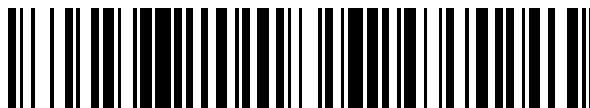


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 673**

21 Número de solicitud: 201331060

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:
11.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:
11.02.2015

Fecha de la concesión:
17.11.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:
24.11.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070569

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (70.0%)
Edificio EMPRENDIA, Campus Vida s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
FUNDACIÓN PEDRO BARRIÉ DE LA MAZA,
CONDE DE FENOSA (30.0%)**

72 Inventor/es:

**OTERO CASAL, Ana María;
ROMERO BERNARDEZ, Manuel y
MAYER MAYER, Celia**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PÉPTIDO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUORUM SENSING, POLINUCLEÓTIDO QUE
CODIFICA DICHO PÉPTIDO Y SUS APLICACIONES**

57 Resumen:

Péptido con actividad inhibidora de Quorum Sensing, polinucleótido que codifica dicho péptido y sus aplicaciones.

Se describe la donación, secuenciación y caracterización del gen responsable de la actividad Quorum Quenching (QQ) frente a señales de Quorum Sensing (QS) de la cepa *Tenacibaculum* sp. 20J (CECT7426). Dicho gen codifica un péptido que presenta al menos actividad lactonasa con un porcentaje de identidad inferior al 38% con las lactonasas descritas hasta el momento para otras especies, así como las secuencias de los genes homólogos presentes en otras especies del género *Tenacibaculum*. Dicho péptido muestra un amplio espectro de actividad degradando N-acil-homoserin lactonas (AHLs) de 4-14 átomos de carbono en su cadena lateral, opcionalmente sustituidas, es activo a pH comprendido entre 3 y 9, resistente a proteinasa K y quimiotripsina y no interactúa con antibióticos 13β-lactámicos.

ES 2 528 673 B1

**PÉPTIDO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUORUM SENSING,
POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA DICHO PÉPTIDO Y SUS APLICACIONES**

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención se refiere, en general, a un péptido con actividad inhibidora de señales de quorum sensing (QS) y a sus aplicaciones. La invención también se refiere al polinucleótido que codifica dicho péptido, vectores, células y organismos no humanos transgénicos que comprenden dicho polinucleótido.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El uso de metodologías de Quorum Quenching (QQ) para el tratamiento de infecciones bacterianas

15

Numerosas bacterias patógenas coordinan su actividad infecciosa mediante procesos de comunicación intercelular denominados Quorum Sensing (QS) (Otero Casal et al., 2004). Estos procesos consisten en la liberación al medio de pequeñas moléculas señal que permiten a las bacterias cuantificar la presencia de otras bacterias mediante sensores específicos, actuando de forma coordinada una vez alcanzada la concentración umbral de señal indicadora de la existencia de quorum. El QS controla la producción de factores de virulencia, como exoenzimas o pigmentos, de numerosos patógenos, tanto humanos como animales y vegetales (Whitehead et al., 2001; Fuqua y Greenberg, 2002; Bassler y Losick, 2006; Williams et al., 2007), incluyendo importantes patógenos nosocomiales como *Pseudomonas aeruginosa*.

20

25

Debido a que la virulencia de numerosos patógenos bacterianos depende de los procesos de QS, la inactivación o interceptación de la comunicación mediada por señales de quorum, una estrategia denominada de forma genérica inhibición de quorum sensing o Quorum Quenching (QQ), constituye una alternativa al uso de antibióticos para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas. Los procesos de QQ presentan un enorme potencial en el campo farmacéutico y biotecnológico, al tratarse de un mecanismo de bio-control de virulencia que evita que las bacterias lancen su ataque, haciéndolas más sensibles a las defensas del hospedador y facilitando que puedan ser eliminadas con mayor eficacia. Un punto clave de las estrategias de QQ es que no afectan a la viabilidad de las bacterias, sino que sólo

30

35

interfieren en la expresión de los factores de virulencia, evitando una presión selectiva sobre ellas, y por lo tanto, no generando resistencias.

Los mecanismos de QQ son considerados los nuevos agentes antipatogénicos situándolos como un objeto importante de estudio, pues una de sus posibles aplicaciones es el control de patógenos tanto de plantas como de animales, incluyendo humanos, que actúan a través de procesos de QS. El proceso de QQ tiene una menor probabilidad de selección de resistencias y una mayor especificidad, afectando solo a las bacterias receptoras. Además el uso de las estrategias de QQ acompañado de antibióticos podría dar lugar al control de patógenos multirresistentes tales como *P. aeruginosa*. En acuicultura, su aplicación como sustitutos a antibióticos es una alternativa con un amplio potencial, debido a las restricciones legislativas del uso de antibióticos en este campo, así como en otros campos de sanidad animal. Por otra parte, los procesos de QS y QQ cobran real importancia en el medio marino por sus implicaciones ecológicas en el mismo, y en especial, en el campo de la acuicultura ya que los procesos de QS mediados por N-acil-homoserín lactonas (AHLs) o autoinductores de tipo 2 (AI-2) están abundantemente extendidos en patógenos marinos como el caso de *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* y *Tenacibaculum maritimum* (Freeman y Bassler, 1999; Swift et al., 1999; Croxatto et al., 2002; Buch et al., 2003; Morohoshi et al., 2004; Bruhn et al., 2005; Romero et al., 2010).

Un proceso controlado por fenómenos de QS a destacar es la formación de biopelículas ("biofilms"), de gran impacto económico y clínico. Se sabe que muchas de estas biopelículas están íntimamente relacionadas con procesos infecciosos humanos. Los mecanismos por los que el biofilm produce los síntomas de la enfermedad todavía no están completamente establecidos, aunque se ha sugerido que las bacterias del biofilm pueden producir endotoxinas, se pueden liberar grupos de bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune, y, por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos. Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en un biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario. Los patógenos formadores de biopelículas son muy resistentes a antibióticos y

pueden adherirse a los alimentos o a sustancias en contacto con ellos, provocando problemas tanto de higiene como posibles tox infecciones alimentarias y en último término, grandes pérdidas económicas. Además, a menudo se encuentran en la superficie de los implantes médicos o en los dispositivos insertados en el organismo. También se pueden formar en áreas del cuerpo que están expuestas al aire; en particular, en heridas y en la pleura. En este sentido, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias más infectivas y problemáticas al formar biofilms difícilmente tratables con antibióticos convencionales. En pacientes con fibrosis quística coloniza los pulmones causando infecciones que son difíciles de tratar, y, a menudo, finalmente fatales. También es especialmente interesante en pacientes con heridas crónicas o con quemaduras. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* están actualmente clasificados como los principales causantes de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que estas especies habitan tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que, a través de las heridas quirúrgicas, puedan penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente. Estas especies forma biopelículas que colonizan catéteres, drenajes e implantes, favoreciendo la contaminación y la resistencia a antibióticos. Además, uno de los biofilms biológicos que presenta mayor complejidad y de mayor relevancia clínica es la placa dental, de cuya formación es responsable, entre otros patógenos de la cavidad oral, *Streptococcus mutans*, que también forma biopelículas. Adicionalmente, los biofilms contribuyen a la contaminación biológica de superficies, al bloqueo mecánico en conductos, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de aire acondicionado, sistemas antiincendios, etc. Por último hay que añadir que favorecen la formación del “biofouling” al constituir la base del crecimiento de otros organismos superiores en superficies sumergidas, constituyendo un grave problema económico en el sector de la acuicultura y transporte marítimo.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar nuevos agentes antibacterianos que incrementen el arsenal de remedios para combatir infecciones bacterianas.

La bacteria marina *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) presenta una alta capacidad de QQ.

***Tenacibaculum* sp. 20J (CECT 7426): una cepa con elevada capacidad QQ**

5

La bacteria marina *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) se caracteriza por una alta capacidad de degradación de señales AHL, mucho mayor que otras bacterias con actividad QQ que han sido aisladas de suelo (Romero et al., 2012). Se trata del aislado obtenido a partir de una muestra de sedimento de un tanque de cultivo de peces marinos, en medio TSA-I (Romero, 2010). La secuencia parcial del gen del RNA ribosómico 16S de la cepa presenta porcentaje de identidad del 99% con la cepa tipo de la bacteria marina patógena *Tenacibaculum discolor* DSM 18842/NCIMB 14278^T, perteneciente al filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), que causa la infección bacteriana conocida como tenacibaculosis/flexibacteriosis o “*gliding bacterial disease*” (Piñeiro-Vidal et al., 2008). Una característica distintiva de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) es que es capaz de crecer en medios carentes de sales marinas (TSA-1), por lo que si se aplican de forma estricta los caracteres taxonómicos fijados para el género *Tenacibaculum* excluiría a la cepa 20J de la especie *T. discolor* (Piñeiro Vidal et al., 2008). Por ello, a lo largo de este texto se utilizará para describir esta especie la terminología *Tenacibaculum* sp. cepa 20J o simplemente “cepa 20J”. Las células vivas y extractos celulares de la cepa 20J degradan todo el intervalo de tamaños de AHLs conocido, con o sin oxo- sustituciones, por lo que su actividad es altamente inespecífica (Romero, 2010). Es una cepa de rápido crecimiento, cultivable tanto en medios marinos como en medios terrestres.

25

Estudios preliminares llevados a cabo con la cepa 20J indican que la localización principal de su actividad QQ está ligada a las células aunque también se observa en sobrenadantes filtrados (ES 2342807 B2). Además, su actividad es constitutiva, pues no requiere la exposición previa a señales para su expresión. Al presentar actividad interceptora de QS tanto en la célula viva como en extractos celulares purificados (designados como ECCs en ES2342807 B2), permite el uso de ambos tipos de presentaciones para su aplicación biotecnológica. Además de haberse demostrado su alto espectro de actividad QQ, la comparación de su actividad con los datos disponibles en la bibliografía confirman su potencial ya que esta cepa degrada las AHLs con una velocidad hasta 24 veces mayor que los consorcios bacterianos marinos seleccionados por su actividad QQ (Cam et al., 2009). La comparación de la actividad de extractos celulares purificados de la cepa 20J con los mismos extractos

de la cepa de *Bacillus thuringiensis* CECT 197, puso de manifiesto la mayor actividad de los extractos celulares purificados de la cepa 20J, sobre todo en el caso de la degradación de la N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL): mientras que la concentración mínima activa (CMA) para la degradación total de una disolución 10 μ M de C6-HSL en 24 horas es de 10 μ g de proteína de extracto por mL para la cepa 20J, es necesaria una concentración 3 órdenes de magnitud mayor de extracto celular de *Bacillus thuringiensis* ATCC10792, 10.820 μ g de proteína/mL, para llevar a cabo la misma degradación (datos no publicados). Por todas sus características, la cepa 20J es un candidato prometedor para el control de patógenos relacionados con la salud humana, acuicultura, animales y plantas o en la inhibición de la formación de *biofilms* (Romero, 2010) y por ello estas aplicaciones ha sido protegidas mediante patente (ES 2342807 B2).

No obstante, no se ha podido identificar hasta la fecha el gen responsable de su actividad QQ o de su actividad degradadora de señales de QS, en particular, señales AHLs. La identificación y caracterización de dicho gen permitiría disponer fácilmente de cantidades importantes del producto responsable de dicha actividad, lo que facilitaría y generalizaría su empleo en todo tipo de aplicaciones en las que resulta necesario el control de poblaciones bacterianas que producen señales de QS.

