, aunque los documentos D01 y D02 anticipan obtención de cepas mutantes deficientes en uno o más genes con dominio GGDEF, sin embargo no hacen referencia a cepas mutantes deficientes para los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, ni a cepas mutantes a las que se han reinsertado los genes que han sido previamente deletados.

En consecuencia, según lo expuesto en los documentos D01 y D02, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-8, 12-24 cumple con los requisitos de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D03 y D04, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.