Los esfuerzos realizados hasta la fecha para intentar clonar el gen o genes responsables de la actividad QQ sobre señales de QS, en particular AHLs, mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores degenerados, diseñados para las secuencias conservadas de las lactonasas y acilasas descritas en la bibliografía o mediante la construcción de una biblioteca genómica en plásmido con la que se transformó la cepa productora de AHLs *P. aeruginosa* PAOI, portadora del plásmido QSI1 pMH655 (Rasmussen et al., 2005), que fue diseñada para la detección de QQ, ya que la cepa no puede sobrevivir en presencia de sacarosa y AHL, resultaron infructuosos. En concreto, ninguna de dichas metodologías resultó en la detección de los genes responsables de actividad QQ de la cepa 20J (datos no publicados), lo que es indicativo de la existencia de diferencias importantes entre la enzima con actividad QQ de la cepa 20J y las enzimas con actividad QQ descritas hasta la fecha.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Se describe la clonación, secuenciación y caracterización del gen responsable de la actividad QQ de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426) que codifica un péptido con actividad inhibidora de señales de QS, en particular, con actividad lactonasa, en ocasiones denominado "Aii20J" en esta descripción, que presenta un porcentaje de identidad inferior al 38% con respecto a las secuencias de otras lactonasas descritas hasta la fecha para otras especies, así como frente a las secuencias de los genes homólogos presentes en otras especies del género *Tenacibaculum* cuya actividad QQ ya ha sido descrita con anterioridad (ES2342807 B2).

10 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de Quorum Sensing (QS).

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicho polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende dicho polinucleótido, o dicho vector, o el péptido codificado por dicho polinucleótido, con la condición de que dicha célula no es una bacteria del género *Tenacibaculum*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un organismo no humano transgénico que comprende, insertado en su genoma, dicho polinucleótido o dicho vector, con la condición de que dicho organismo no es una bacteria del género *Tenacibaculum*.

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un péptido codificado por la secuencia nucleotídica de dicho polinucleótido.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido. En una realización particular, dicha composición comprende, además, un vehículo seleccionado entre un vehículo apto para alimentación, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vehículo agrícolamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio que comprende dicha composición y un vehículo apto para alimentación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, en la elaboración de un producto alimenticio.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dicha composición y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, en la elaboración de un
10 medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición agrícola que comprende dicha composición y un vehículo agrícolamente aceptable.

- 15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con dicho péptido, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, bajo condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende transformar dicha planta con dicho polinucleótido o vector, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS.

25

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende el empleo de una bacteria transformada con dicho polinucleótido o vector, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, bajo
30 condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, para provocar un proceso de quorum quenching (QQ) en respuesta a un proceso de QS, en donde dicho proceso
35 de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para provocar un proceso de QQ en respuesta a un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, bajo condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, para inhibir un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para inhibir un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, bajo condiciones que permiten inhibir dicho proceso de QS.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para degradar una señal de QS, que comprende poner en contacto dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, con dicha señal de QS, bajo condiciones que permiten degradar dicha señal de QS.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para modular la actividad señalizadora de una N-acil-homoserin lactona (AHL), que comprende poner en contacto dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, con dicha AHL, bajo condiciones que permiten modular la actividad señalizadora de dicha AHL.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, para inhibir la formación de un biofilm bacteriano *ex vivo* o *in vitro*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de un biofilm bacteriano, en donde dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de QS, que comprende poner en contacto dicho polinucleótido, vector, célula, organismo no humano transgénico o péptido, con

dicha bacteria productora de señales de QS, bajo condiciones que permiten inhibir la formación de dicho biofilm bacteriano.

En realizaciones particulares de la invención, dichas señales de QS producidas por la bacteria comprenden una AHL, en donde dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en donde dicha AHL no sustituida se selecciona del grupo formado por C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y sus combinaciones; (ii) una AHL oxo- o hidroxí- sustituida, en donde dicha AHL oxo- o hidroxí- sustituida se selecciona del grupo formado por OC6-HSL, OC12-HSL y sus combinaciones; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Fotografía del clon positivo 13-E2 obtenido en el cribado de la biblioteca genómica de la cepa 20J. Se observa que el pocillo aparece sin pigmento violaceína, a diferencia del resto de pocillos de la placa microtiter, por la degradación de la AHL añadida exógenamente.

Figura 2: Análisis HPLC-MS de degradación de C6-HSL tras 24 horas por extractos celulares del clon positivo 13-E2 (ECC 13E2). Controles: PBS y *E. coli* DH10 β sin el fósido (ECC DH10 β). Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras sombreadas).

Figura 3. Análisis HPLC-MS de degradación de C10-HSL tras 24 horas por extractos celulares del clon positivo 13-E2 (ECC 13E2). Controles: PBS y *E. coli* DH10 β sin el fósido (ECC DH10 β). Se acidificó a pH 2 para recuperar el anillo lactona (barras sombreadas).

Figura 4. Fotografía del bioensayo en medio sólido de 3 de los clones positivos de la segunda genoteca construida a partir del inserto del clon 13-E2 seleccionados al azar (1-E6, 1-G7 y 4-A9) y 1 clon negativo (1-E9) con los biosensores de AHLs *C. violaceum* CV026 (A) y *C. violaceum* VIR07 (B). Todos los clones ensayados fueron capaces de degradar C6-HSL y C10-HSL tras 24 horas impidiendo la formación del halo de violaceína en los biosensores. El pocillo con violaceína se corresponde con un clon negativo confirmado (1-E9) usado como control.

Figura 5. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *aai20J* con la lactonasa *aaiA* de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al., 2000, número de acceso AF196486).

Figura 6. Alineamiento de la secuencia aminoácídica de lactonasa de 20J (Aii20J) y las lactonasas de distintas especies del género *Bacillus*. El motivo conservado característico de las metalo- β -lactamasas (HXHXDH), aparece entre los aminoácidos 138 y 143 de la figura.

Figura 7. Resultados del bioensayo para degradación de C6-HSL (arriba) y C10-HSL (abajo) por células vivas de distintas especies del género *Tenacibaculum*. Las bacterias se cultivaron en Caldo Marino durante 24 horas y a continuación se resuspendieron en PBS pH 6,5 al que se añadió la AHL a una concentración de 2 μ g/mL. La degradación se visualizó mediante el ensayo de activación de la producción de violaceína en los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 que producen este pigmento sólo en presencia de AHL (Romero et al., 2011).

Figura 8. Alineamiento de las lactonasas de *Tenacibaculum* sp. 20J (Aii20J), *T. discolor* (AiiTD), *T. gallaicum* (AiiTG), *T. lutimaris* (AiiTL), *T. aestuarii* (AiiTA) y *T. soleae* (AiiTS) obtenidas mediante amplificación con primers diseñados para los extremos de Aii20J. Para alinear las secuencias de las distintas lactonasas y de sus respectivas secuencias nucleotídicas se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

Figura 9. Árbol filogenético mediante el método neighbor-joining de las secuencias aminoacídicas de Aii20J de *Tenacibaculum* sp. 20J, AiiTD de *T. discolor*, AiiTG de *T. gallaicum*, AiiTS de *T. soleae*, AiiTL de *T. lutimaris*, AiiTA de *T. aestuarii*, AiiA de *B. subtilis* (número de acceso AAY51611.1), AiiA de *B. cereus* (AAY22194.1), AiiA de *B. thurigiensis* (AAO43435.1), AiiA de *uncultured Bacillus* sp. (CAD44268.1), AiiA AI96 de *Bacillus* sp. AI96 (ADK91097.1), AttM/AiiB de *A. tumefaciens* (AAL13075.1), AhlK de *K. pneumoniae* (AAO47340.1) y AhlD de *Arthrobacter* sp. (AAP57766.1). Barra de escala: 0,2 sustituciones de aminoácidos por sitio.

Figura 10. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1%. Calle M: marcador de peso molecular (pb). 1: miniprep de un cultivo de XL1blue transformado con pET28c(+) con el inserto de Aii20J. 2: doble digestión de esta miniprep con EcoRI y NcoI, el inserto del gen Aii20J (861 pb) aparece en el tamaño correspondiente.

Figura 11. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular (pb). 1: PCR de una de las colonias recombinantes obtenidas por electroporación en BL21(DE3) con los primers TEN1F y TEN1R, aparece el fragmento entre los dominios homólogos internos (237 pb) en el tamaño correspondiente.

5

Figura 12. Gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie del extracto celular de cultivos de 24 h de *E. coli* BL21(DE3) pET28c+, *E. coli* BL21(DE3) pET28c+ Aii20J y *E. coli* BL21(DE3) pET28c+ Aii20J inducido con IPTG. Marcador molecular (en kDa) en la calle de la izquierda.

10

Figura 13. Gel de electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de coomasie de la proteína Aii20J purificada a partir del extracto de un cultivo de 24 h de *E. coli* BL21DE3 pET28c+ Aii20J. Se utilizó una columna de afinidad por histidina para la purificación de proteínas (His GraviTrap™ affinity columns, GE Healthcare). La banda obtenida de proteína (~34,9 kDa) en la calle del gel pertenece a la fracción recogida de la purificación. Marcador molecular (en kDa) en la calle de la izquierda.

15

Figura 14: Bioensayo para determinar la Concentración Mínima Activa (CMA) de Aii20J frente a C6-HSL (CV026) y C10-HSL (VIR07). Se incubaron distintas diluciones de una solución de AiiA de 0,2 mg/mL con las AHLs a una concentración 10 µM durante 3 horas (panel superior) y 24 horas (panel inferior). Se consideró como CMA la concentración de la mayor dilución que logró eliminar completamente la señal (ausencia de halo de violaceina) en el tiempo estipulado.

25

Figura 15: Análisis HPLC-MS de degradación a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 180 min) de C6-HSL (rombos) y C10-HSL (triángulos) a una concentración de 10 µM por Aii20J purificada. La concentración de Aii20J fue 10 veces mayor que la CMA (20 µg/mL). Los datos son la media de 3 reacciones independientes, mostrándose la media y la desviación estándar. Como control se evaluó la variación en el tiempo de la concentración de una solución de C6-HSL en PBS (cuadrados).

30

Figura 16. Degradación de distintas AHLs por una solución de 20 µg/mL de Aii20J en el periodo de 1 hora a una temperatura de 22°C. Se representa el porcentaje de AHL no degradado, medido por HPLC-MS.

35

Figura 17. Fotografía del bioensayo en medio sólido de resistencia a pH de Aii20J purificada a una concentración final de 20 µg/mL a 22°C con distintos buffers (valores de 3-9 pH) para las dos señales C6-HSL (placa izquierda) y C10-HSL (placa derecha). Las AHLs se incubaron durante 3 horas con el enzima previamente tratado al pH que se indica.

Figura 18. Efecto de la Quimiotripsina (Panel inferior) y la Proteinasa K (panel superior) sobre la actividad enzimática de Aii20J. Aii20J (20 µg/mL) se incubó con soluciones de ambas enzimas (proteínasa K/Aii20J 1:10 y quimiotripsina/Aii20J 1:60) durante 30 ó 60 minutos y a continuación se añadió C6-HSL o C10-HSL para evaluar la actividad del enzima. Los pocillos centrales se corresponden con el control negativo de PBS más la AHL correspondiente y con halo de violaceína aparecen los controles negativos de la proteinasa K y quimiotripsina tratada en las mismas condiciones que las muestras pero sin la enzima Aii20J.

Figura 19: Análisis HPLC-MS de la capacidad de degradación de C6-HSL por Aii20J purificada previo tratamiento con distintas temperaturas (22, 60, 80 y 90°C) durante 10 minutos. La concentración de la proteína fue de 20 µg/mL. El control (barra con puntos) se realizó en PBS.

Figura 20. Fotografía del bioensayo en medio sólido del CCE de *E. coli* BL21DE3 con el plásmido pET28c(+) y Aii20J para C6-HSL. La actividad de 20J dentro del extracto resistió al tratamiento con todas las temperaturas degradando la señal C6-HSL a las 3 horas impidiendo la formación del halo de violaceína en el biosensor. Los pocillos centrales se corresponden con los controles negativos de PBS con la misma concentración de AHL (10 µM).

Figura 21. Se muestra la ausencia de interferencia de Aii20J con la acción de algunos antibióticos β-lactámicos. Se muestra un antibiograma de pocillos de diferentes antibióticos del grupo de las cefalosporinas frente a *Staphylococcus aureus*. En la placa de la izquierda se muestran los antibióticos no tratados. En la placa de la derecha se muestran los antibióticos tratados con Aii20J (20 µg/mL durante 24 horas). El diámetro de los halos de inhibición no se vio afectado por el tratamiento con el enzima para ninguno de los antibióticos e inhibidores de la β-lactamasa probados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Polinucleótido de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido, en adelante “polinucleótido de la invención”, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de Quorum Sensing (QS).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “Quorum Sensing” o “QS”, también conocido como “detección de quorum”, se refiere a la capacidad de un microorganismo para percibir y responder a la densidad poblacional mediante la regulación de la expresión genética, siendo así capaz de desarrollar un comportamiento social coordinado. Así, las bacterias comunican su presencia a las demás usando pequeñas moléculas de señalización química, conocidas como “señales de QS”, que liberan, detectan y responden a la acumulación en el medio de tales señales. La detección de dichas señales QS permite a la bacteria distinguir entre una alta densidad de población y una baja densidad de población, de modo que, a medida que crece la población bacteriana se incrementa el nivel extracelular de la molécula señal, hasta que se alcanza una concentración umbral que equivale a un censo mínimo o quorum que desencadena una variación de la expresión génica bacteriana en respuesta a cambios en el número de células. Se conocen 4 tipos principales de señales QS:

- a) N-acil-homoserín lactonas (AHLs), basadas en un anillo lactona (HSL) al que se une, mediante enlace amida, un ácido graso que constituye la cadena lateral; dicha cadena lateral tiene, normalmente, una longitud de entre 4 y 18 átomos de carbono, puede estar saturada o insaturada y puede presentar o no sustituciones oxo- o hidroxí- en el tercer átomo de carbono; ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como, por ejemplo, N-hexanoil-L-homoserín lactona (C4-HSL), N-hexanoil-L-homoserín lactona (C6-HSL), N-octanoil-L-homoserín lactona (C8-HSL), N-decanoil-L-homoserín lactona (C10-HSL), N-dodecanoil-L-homoserín lactona (C12-HSL), N-tetradecanoil-L-homoserín lactona (C14-HSL), etc., así como AHLs oxo- o hidroxí- sustituidas, tales como, por ejemplo, N-oxohexanoil-L-homoserín lactona (OC6-HSL), N-oxododecanoil-L-homoserín lactona (OC12-HSL), etc. Este tipo de señales AHLs son bastante habituales en bacterias Gram-negativas aunque también se han descubierto en otros phyla (e.g., en

algunas cianobacterias, en miembros de Citofaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), también conocidos como Bacteroidetes);

b) Péptidos autoinductores (AIPs), corresponden a péptidos de bajo peso molecular (presentan habitualmente entre 5 y 34 restos de aminoácidos), que sufren modificaciones post-traduccionales; se conocen diferentes familias de AIPs. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos AIPs incluyen la nisina, el AIP-1 de estafilococos así como unos péptidos de triptófano isoprenilado. Este tipo de señales AIPs son bastante habituales en bacterias Gram-positivas; y

c) Autoinductores de tipo 2 (AI-2), cuya estructura es un diéster furanosil borato, que se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de este AI-2 incluyen (2S,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato, (2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato, etc.

d) AI-3, cuya estructura no se conoce y se cree relacionada con la comunicación entre procariotas y eucariotas, que establece mecanismos de señalización cruzada con las hormonas eucariotas epinefrina y norepinefrina, y que se ha descrito en cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* y otras enterobacterias.

En el sentido utilizado en esta descripción, un péptido con “actividad inhibidora de Quorum Sensing (QS)”, se refiere, en general, a un péptido que inhibe un proceso de QS mediado por señales de QS, en donde dichas señales de QS se seleccionan entre AHLs, APIs, AI-2, AI-3 y combinaciones de las mismas.

En una realización particular, dicho péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que inhibe las señales mediadas por AHLs hidrolizando el anillo lactona presente en dichas AHLs, tal como un péptido con actividad lactonasa, es decir, un péptido que hidroliza la lactona (anillo HSL) generando el correspondiente ácido hidroxi-carboxílico. La actividad lactonasa del péptido de la invención (definido más adelante) puede determinarse mediante diversos ensayos enzimáticos conocidos por el técnico en la materia. En general, todos los ensayos enzimáticos adecuados para tal fin miden el sustrato consumido o el producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. En un caso particular, la actividad enzimática puede determinarse midiendo la velocidad inicial de reacción, método mediante el cual las

mediciones se realizan en un periodo muy corto de tiempo y en concentraciones saturantes de sustrato, por lo que la concentración de sustrato libre se considera igual al sustrato inicial y la velocidad medida es la máxima alcanzada en las condiciones de reacción dadas. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medida del progreso de la curva durante la reacción, en donde se determina la concentración del sustrato consumido o del producto obtenido como una función del tiempo. En otro caso particular, la actividad enzimática puede determinarse mediante la medida de la concentración de sustrato o de producto en la rápida fase inicial transitoria de la reacción enzimática en la que el complejo molecular intermedio llega a un periodo cinético constante. En otra realización particular, la actividad enzimática puede determinarse en la fase de equilibrio de la reacción, que consiste en la alteración del equilibrio de la reacción enzimática modificando las condiciones de reacción tales como temperatura, pH, presión, etc. y el estudio de cómo regresa de nuevo a las condiciones de equilibrio la mezcla de enzima, sustrato y producto.

La actividad lactonasa de un péptido puede ser determinada por cualquier método convencional adecuado conocido por los expertos en la materia. Dicho método puede basarse en la determinación de la cantidad de sustrato consumido o de producto generado en la reacción durante un periodo de tiempo determinado. Para ello, se utilizará el sustrato adecuado para la actividad lactonasa a ensayar. En la parte experimental que acompaña a esta descripción, se describen distintos ensayos adecuados para determinar la actividad lactonasa de un péptido (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3, apartado 3.3).

En una realización particular, la actividad lactonasa de un péptido se determina mediante la hidrólisis de una lactona, preferentemente, una AHL, tal como una AHL no sustituida, por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, o una AHL oxo- o hidrox- sustituida, por ejemplo, OC6-HSL u OC12-HSL. A modo ilustrativo, no limitativo, la actividad lactonasa de un péptido puede llevarse a cabo mediante un ensayo que comprende poner en contacto dicho péptido con el sustrato correspondiente, por ejemplo, C6-HSL, C10-HSL, OC6-HSL, etc., bajo condiciones apropiadas y, posteriormente, evaluar la presencia de sustrato no degradado mediante un bioensayo en placa con las cepas bioindicadoras *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, o bien mediante análisis de la cinética de degradación de sustrato (e.g, una AHL tal como C6-HSL, C10-HSL u OC6-HSL) por el péptido en estudio y valoración de la concentración de AHL mediante HPLC-MS de acuerdo con la metodología especificada en Romero et al. 2011.

En otra realización particular, dicho péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales del tipo AIPs, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el péptido AIP o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AIP. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AIPs puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, tales como los descritos en Boles and Horswill, 2008.

En otra realización particular, dicho péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales del tipo AI-2, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el AI-2 o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AI-2. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AI-2 puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la actividad de degradación de AI-2 se determina empleando cultivos de diferentes cepas de la especie marina bioluminiscente *Vibrio harveyi* con mutaciones específicas en los sistemas de QS que controlan la producción de luz, a los que se añade el péptido con actividad inhibidora de QS, y se evalúa la cantidad de luz producida. En concreto, en la cepa JMH597 de esta especie, sólo el canal de AI-2 está activo (AHL-, AI-2 +, CAI-1-), por lo que en caso de que el péptido añadido al cultivo tenga actividad QQ contra AI-2, no se produciría luz en esta cepa en concreto.

En otra realización particular, dicho péptido con actividad inhibidora de QS es un péptido que degrada o inhibe las señales mediadas por AI-3, tal como un péptido con actividad hidrolasa, es decir, un péptido que hidroliza el péptido AI-3 o que inhibe la actividad de la señal mediada por dicho AI-3. La actividad inhibidora de las señales mediadas por AI-3 puede ser determinada por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, tales como los descritos en Hughes et al, 2009.

La SEQ ID NO: 1 ha sido identificada a partir de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), una bacteria marina con alta capacidad de degradación de señales AHL, tal como se menciona en la patente española ES2342807, mediante un ensayo basado en la construcción de una librería genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J en fósido y screening funcional, tal como se describe en el Ejemplo 1. Dicha SEQ ID NO: 1 codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 (definido más adelante), codificado por dicha SEQ ID NO:

1, inhibe las señales de QS mediadas por AHLs ya que tiene, al menos, actividad lactonasa e hidroliza AHLs (Ejemplo 3).

Por tanto, en una realización particular, el polinucleótido de la invención comprende la
5 secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 incluye tanto el codón de inicio (ATG) como el de terminación (TAA).

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos del polinucleótido consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del polinucleótido cuya
10 secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 1.

En el sentido utilizado en esta descripción, un polinucleótido es “sustancialmente homólogo” al polinucleótido de SEQ ID NO: 1 cuando su secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en la
15 SEQ ID NO: 1 de, al menos, un 76%, ventajosamente de, al menos un 85%, preferentemente de, al menos, un 90%, más preferentemente de, al menos, un 91%,
20 92%, 93%, 95%, 96%, 97% ó 98%, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99%. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de
alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. 1990). A modo ilustrativo, un polinucleótido
25 sustancialmente homólogo al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 se puede construir en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO:
1 mediante la introducción de, por ejemplo, nucleótidos o codones que codifican aminoácidos que constituyen sustituciones conservativas o no conservativas con
30 respecto a los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Otros ejemplos ilustrativos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más
nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En el sentido utilizado en esta descripción, un polinucleótido es “funcionalmente equivalente” al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste

en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 cuando codifica un péptido que tiene actividad inhibidora de QS. La actividad inhibidora del péptido codificado por polinucleótido funcionalmente equivalente al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 puede ser determinada por métodos convencionales de determinación de dicha actividad inhibidora de QS (e.g., actividad inhibidora de señales mediadas por AHLs, AIPs, AI-2 y/o AI-3), tales como los mencionados previamente.

En una realización particular, el polinucleótido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del mismo, es decir, es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 76%, ventajosamente de, al menos un 85%, preferentemente de, al menos, un 90%, más preferentemente de, al menos, un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ó 98%, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99%, con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. En una realización concreta, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 76% con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. En otra realización concreta, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 90% con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS. En otra realización concreta, el polinucleótido de la invención es un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad de al menos un 99% con respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS.

El polinucleótido de la invención puede encontrarse como tal o formando parte de una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende dicho polinucleótido de la invención.

La construcción génica de la invención puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “operativamente unida” significa que el péptido de la invención, codificado por el polinucleótido de la invención, es expresado en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión. Las secuencias de

- control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del péptido de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. En una realización particular,
- 5 dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamífero, etc. Ventajosamente, la construcción de la invención comprende, además, un
- 10 marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción. La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook et al., 2001).
- 15 La construcción génica de la invención puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector recombinante, en adelante vector de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. En una
- 20 realización particular, el vector de la invención es un vector de expresión. A modo ilustrativo, no limitativo, el vector donde se introduce el polinucleótido de la invención puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores en los que puede insertarse el polinucleótido de la invención o la construcción
- 25 génica de la invención incluyen el plásmido pET28c(+). La obtención del vector de la invención puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001). En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar células competentes de *Escherichia coli* (Ejemplo 3).
- 30 El vector de la invención puede ser utilizado para transformar células susceptibles de ser transformadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. El vector de la invención puede ser utilizado para transformar células eucariotas, tales como levaduras, por ejemplo, *Pichia pastoris*, etc., o microalgas, por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*, etc., o células procariotas, tales como bacterias,
- 35 por ejemplo, *E. coli*, etc.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, en adelante célula de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un cassette de expresión proporcionado por esta invención, o un vector de la invención, y es capaz de expresar la proteína de la invención, o bien un péptido de la invención (definido más adelante), con la condición de que dicha célula de la invención no es una bacteria del género *Tenacibaculum*. El término “célula”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la unidad más pequeña que mantiene las propiedades fundamentales de la vida, y, comprende células procarióticas, eucarióticas y mesocarióticas, así como células de organismos unicelulares (e.g., bacterias) y multicelulares (e.g., animales, plantas). Así, a modo ilustrativo, la célula de la invención puede ser una célula eucariota, tal como por ejemplo, una célula de tejido vegetal, una levadura, una microalga, etc., una célula procariota, tal como una bacteria, por ejemplo, *E. coli*, etc. La obtención de células de tejidos vegetales que comprenden un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un cassette de expresión proporcionado por esta invención, un vector de la invención, o un péptido de la invención (definido más adelante) puede ser muy interesante desde diversos puntos de vista, por ejemplo, para aumentar la resistencia a bacterias patógenas, en particular, bacterias productoras de señales de QS. Las células de la invención pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001). En una realización particular, dicha célula de la invención es una célula hospedadora transformada con un vector de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un organismo no humano transgénico, en adelante “organismo transgénico de la invención”, que comprende, insertado en su genoma, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un cassette de expresión proporcionado por esta invención o bien un vector de la invención, con la condición de que dicho organismo no humano no es una bacteria del género *Tenacibaculum*. El organismo transgénico de la invención puede ser una planta, por ejemplo, de tabaco, patata, tomate, cebolla, algodón, lino, café, chocolate, caucho, roble, castaño, cerezo, etc., un cereal, por ejemplo, maíz, trigo, arroz, cebada, avena, etc., o bien un animal, por ejemplo, pez cebra, salmón, conejo, ratón, etc. Debido a que el polinucleótido de la invención codifica un péptido con actividad inhibidora de QS, el organismo transgénico de la invención será resistente, o sustancialmente más resistente que el correspondiente organismo no transgénico que no contiene insertado en su genoma el polinucleótido de la invención, a las infecciones causadas por organismos, por ejemplo, bacterias, que producen señales QS y/o podrá

provocar un proceso de Quorum Quenching (QQ) en respuesta a un proceso de QS. El organismo transgénico de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001); dichos métodos incluyen el empleo de pistolas de genes o el uso de bacterias o virus como vectores para transferir el polinucleótido de la invención. Dong et al (2001) describen la obtención de plantas de tabaco y de patata transformadas con la secuencia correspondiente a una lactonasa de *Bacillus* sp. con actividad sobre AHLs, por lo que el organismo transgénico de la invención puede ser obtenido, por ejemplo, mediante los métodos descritos en dicha publicación.

2. Péptido de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un péptido, en adelante “péptido de la invención”, cuya secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido de la invención.

El término “péptido”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de su longitud, e incluye tanto cadenas de aminoácidos de 10 o menos aminoácidos (en algunas publicaciones identificados como “oligopéptidos”) como cadenas de aminoácidos de más de 10 aminoácidos, por ejemplo, más de 100 aminoácidos.

En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia codificada por el polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 1. Dicho péptido tiene actividad inhibidora de QS. Las características de dicha actividad inhibidora de QS han sido mencionadas previamente en relación con el polipéptido de la invención así como los ensayos para identificar si un determinado péptido tiene o no dicha actividad inhibidora de QS. Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2, inhibe QS, tales como las señales mediadas por AHLs, por lo que, al menos, tiene actividad lactonasa e hidroliza AHLs (Ejemplo 3).

En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos del péptido de la invención consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En ocasiones, dicho péptido ha sido denominado “Aii20J” en esta descripción.

En otra realización particular, el péptido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

5

En el sentido utilizado en esta descripción, un péptido es “sustancialmente homólogo” al péptido de SEQ ID NO: 2 cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de, al menos, un 76%, ventajosamente de, al menos un 85%, preferentemente de, al menos, un 90%, más preferentemente de, al menos, un 91%, 92%, 93%, 95%, 96%, 97% ó 98%, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99%. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. 1990). A modo ilustrativo, un péptido sustancialmente homólogo al péptido cuya secuencia de nucleótidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 se puede construir en base a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 mediante la introducción de, por ejemplo, aminoácidos que constituyen sustituciones conservativas o no conservativas con respecto a los aminoácidos presentes en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Otros ejemplos ilustrativos de posibles modificaciones incluyen la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos (amino o carboxilo), la inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

25

En el sentido utilizado en esta descripción, un péptido es “funcionalmente equivalente” al péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 cuando tiene actividad inhibidora de QS. La actividad inhibidora del péptido funcionalmente equivalente al péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 puede ser determinada por métodos convencionales de determinación de dicha actividad inhibidora de QS (e.g., actividad inhibidora de señales mediadas por AHLs, AIPs, AI-2 y/o AI-3), tales como los mencionados previamente.

35

En una realización particular, el péptido de la invención es una variante sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente del mismo, es decir, es un

péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 76%, ventajosamente de, al menos un 85%, preferentemente de, al menos, un 90%, más preferentemente de, al menos, un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ó 98%, y, todavía más preferentemente de, al menos un 99%, con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS. En una realización concreta, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 76% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS. En otra realización concreta, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 93% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS. En otra realización concreta, el péptido de la invención es un péptido cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de al menos un 99% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 2 y tiene actividad inhibidora de QS.

El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

Asimismo, el experto en la materia entenderá que dentro de dichas variantes sustancialmente homólogas y funcionalmente equivalentes del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 se encuentran los fragmentos peptídicos que satisfacen tales condiciones.

El péptido de la invención puede encontrarse como tal o formando parte de una proteína de fusión, la cual constituye un aspecto adicional de la presente invención. Dicha proteína de fusión comprende, por tanto, un polipéptido A que comprende un péptido de la invención, y un polipéptido B, donde dicho polipéptido B es un polipéptido diferente a dicho polipéptido A. El polipéptido B puede estar unido a cualquier extremo del polipéptido A. Así, en una realización particular, el extremo amino terminal del polipéptido B está unido al extremo carboxilo terminal del polipéptido A, mientras que, en otra realización particular, el extremo carboxilo terminal del polipéptido B está unido al extremo amino terminal del polipéptido A. Ambos polipéptidos A y B pueden estar unidos directamente entre sí, o bien a través de un péptido espaciador (linker) entre dichos polipéptidos A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos

convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas. El polipéptido A comprende un péptido de la invención, cuyas características ya han sido mencionadas y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, la proteína de fusión de la invención tiene actividad inhibidora de QS, en particular, inhibidora de señales de QS mediadas por AHLs, más concretamente, actividad lactonasa para hidrolizar AHLs. El polipéptido B es un polipéptido “diferente” al polipéptido A, es decir, es un polipéptido distinto al polipéptido A; en este sentido, en una realización particular, el polipéptido B es un péptido diferente a un péptido de la invención, mientras que, en otra realización particular, el polipéptido B es un péptido de la invención pero diferente al péptido de la invención concreto comprendido en el polipéptido A en una proteína de fusión de la invención determinada. Prácticamente cualquier polipéptido puede ser utilizado como polipéptido B en la proteína de fusión de la invención, siempre y cuando cumpla la condición de que es diferente del polipéptido A. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de péptidos que pueden ser utilizados como polipéptido B en la presente invención incluyen péptidos útiles para aislar y/o purificar proteínas, etc. Así, en una realización particular, dicho polipéptido B es un péptido útil para aislar y/o purificar proteínas. En general, dicho péptido útil para aislar y/o purificar proteínas estará situado en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del péptido de la invención. Prácticamente cualquier péptido que pueda ser utilizado para aislar y/o purificar una proteína de fusión (denominados genéricamente “péptidos etiqueta” o “tag”) puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicho péptido útil para aislar y/o purificar una proteína, tal como una proteína de fusión, puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, etc. En una realización particular y preferida de dicha proteína de fusión, dicho polipéptido B comprende una cola de polihistidinas.

Ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el péptido de la invención, en particular, el péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, es estable bajo determinadas condiciones. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “estable” se refiere a la capacidad del péptido de la invención de mantener su actividad inhibidora de QS bajo determinadas condiciones, por ejemplo, pH, proteinasas, entre otras, y que además carece de actividad frente a antibióticos β -lactámicos e inhibidores de β -

lactamasas. Así, se ha observado, que dicho péptido de la invención, además de tener actividad lactonasa de amplio espectro, degradando AHLs con cadenas laterales comprendidas entre 4 y 14 átomos de carbono, tanto oxo- o hidrox- sustituidas como no sustituidas, es resistente a pH en el intervalo comprendido entre 3 y 9, es resistente a proteinasa K y quimiotripsina, y no interactúa con antibióticos β -lactámicos (e.g., Penicilina G, Meticilina, Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefaclor, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefoperazona, Imipenem y Meropenem) ni con inhibidores de las β -lactamasas (e.g., Sulbactam y ácido clavulánico), tal como se aprecia en el Ejemplo 3.

La estabilidad de un péptido puede ser determinada empleando diversos ensayos conocidos por los técnicos en la materia. Algunos de dichos ensayos se basan en determinar la conservación (o pérdida) de la actividad del péptido bajo determinadas condiciones. A modo ilustrativo, no limitativo, la estabilidad de un péptido puede determinarse mediante los ensayos mencionados en el Ejemplo 3.

El péptido de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Aunque dicho péptido de la invención puede aislarse a partir de un organismo productor del mismo, e.g., *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), en una realización particular y preferida, dicho péptido de la invención puede obtenerse por métodos basados en la tecnología del ADN recombinante.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de un péptido de la invención, que comprende cultivar una célula de la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido y, si se desea, recuperar dicho péptido del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula dependerán de la célula utilizada. El experto en la materia conoce tales condiciones. El procedimiento para producir el péptido de la invención incluye, opcionalmente, el aislamiento y purificación de dicho péptido de la invención.

3. Aplicaciones

Debido a la actividad inhibidora de QS del péptido de la invención, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención, o el péptido de la invención presentan multitud de potenciales aplicaciones en diferentes sectores de la técnica, entre los que se encuentran el sector alimentario, el farmacéutico y el agrícola.

En general, para su administración y/o empleo, el péptido de la invención, o el polinucleótido de la invención, o el vector de la invención, o la célula de la invención, o el organismo transgénico de la invención, se combinará con un vehículo adecuado.

- 5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante composición de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención, o un péptido de la invención.
- 10 Por razones de simplicidad, en esta descripción, se hará referencia, en ocasiones, al polinucleótido de la invención, vector de la invención, célula de la invención, organismo transgénico de la invención, o péptido de la invención, con la denominación genérica “componente activo de la invención”.
- 15 Las características del componente activo (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico, o péptido de la invención) en la composición de la invención ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, el componente activo de la invención, presente en la composición de la invención, se selecciona del grupo formado por un polinucleótido de la invención, un
- 20 vector de la invención, una célula de la invención y un péptido de la invención, preferentemente, un polinucleótido de la invención o un péptido de la invención.

Como se ha mencionado previamente, el componente activo de la invención puede estar presente en un vehículo adecuado para su administración y/o empleo. En

25 general, dicho vehículo se elegirá dependiendo de la aplicación a la que vaya destinado el componente activo de la invención y de su forma de administración. No obstante, en una realización particular, el vehículo en el que puede estar presente el componente activo de la composición de la invención es un vehículo seleccionado entre:

- 30
 - un vehículo apto para alimentación;
 - un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
 - un vehículo agrícolamente aceptable.

3.1 Aplicaciones en el sector alimentario

35

En una realización particular, la composición de la invención comprende un componente activo de la invención junto con un un vehículo apto para alimentación.

Así, de acuerdo con esta realización particular, la composición de la invención es un producto alimenticio. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "producto alimenticio" incluye cualquier sustancia o producto de cualquier naturaleza, sólido o

5 líquido, natural o transformado, que por sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación, sea susceptible de ser habitual o idóneamente utilizado en alguno de los fines siguientes: a) para la normal nutrición humana o animal o como fruitivos; o b) como aditivos o productos dietéticos, en casos especiales de alimentación humana o animal. Asimismo, dicho término también incluye

10 los piensos o materias naturales y productos elaborados, de cualquier origen, que, por separado o convenientemente mezclados entre sí, resulten aptos para la alimentación animal. El término "producto alimenticio", tal como aquí se utiliza también incluye composiciones nutracéuticas, es decir, composiciones adecuadas para su empleo en humanos o animales que comprenden uno o más productos naturales con acción

15 terapéutica o que proporcionan un beneficio para la salud o que han sido asociados con la prevención o disminución de enfermedades, por ejemplo, bacterias probióticas, etc., e incluye suplementos dietéticos presentados en una matriz no alimenticia (e.g., cápsulas, polvo, etc.) de un producto natural bioactivo concentrado presente usualmente (o no) en los alimentos y que, tomado en dosis superior a la existente en

20 esos alimentos ejerce un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal. Un alimento listo para consumir es aquel que no necesita ser diluido mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. En principio, los ingredientes presentes en un alimento listo para consumir están equilibrados y no se necesita añadir ingredientes adicionales al alimento para volverlo

25 listo para el consumo, tal como es considerado por un experto en la materia. Un alimento concentrado es aquel en el que uno o más ingredientes están presentes en mayor concentración que en un alimento listo para consumir, por lo que para su empleo, es necesario diluirlo mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de alimentos proporcionados por

esta invención incluyen tanto productos alimenticios destinados a consumo humano, como piensos y concentrados para alimentación animal, tales como piensos y concentrados alimenticios destinados a su uso en acuicultura o en cualquier animal, ya

30 sea animal de producción, doméstico o silvestre, tales como perros, gatos, bóvidos, óvidos, suidos, équidos, etc.

35 El empleo de un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención, o un péptido de la

invención, en la elaboración de un producto alimenticio, constituye un aspecto adicional de esta invención. En una realización particular, dicho producto alimenticio es una sustancia o producto susceptible de ser utilizado en alimentos, piensos, aditivos alimentarios, suplementos dietéticos, composiciones nutraceuticas, etc., tanto para
5 alimentación humana como animal.

3.2 Aplicaciones en el sector farmacéutico

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición
10 farmacéutica que comprende, además del componente activo presente en la composición de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Este tipo de composiciones resulta adecuado para la administración a un sujeto del componente activo presente en la composición de la invención. En general, dicho vehículo farmacéuticamente aceptable se elegirá en función de la naturaleza del componente
15 activo (e.g., polinucleótido de la invención, vector de la invención, célula de la invención o péptido de la invención), de la forma de presentación elegida, por ejemplo, sólida (e.g., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) y de la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral (e.g., intramuscular, subcutánea, intravenosa,
20 etc.), rectal, etc. En cada caso se elegirán los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía oral, parenteral o rectal, así como sobre la producción de dichas composiciones
25 farmacéuticas puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo
30 transgénico de la invención, o un péptido de la invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana. Expresado de otra manera, según este aspecto, la invención se relaciona con un componente activo de la invención (es decir, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la
35 invención, o un péptido de la invención) para su empleo en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana. En una realización particular, la bacteria causante de dicha infección bacteriana es una bacteria productora de señales QS. En

una realización concreta, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidroxí- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc. En otra realización particular, las infecciones causadas por bacterias productoras de las señales de QS son debidas a la formación de biofilms. Las bacterias que forman biofilm pueden ser, pero sin limitarse, bacterias de la cavidad oral tales como las causantes de caries y enfermedad periodontal, o bacterias que colonizan las superficies de los implantes médicos o de los dispositivos insertados en el organismo, tales como catéteres, prótesis, etc. Por tanto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una composición dentífrica. En otra realización particular, la composición farmacéutica está destinada a prevenir la formación de biofilms o a eliminar los biofilms ya formados sobre dispositivos o implantes médicos tales como catéteres, prótesis, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención también puede contener, si se desea, uno o más agentes antibacterianos, siempre y cuando no sean incompatibles con el componente activo de la invención presente en la composición de la invención. La combinación del componente activo de la invención con antibióticos puede ser una estrategia muy interesante en el tratamiento de enfermedades bacterianas causadas por bacterias multirresistentes.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser aplicada o administrada a un sujeto en necesidad de prevención y/o tratamiento. El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie animal, preferentemente, un mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento, una cantidad efectiva de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención, o de un componente activo de la invención. En una realización particular, dicha infección bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS. En una realización concreta, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas,

tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidroxil- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

- 5 Las características de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención así como de los componentes activos de la invención ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. Asimismo, las características de la forma de presentación y administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, así como de los componentes activos de la invención ya han sido
- 10 mencionadas previamente y se incorporan por referencia.

3.3 Aplicaciones en el sector agrícola

- En otra realización particular, la composición de la invención es una composición
- 15 agrícola que comprende, además del componente activo presente en la composición de la invención, un vehículo agrícolamente aceptable. Este tipo de composiciones resulta adecuado para la administración a las plantas del componente activo presente en la composición de la invención. En general, dicho vehículo agrícolamente aceptable se elegirá en función de la naturaleza del componente activo, de la forma de
- 20 presentación elegida, por ejemplo, sólida o líquida, etc. En cada caso se elegirán los ingredientes agrícolamente aceptables apropiados para la forma de administración elegida. Prácticamente cualquier vehículo agrícolamente aceptable puede ser utilizado en la elaboración de la composición agrícola proporcionada por esta invención; no obstante, en una realización particular, dicho vehículo agrícolamente aceptable
- 25 comprende un fertilizante, tal como, por ejemplo, un fertilizante, sólido o líquido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos fertilizantes sólidos incluyen fertilizantes sólidos de tipo NPK, etc. Alternativamente, puede utilizarse cualquier fertilizante líquido con un pH comprendido entre 3 y 9, donde el péptido de la invención mantiene su actividad inhibidora de QS; ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos fertilizantes
- 30 líquidos incluyen fertilizantes a base de ácidos fúlvicos, fertilizantes líquidos con distinta composición NPK, tales como las mezclas 16:2:4, 20:5:0, etc., o diversos tipos de fertilizantes en gotas con composición NPK de 8:9:9, 16:4:4, etc.

- La composición agrícola proporcionada por esta invención puede obtenerse por
- 35 métodos convencionales mediante la mezcla del componente activo con el vehículo agrícolamente aceptable.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana en plantas. En una realización particular, la bacteria causante de dicha infección bacteriana es una bacteria productora de señales QS. En una realización concreta, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidroxí- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

La composición agrícola proporcionada por esta invención también puede contener, si se desea, uno o más agentes antibacterianos, siempre y cuando no sean incompatibles con el componente activo de la invención presente en la composición de la invención.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede presentarse en cualquier forma de presentación adecuada para su administración o aplicación a las planta o al suelo que rodea a las plantas, por ejemplo, en forma sólida o líquida. Las formas de presentación líquidas son adecuadas para su pulverización sobre el suelo, la planta o el material vegetal, en general, o bien para crear un baño en el que se sumergen las plantas o el material vegetal.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede aplicarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la composición de la invención se aplica mediante pulverización al suelo, a la planta o al material vegetal, o bien mediante inmersión de la planta o el material vegetal en un baño que contiene la composición de la invención. Alternativamente, las semillas de las plantas pueden someterse a un tratamiento de pildoración con la composición agrícola proporcionada por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con un péptido de la invención, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS, bajo condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana. En una realización particular, el péptido de la invención se formula en una composición agrícola proporcionada por esta invención y esta se aplica sobre la planta a tratar. En otra realización particular, el péptido de la invención

se pone en contacto con la bacteria productora de señales de QS bajo condiciones que permiten el contacto y la interacción entre el péptido de la invención y las señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección. El experto en la materia entenderá que el péptido de la invención debe añadirse en una cantidad suficiente como para obtener resultados beneficiosos o deseados, es decir, en la cantidad apropiada para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar la progresión de estadios de enfermedades causadas por bacterias en plantas. Dicha cantidad puede administrarse en una sola aplicación o en varias aplicaciones. Asimismo, el experto en la materia conoce, o puede identificar, las condiciones de administración del péptido de la invención que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende transformar dicha planta con un polinucleótido de la invención, o con un vector de la invención, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS. La obtención de plantas transformadas con el polinucleótido o vector de la invención se lleva a cabo por métodos convencionales de transformación de plantas, basados, por ejemplo, en el empleo de vectores apropiados, así como en los métodos descritos en, por ejemplo, Izquierdo 1993 o Dong et al. 2011.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende el empleo de una bacteria transformada con un polinucleótido de la invención, o con un vector de la invención, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS.

En cualquiera de los 3 métodos previamente mencionados para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, la enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de QS. En una realización concreta, dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidrox- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

La composición agrícola proporcionada por esta invención puede ser aplicada o administrada a una planta en necesidad de controlar una enfermedad bacteriana. La

expresión “controlar una enfermedad bacteriana” en una planta hace referencia a prevenir y/o tratar la enfermedad bacteriana así como a mantener el control sobre una población bacteriana en niveles que no ocasionan daño para la planta ni efectos nocivos para los sujetos que se alimentan de dichas plantas. El término “planta”, tal como aquí se utiliza, incluye a cualquier ser vivo fotosintético.

3.4 Quorum quenching

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, para provocar un proceso de quorum quenching (QQ) en respuesta a un proceso de QS. Expresado alternativamente, este aspecto inventivo se relaciona con un método para provocar un proceso de QQ en respuesta a un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, bajo condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ en respuesta a dicho proceso de QS.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión provocar un “proceso de quorum quenching (QQ)” en respuesta a un proceso de QS hace referencia al desarrollo de una estrategia de inactivación del proceso de QS. Las características de los componentes activos de la invención (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención) ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. El experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la bacteria productora de señales de QS con el componente activo de la invención para provocar dicho proceso de QQ en respuesta a dicho proceso de QS; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el componente activo de la invención permanece estable y mantiene su actividad.

En una realización particular, la bacteria productora de señales de QS, es una bacteria que produce, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidrox- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Numerosas bacterias patógenas de plantas y animales, incluyendo humanos, emplean un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS (e.g., AHLs, APIs, AI-2 y AI-3) para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms (biopelículas). Por tanto, la interceptación de la comunicación bacteriana mediada por dichas señales de QS constituye un prometedor método para el control de bacterias, en particular, bacterias patógenas productoras de señales de QS.

En consecuencia, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden ser utilizados para interceptar la comunicación entre bacterias productoras de señales de QS, provocando de este modo un proceso de QQ, y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias. Los procesos de QQ para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias, en particular, bacterias productoras de señales de QS, al no afectar directamente a la supervivencia de la bacteria patógena, sino a la expresión de los factores de virulencia, no parecen ejercer una presión selectiva sobre la bacteria, evitando de este modo la aparición de resistencias, lo que constituye una importante ventaja.

3.5 Inhibición de un proceso de QS

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, para inhibir un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS. Expresado alternativamente, este aspecto inventivo se relaciona con un método para inhibir un proceso de QS, en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, bajo condiciones que permiten inhibir dicho proceso de QS.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "inhibir un proceso de QS" incluye inactivar el proceso de QS así como interceptar la comunicación bacteriana mediada por señales de QS (e.g., AHLs, APIs, AI-2 y AI-3). Este método constituye, por tanto, un prometedor método para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (e.g., de plantas y animales, incluyendo humanos) que emplean un proceso

de QS basado en distintos tipos de señales de QS para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

Las características de los componentes activos de la invención (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención) ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. El experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la bacteria productora de señales de QS con el componente activo de la invención para inhibir dicho proceso de QS; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el componente activo de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria productora de señales de QS, es una bacteria que produce, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidrox- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden ser utilizados para inhibir un proceso de QS causado por bacterias productoras de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

3.6 Degradación de señales de QS

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para degradar una señal de QS, en donde dicha señal de QS es producida por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, con dicha señal de QS bajo condiciones que permiten degradar dicha señal de QS.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "degradar una señal de QS" incluye hidrolizar una señal de QS, tal como una AHL, un APIs, un AI-2 o un AI-3, de manera que dicha señal de QS degradada ya no pueda ejercer la función de comunicación entre bacterias para la que estaba destinada; de este modo, se puede controlar una población bacteriana interceptando la comunicación entre sus miembros mediante la degradación de las señales responsables de dicha comunicación. Por

tanto, este método constituye un método alternativo para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (e.g., de plantas y animales, incluyendo humanos) que emplean un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

5

Las características de los componentes activos de la invención (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención) ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. El experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la señal de QS con el componente activo de la invención para degradar dicha señal de QS; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el componente activo de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria productora de señales de QS, es una bacteria que produce, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidroxi- sustituidas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden ser utilizados para degradar una señal de QS, producida por una bacteria productora de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

3.7 Modulación de la actividad señalizadora de AHLs

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para modular la actividad señalizadora de una AHL, que comprende poner en contacto un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, con dicha AHL, bajo condiciones que permiten modular la actividad señalizadora de dicha AHL.

30

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “modular la actividad señalizadora de una AHL” incluye degradar o hidrolizar, total o parcialmente, una AHL, de manera que dicha AHL total o parcialmente degradada o hidrolizada ya no pueda ejercer la función de comunicación entre bacterias para la que estaba destinada; de este modo, se puede controlar una población bacteriana productora de señales de QS, en donde dichas señales de QS comprenden una o más AHLs, interceptando la

35

comunicación entre sus miembros mediante la degradación o hidrólisis de las señales (AHLs) responsables de dicha comunicación. Por tanto, este método constituye un método alternativo para controlar bacterias, en particular, bacterias patógenas (e.g., de plantas y animales, incluyendo humanos) que emplean un proceso de QS basado en la producción de AHLs para regular la síntesis de factores de virulencia o para formar biofilms.

Las características de los componentes activos de la invención (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención) ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. El experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto el componente activo de la invención con la AHL; en general, estas condiciones incluyen aquellas en las que el componente activo de la invención permanece estable y mantiene su actividad.

En una realización particular, dicha AHL es una AHL no sustituida, tal como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, o una mezcla de las mismas. En otra realización particular, dicha AHL es una AHL oxo- o hidroxisustituida, tal como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc., o sus mezclas.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden ser utilizados para modular la actividad señalizadora de una AHL, producida por una bacteria productora de señales de QS, en donde dichas señales de QS comprenden una o más AHLs, y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

3.8 Inhibición de la formación de un biofilm bacteriano

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, un organismo transgénico de la invención o un péptido de la invención, para inhibir la formación de un biofilm bacteriano *ex vivo* o *in vitro*, en donde dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de QS. Expresado alternativamente, este aspecto inventivo se relaciona con un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de un biofilm bacteriano, en donde dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de QS, que comprende poner en contacto dicho polinucleótido de la invención, vector de la invención, célula de la invención, organismo

transgénico de la invención o péptido de la invención, con dicha bacteria, bajo condiciones que permiten inhibir la formación de dicho biofilm bacteriano.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “inhibir la formación de un biofilm bacteriano” se refiere a evitar o impedir que bacterias productoras de señales de QS puedan formar un biofilm. Como es conocido, la formación de biofilms es un proceso controlado por fenómenos de QS, mediados por señales de QS tales como AHLs, APIs, AI-2 y/o AI-3, y tiene un importante impacto económico y clínico. Muchos de dichos biofilms están íntimamente relacionados con procesos bacterianos infecciosos, tanto en plantas como en animales, incluyendo humanos. En general, las bacterias formadoras de biofilms son muy resistentes a antibióticos y pueden adherirse a los alimentos o a sustancias en contacto con ellos, provocando problemas tanto de higiene como posibles tox infecciones alimentarias y en último término, grandes pérdidas económicas. Además, a menudo se encuentran en la superficie de los implantes médicos o en los dispositivos insertados en el organismo. También se pueden formar en áreas del cuerpo que están expuestas al aire; en particular en heridas y en la pleura. Uno de los biofilms biológicos que presenta mayor complejidad y de mayor relevancia clínica es la placa dental. Se ha demostrado el papel de la molécula de QS AI-2 en la formación de biopelículas de los patógenos oportunistas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y de distintas especies de *Streptococcus*, incluyendo la cepa involucrada en la formación de la placa dental *S. mutans*. Además, estos biofilms contribuyen a la contaminación biológica de superficies, al bloqueo mecánico en conductos, sistemas de distribución de agua potable, sistemas de aire acondicionado, sistemas antiincendios, etc. Finalmente, merece la pena destacar que favorecen la formación del “biofouling” al constituir la base del crecimiento de otros organismos superiores en superficies sumergidas, constituyendo un grave problema económico en el sector de la acuicultura y transporte marítimo. Este método, por tanto, constituye un prometedor método para controlar tanto la formación de biofilms como para controlar bacterias productoras de biofilms mediante un proceso controlado por señales de QS, en particular, bacterias patógenas (e.g., de plantas y animales, incluyendo humanos) que emplean un proceso de QS basado en distintos tipos de señales de QS para formar biofilms.

Las características de los componentes activos de la invención (polinucleótido, vector, célula, organismo transgénico o péptido de la invención) ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. El experto en la materia conoce las condiciones que permiten poner en contacto la bacteria formadora de biofilms

mediante un proceso controlado por señales de QS con el componente activo de la invención para inhibir la formación de dichos biofilms bacterianos; en general, dichas condiciones incluyen aquellas en las que el componente activo de la invención permanece estable y mantiene su actividad. En una realización particular, la bacteria formadora de biofilms es una bacteria productora de señales de QS, tal como una bacteria productora de, al menos, una AHL. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas AHLs incluyen AHLs no sustituidas, tales como por ejemplo, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL o C14-HSL, así como AHLs oxo- o hidroxiladas, tales como por ejemplo, OC6-HSL, OC12-HSL, etc.

Por tanto, el polinucleótido de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, el organismo transgénico de la invención y el péptido de la invención, pueden ser utilizados para inhibir la formación de biofilms bacterianos controlada mediante señales de QS causado por bacterias productoras de señales de QS y, de este modo, controlar infecciones causadas por dichas bacterias.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Identificación de Aii20J, gen responsable de la actividad QQ en *Tenacibaculum* sp. cepa 20J

1.1 Construcción de una librería genómica en fósforo y screening funcional

Con el objetivo de identificar y clonar el gen o genes responsables de la actividad degradadora de AHLs de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), se construyó una biblioteca genómica usando el kit *CopyControl™ Fosmid Library Production Kit* (Epicentre, Madison, WI) con el vector pCC2FOS conforme el protocolo del fabricante.

Se extrajo el ADN de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J mediante el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El ADN (2,5 µg) se fragmentó aleatoriamente mediante pipeteo (50-100 veces) con punta de pipeta de 200 µL. El ADN fragmentado fue tratado enzimáticamente para reparar y generar extremos romos (*"blunt ends"*) y fosforilados. A continuación, se seleccionaron fragmentos de 40 kb mediante electroforesis de gel de campos pulsantes (PFGE) y se ligaron al fósforo pCC2FOS linealizado y defosforilado. A continuación se

transformaron células de *Escherichia coli* DH10 β mediante fago lambda. Las células bacterianas se sembraron en placas con medio Luria-Bertani (LB) en presencia del antibiótico cloranfenicol a una concentración de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias de *E. coli* DH10 β transfectadas con el fósido se recogieron robóticamente (*Genetix Q-bot*) y fueron distribuidas en placas de microtitulación (microtiter) de 96 pocillos conteniendo 150 μL de LB más cloranfenicol y glicerol que se añadió para su correcta congelación. La biblioteca genómica constaba de 6.912 clones distribuidos en 72 placas microtiter de 96 pocillos cada una y fue conservada hasta su utilización en un congelador a -80°C.

Se realizó un cribado funcional de la librería genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J para la detección del gen o de los genes responsables de la actividad degradadora de AHLs de esa cepa. El cribado funcional se realizó de forma simultánea para una señal corta (N-hexanoil-L-homoserín lactona, C6-HSL) y una larga (N-decanoil-L-homoserín lactona, C10-HSL) con el objetivo de incrementar las posibilidades de identificar el enzima o enzimas responsables de la actividad QQ, utilizando una modificación de la técnica de cribado en placa de agar descrita en Romero et al., 2011. Cada placa microtiter de 96 pocillos de la biblioteca genómica se copió a una nueva placa con 50 μL de LB líquido suplementado con cloranfenicol (12,5 $\mu\text{g/mL}$), 2 $\mu\text{L/mL}$ de la solución de autoinducción ("*Autoinduction Solution*"), contenida en el kit *CopyControlTM Fosmid Library Production Kit* (Epicentre, Madison, WI), y C6-HSL en concentración 12 $\mu\text{g/mL}$. La solución de autoinducción induce la alta copia del fósido en cada célula lo que permite aumentar la expresión de los genes del inserto. Las placas se incubaron a 37°C para permitir la degradación de la señal por parte de los posibles clones positivos. Tras 24 h se tomaron alícuotas de 10 μL de cada pocillo a nuevas placas microtiter, las cuales fueron irradiadas con luz UV durante 1 hora para matar las células de *E. coli* DH10 β . A continuación, se añadieron 50 μL de una dilución 1/5 (v/v) de un cultivo de 24 h de *C. violaceum* CV026 para detectar la degradación de C6-HSL y de *C. violaceum* VIR07 para detectar la degradación de C10-HSL, en LB blando al 0,2% de agar suplementado con el antibiótico kanamicina a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ y se incubaron a 30°C durante 24 h para observar la producción de violaceína. Las placas aparecen con los pocillos de color violeta por la producción del pigmento violaceína, excepto en los pocillos donde se encuentre el gen o los genes capaces de degradar las AHLs, que serán los clones positivos.

Fue posible identificar un solo clon positivo que inhibiese la actividad AHL evitando la formación de violaceína en el pocillo (Figura 1). Este clon positivo, se encontraba en

la placa 13, coordenada E2, por lo que fue denominado clon 13-E2, presentando actividad inhibitoria en el bioensayo tanto contra C6-HSL como contra C10-HSL.

La actividad del único clon positivo identificado en el cribado funcional (clon 13-E2, Figura 1) de la biblioteca genómica se comprobó, una vez transferido a cultivo en placa Petri con cloranfenicol para comprobar la pureza del clon, mediante la realización de un bioensayo en placa mediante pocillos igual al utilizado para la identificación de bacterias con actividad QQ contra AHLs en anteriores trabajos (Romero et al., 2011). El clon positivo se inoculó en tubos Eppendorf con 500 µL de LB líquido suplementado con cloranfenicol (12,5 µg/mL) y *Autoinduction Solution* (2 µL/mL). Se incubó en agitación a 200 rpm y 37°C. Tras 24 horas se añadieron 20 µL de una solución stock de cada AHL (C6 y C10-HSL) para que quedase una concentración final de 2 µg/mL y se incubaron de nuevo durante 24 h a 37°C y a 200 rpm. Para detectar la actividad QQ se tomaron 100 µL del sobrenadante tras centrifugar el cultivo durante 5 min a 10.000 rpm y se añadieron a pocillos practicados en placas de LB cubiertas con 5 mL de una dilución 1/100 de un cultivo de 24 horas de las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07 correspondientes en LB semi-sólido (0,8% de agar). Como controles negativos se usaron tubos Eppendorf de LB sin inocular o inoculados con clones negativos sin actividad QQ en el cribado de la biblioteca genómica. Las placas se incubaron 24 h a 30°C para la posterior observación de la producción de violaceína.

A continuación, se usó HPLC-MS (cromatografía de líquidos de alta resolución-espectroscopía de masas) para comprobar si el clon positivo de la librería genómica en fósido activo contra las AHL, clon 13-E2, presentaba actividad de degradación de señales. Para ello se obtuvo el extracto celular crudo (ECC) del clon con actividad QQ de *E. coli* DH10β a partir de un cultivo de 24 h en 15 mL de LB suplementado con cloranfenicol y *Autoinduction Solution*. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm para separar la biomasa del medio de cultivo. El pellet se lavó con 15 mL de tampón fosfato salino (PBS) pH 6,5, se resuspendió en otros 5 mL del mismo tampón, se sonicó mediante pulsos de 30 s, durante 5 min en hielo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se filtró (0,22 µm) y el ECC obtenido se almacenó a 4°C para su uso posterior.

Se utilizaron alícuotas de 500 µL de ECC para la interceptación de las señales C6-HSL o C10-HSL que se añadieron a una concentración de 2 µg/mL y se incubaron durante 24 h a 22°C y 200 rpm. Una alícuota de la reacción se acidificó para

comprobar la recuperación del anillo lactona. Posteriormente se realizó una extracción orgánica de las mezclas de reacción, para lo cual se extrajo tres veces con el mismo volumen de acetato de etilo (500 µL). El solvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50°C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 400 µL de acetronitrilo para su posterior análisis y cuantificación de la concentración de la señal restante por HPLC-MS según la metodología descrita con anterioridad (Romero et al., 2011). Como controles se utilizaron PBS y un ECC de *E. coli* DH10β sin fósido suplementados con la misma cantidad de señales C6-HSL o C10-HSL y procesados y extraídos orgánicamente del mismo modo.

El clon positivo de 13-E2, seleccionado de la biblioteca genómica de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J fue capaz de reducir significativamente la concentración de ambas AHLs cuantificada por HPLC-MS en comparación con los controles (Figuras 2 y 3) lo que confirma la presencia de un gen codificante de una enzima capaz de degradar las AHL en este clon, que presenta al igual que *Tenacibaculum* sp. cepa 20J, una mayor actividad frente a C10-HSL. En ambos casos fue posible recuperar una parte de la actividad AHL después de la acidificación del medio, sugiriendo que el gen responsable de la actividad degradadora de AHL del clon 13-E2 podría tener actividad lactonasa.

1.2 Identificación de la secuencia de Aii20J en el clon positivo 13-E2

Debido a que el fósido del clon positivo 13-E2 de *E. coli*, cuya actividad de QQ para los dos tamaños de AHLs ensayados fue confirmada tanto en bioensayo como por HPLC-MS, contenía un inserto del genoma de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J de aproximadamente 40kb de longitud, fue necesario un análisis genético detallado de este inserto para identificar la secuencia responsable de la actividad QQ del clon. Para ello se siguieron dos estrategias complementarias:

1. Pirosecuenciación del inserto del fósido del clon positivo 13-E2 para obtener la secuencia completa del mismo y la búsqueda de secuencias homologas a las enzimas degradadoras de AHL conocidas hasta el momento; y
2. Construcción de una segunda biblioteca genómica en la que se fragmentó y subclonó en plásmido el inserto del fósido del clon positivo 13-E2, para permitir la identificación funcional inequívoca de la secuencia responsable de la actividad QQ.

1.2.1 Pirosecuenciación del inserto del fósforo del clon activo 13-E2

Como primera aproximación a la identificación del gen responsable de la actividad QQ, el inserto del clon positivo 13-E2 obtenido en el cribado de la biblioteca genómica se secuenció usando el secuenciador *GS-FLX* de Roche. Para ello se extrajo el fósforo (150 ng/ μ L) del clon positivo siguiendo el protocolo del *Fosmid MaxTM DNA Purification Kit* (Epicentre, Madison, WI). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante las herramientas informáticas: BLASTX y CD-Search (Búsqueda de dominios conservados) del NCBI. Las secuencias se alinearon y se ensamblaron con el programa Phrap, obteniéndose una secuencia de 39.828 pares de bases (pb). Para la identificación de los ORFs del fragmento se procedió a la búsqueda en la base de datos 'nr' disponible en el NCBI, no pudiéndose identificar ningún gen con homología significativa con genes conocidos con actividad QQ. Fue posible, sin embargo, identificar 4 ORFs con elevada homología (superior al 70%) con genes de especies del cluster *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), lo que confirma que el inserto del clon 13-E2 proviene de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J (CECT 7426), miembro del grupo Bacteroidetes. En la búsqueda de todos los dominios conservados en la base de datos 'cdd' se detectó un dominio β -lactonasa al final de la secuencia analizada del clon positivo 13-E2. Se tradujo toda esa zona de la secuencia y se identificaron los codones de inicio (ATG) y de terminación (TAA) de la enzima obteniéndose una secuencia de 861 nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica un péptido de 286 aminoácidos (SEQ ID NO: 2), que presenta una identidad del 31% a nivel de aminoácidos con la lactonasa AiiA de *Bacillus* sp. (Tabla 1, Dong et al. 2000). Esta nueva secuencia de lactonasa se ha denominado *aii20J* (*Auto Inductor Inhibitor* de 20J).

1.2.2 Construcción y análisis de una biblioteca genómica del inserto del clon activo 13-E2

Simultáneamente y con el objetivo de identificar inequívocamente en base a su actividad el gen responsable de la actividad QQ, se procedió a la subclonación del inserto de 40 kb del clon positivo 13-E2 para el análisis funcional de los fragmentos. Para ello se construyó una nueva biblioteca genómica, a partir del inserto del fósforo del clon positivo 13-E2 purificado mediante el kit *Fosmid MaxTM DNA Purification* (Epicentre, Madison, WI). El ADN extraído se fragmentó aleatoriamente mediante hidrólisis ("*hydroshearing*"), se seleccionaron los fragmentos entre 3 y 5 kb mediante electroforesis y se trataron enzimáticamente para generar extremos romos y fosforilados. Estos fragmentos se ligaron en el plásmido de alta copia *pBluescript II KS*

(+) y luego se transformó *E. coli* DH10 β mediante electroporación. Los transformantes se sembraron en placa de LB con 200 μ g/mL de ampicilina, 80 μ g/mL de X-Gal y 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37°C. Tras 24 h las colonias recombinantes blancas se recogieron robóticamente (*Genetix Q-bot*) y se sembraron en 10 placas microtiter de 96 pocillos con 150 μ L de LB sólido (1,2% de agar) más ampicilina.

De forma similar al análisis de la primera biblioteca genómica, se realizó un cribado funcional de las placas microtiter de la genoteca para detectar los clones capaces de degradar AHLs. Se utilizó la cepa bioindicadora *C. violaceum* VIR07 para el análisis de degradación de C10-HSL, con una concentración de 12 μ g/mL de la señal. El procedimiento fue el mismo que en la primera biblioteca genómica, pero en esta librería subclonada se usó el antibiótico ampicilina a una concentración de 200 μ g/mL e IPTG a 1 mM para inducir la expresión de los genes del inserto.

En el cribado funcional de esta biblioteca genómica para la señal C10-HSL, aparecieron aproximadamente 6 o más positivos por cada placa microtiter. De todos los positivos conseguidos en el cribado de la nueva biblioteca genómica subclonada, se eligieron 10 al azar para realizar un nuevo bioensayo de inhibición en medio sólido para C6-HSL y C10-HSL tal y como se describió con anterioridad, para confirmar que se trataba de actividad QQ. Como resultado, todos los clones probados fueron positivos (Figura 4), evitando la producción de un halo de violaceína en la placa.

Se secuenciaron los insertos de estos 10 clones positivos obtenidos en el análisis de la biblioteca genómica subclonada seleccionados al azar. Los insertos de entre 3 y 5 kb de los plásmidos de 10 clones confirmados como positivos tras el cribado de la biblioteca genómica subclonada fueron secuenciados por técnicas estándar utilizando los cebadores del vector pBluescript II KS (+). Para el análisis de las secuencias se utilizaron las herramientas BLASTX y CD-Search (Búsqueda de dominios conservados) del NCBI y las secuencias se alinearon y se ensamblaron con el programa Phrap. Debido al tamaño de los insertos (3-5 Kb) no fue posible obtener la secuencia completa de ninguno de ellos en 1 sola ronda de secuenciación, pero en todos los casos las secuencias obtenidas presentaban un 100% de identidad con la secuencia del inserto del clon 13-E2 obtenida por pirosecuenciación y todos ellos contenían el gen *aii20J*, confirmando esta secuencia como la responsable de la actividad QQ en el clon 13-E2. Esta secuencia presenta una bajísima homología a nivel nucleotídico con la secuencia de *aiiA* de *Bacillus*, de forma que no puede ser

detectada mediante el software de alineación estándar (Figura 5). En cuanto a la secuencia aminoacídica, en la secuencia de Aii20J se encuentra el dominio conservado de unión a zinc característico de la superfamilia de las metalo- β -lactamasas, (HXHDXH), además de otros residuos de histidina y aspartato, para su correcta actividad (Dong et al., 2000). Al alinear la secuencia consenso de Aii20J con otras lactonasas del género *Bacillus* ya descritas en la bibliografía (Figura 6), se observó que, a pesar de la baja homología, coinciden en las regiones características conservadas de esta superfamilia. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de identidad de esta secuencia con otras lactonasas descritas en la bibliografía. Para alinear las secuencias nucleótidas y aminoacídicas y obtener las homologías se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

Tabla 1. Porcentajes de identidad de la secuencia de aminoácidos de Aii20J con otras lactonasas descritas en la bibliografía. Para ello se usaron las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

Especie	Homología a nivel de aminoácidos	Cita
<i>AiiA Bacillus</i> sp. 240B1	31%	Dong et al., 2000
<i>AiiA Bacillus</i> sp. AI96	26%	Cao et al., 2012
<i>AiiA Uncultured Bacillus</i> sp.	30%	Carlier et al., 2003
<i>AhlK Klebsiella pneumoniae</i>	26%	Park et al., 2003
<i>QsdA Rhodococcus erythropolis</i>	18%	Riaz et al., 2008
<i>AttM/AiiB Agrobacterium tumefaciens</i>	38%	Carlier et al., 2003; Zhang et al., 2002
<i>AhlD Arthrobacter</i> sp.	23%	Park et al., 2003
<i>QlcA Acidobacteria bacterium cosmid p2H8</i>	25%	Riaz et al., 2008

EJEMPLO 2

Secuenciación de los genes homólogos al gen de QQ de *Tenacibaculum* sp. cepa 20J en otras cepas del género *Tenacibaculum*

Se comprobó la presencia de genes homólogos a Aii20J en otras especies del género *Tenacibaculum* que se muestran en la Tabla 2. En primer lugar se realizó un bioensayo en medio sólido para comprobar que las células vivas de estas cepas eran capaces de degradar C6-HSL y C10-HSL. Solamente las 2 cepas de *T. maritimum* no presentaron actividad degradadora, en contraste con análisis anteriores, que habían descrito que *T. maritimum* NCBI 2154^T presentaba actividad frente a C10-HSL. Esta diferencia se debe probablemente a que en este caso el ensayo de actividad se realizó

en condiciones de pH controlado (células vivas re-suspendidas en PBS, pH 6,5) mientras que con anterioridad este ensayo se realizó directamente en el medio de cultivo, y, por lo tanto, la degradación podría derivarse de valores de pH elevados derivados de la actividad metabólica de la bacteria. Dos de las especies probadas *T. aestuarii* y *T. lutimaris* presentaron actividad solamente frente a C10-HSL (Tabla 2 y Figura 7).

Tabla 2. Cepas de distintas especies del género *Tenacibaculum* y actividad de células vivas contra C6-HSL y C10-HSL medida mediante bioensayo con cepas bioindicadoras de *C. violaceum* CV026 y VIR07

Cepas bacterianas	Origen	C6-HSL	C10-HSL
<i>Tenacibaculum</i> sp. 20J	Romero, 2010.	+	+
<i>T. aestuarii</i> JCM 13491 ^T	CECT (Valencia, España)	-	+
<i>T. discolor</i> DSM 18842 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+
<i>T. gallaicum</i> CECT 7122 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+
<i>T. lutimaris</i> DSM 16505 ^T	CECT (Valencia, España)	-	+
<i>T. maritimum</i> CECT 4276	CECT (Valencia, España)	-	-
<i>T. maritimum</i> NCBI 2154 ^T	The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd. (Aberdeen, UK)	-	-
<i>T. soleae</i> CECT 7292 ^T	CECT (Valencia, España)	+	+

Se procedió a la amplificación mediante PCR de los genes homólogos a *aii20J* en las especies con actividad QQ confirmada en el bioensayo. El ADN de las cepas se extrajo a partir de cultivos de 24 h con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers (oligonucleótidos cebadores) utilizados en las PCR para amplificar las secuencias de los genes de las lactonasas de cada una de las cepas de *Tenacibaculum* (Tabla 2), fueron diseñados a partir de las secuencias conocidas del plásmido y del inicio y final del gen *aii20J* de la lactonasa de *Tenacibaculum* sp. 20J, suponiendo que el resto de las cepas del género *Tenacibaculum* tendrían alguna similitud a nivel nucleotídico con *Tenacibaculum* sp. 20J. Con el objetivo de preparar las secuencias amplificadas para una posterior clonación y sobre-expresión, se incluyeron en las secuencias de los primers sitios de

restricción para las enzimas NcoI, EcoRI y manteniendo en pauta la secuencia del plásmido para que la cola de poli-histidina que el vector permite añadir se expresase correctamente. Las secuencias de estos primers, denominados Lact20Jf y Lact20JR, se muestran en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente.

5

Todos los primers diseñados en el laboratorio fueron suministrados por Sigma. Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) en las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 55°C durante 45 s, extensión a 72°C durante 45 s, precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 94°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C. En el caso de *T. soleae* sin embargo, no funcionaron en un inicio estas condiciones de reacción por lo que se realizó de nuevo una PCR con gradiente de temperatura con las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 45°C, 50°C y 55°C durante 30 s, extensión a 72°C, 1 min, precedidos de 5 minutos de desnaturalización a 94°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C. Los fragmentos así obtenidos se purificaron a partir del gel y se secuenciaron por técnicas estándar, obteniéndose en todos los casos una secuencia con elevada homología a la secuencia de *aii20J* tanto a nivel de nucleótidos como de secuencia de aminoácidos (Figura 8, Tabla 3). La secuencia que presentó un menor grado de homología fue la de *T. soleae*, con un porcentaje de identidad igual al 76% (Tabla 3). Los genes homólogos a *aii20J* de estas cepas, presumiblemente responsables de su actividad degradadora de AHLs, fueron nombrados como *aiiTD* (de *Tenacibaculum discolor*), *aiiTG* (de *T. gallaicum*), *aiiTL* (de *T. lutimaris*), *aiiTA* (de *T. aestuarii*) y *aiiTS* (de *T. soleae*) productores de las proteínas, AiiTD, AiiTG, AiiTL, AiiTA y AiiTS, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas de estos genes se muestran en SEQ ID NO: 4 (*aiiTD*), SEQ ID NO: 5 (*aiiTG*), SEQ ID NO: 6 (*aiiTS*), SEQ ID NO: 7 (*aiiTA*) y SEQ ID NO: 8 (*aiiTL*). Las secuencias mostradas incluyen los codones de inicio (ATG) y terminación (TAA).

Tabla 3. Porcentajes de identidad de la secuencia de nucleótidos del gen *aii20J* (SEQ ID NO: 1) y de aminoácidos de la proteína Aii20J (SEQ ID NO: 2) con las secuencias obtenidas para otras especies del género *Tenacibaculum*. Los porcentajes de identidad se calcularon usando las herramientas informáticas de BLAST del NCBI.

	Identidad a nivel nucleotídico	Identidad a nivel de aminoácidos
<i>T. discolor</i>	99%	99 %
<i>T. gallaicum</i>	90 %	93%
<i>T. soleae</i>	76 %	76 %
<i>T. aestuarii</i>	99 %	99 %
<i>T. lutimaris</i>	99 %	99 %

Se construyó un árbol filogenético de las lactonasas del grupo de Aii20J y los representantes más importantes de la familia de lactonasas de AHLs descritas en la bibliografía (Figura 9), utilizando el software MEGA 5.1 que se obtuvo mediante el método “neighbor-joining” (Saitou y Nei, 1987) y los valores de “bootstrap” se calcularon mediante el software MEGA 5.1 (Tamura et al., 2008). En el árbol se aprecia claramente que las lactonasas del género *Tenacibaculum* forman una rama claramente diferenciada del resto de las lactonasas descritas.

EJEMPLO 3

Sobre-expresión, purificación y caracterización de la actividad enzimática de Aii20J

3.1 Clonación y sobreexpresión

Tal y como se describe en el apartado anterior, se amplificó mediante PCR la secuencia de *aii20J* con primers específicos que permitieron insertar las dianas de restricción compatibles con el plásmido de expresión pET28c(+) (Novagen). Este vector fue elegido porque presenta la posibilidad de realizar un clonaje direccional y añade una proteína de fusión, en nuestro caso una cola de poli-histidina (6 restos de histidina consecutivos) en el N-terminal, que facilita la purificación de proteínas.

El resultado de la amplificación de la PCR se corrió en un gel de electroforesis de agarosa al 1% y se extrajeron las bandas de ADN correspondientes mediante el *Gel Extraction Kit* (Omega) siguiendo el protocolo del fabricante. De forma paralela se

extrajo el plásmido pET28c(+) de la cepa donde estaba cultivado de forma rutinaria (*E. coli* XL1blue) mediante una miniprep con el *QIAprep® Spin Miniprep Kit* de Quiagen siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación se realizó una doble digestión tanto de los fragmentos obtenidos de ADN como del plásmido para obtener los extremos cohesivos (*“sticky-ends”*) compatibles. Las digestiones se llevaron a cabo con las enzimas *FastDigest* NcoI, EcoRI, y Sall (Fermentas, Thermo Scientific) según las condiciones recomendadas por el fabricante. Tras las digestiones se insertaron los productos de las PCR ya cortados en el interior del plásmido linearizado, mediante una ligación enzimática utilizando la T4 ADN ligasa de Thermo Scientific durante 15 min a 22°C como se indica en las instrucciones del producto. Para observar si la ligación ocurría como se esperaba y el plásmido se había digerido correctamente, se realizó un control de la ligación con el plásmido sin el inserto de ADN.

Una vez obtenido el plásmido con el inserto de ADN, se transformaron células competentes de *E. coli* XL1blue para la clonación de las secuencias de interés mediante electroporación utilizando el *ECM® 399 Electroporation System*, BTX™ a 1.000 V, 4 ms. Las células electroporadas se plaquearon 100 µL en placas de LB suplementadas con el antibiótico kanamicina (30 µg/mL) y se incubaron durante 24 h a 37°C. La ligación control del plásmido sin el inserto se electroporó también como control de la electroporación, de este modo, si el plásmido estaba bien digerido no crecerían colonias en las placas. Las colonias recombinantes obtenidas se pasaron a placas nuevas y paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80°C para su almacenamiento.

Se realizó una electroforesis en gel de 1% de agarosa de una miniprep extraída con el kit de Qiagen de un cultivo de 15 mL de LB fresco en matraz de *E. coli* XL1blue transformado con pET28c(+) con el inserto y de la doble digestión del plásmido con las enzimas correspondientes para comprobar que las colonias recombinantes crecidas en las placas tras la electroporación contenían el plásmido con el inserto (Figura 10).

También se realizó una PCR control de las colonias recombinantes con primers complementarios a los dominios homólogos internos de las lactonasas, las secuencias de dichos primers se muestran en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente.

El fragmento obtenido por PCR confirmó la identidad de la secuencia insertada (Figura 11). Las condiciones de PCR aplicadas fueron: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 58°C durante 45 s, extensión a 72°C, 45 s, precedidos de 5

minutos de desnaturalización a 94°C y seguidos de 10 min de extensión a 72°C. Esta comprobación se observó mediante la electroforesis del producto de las PCR en un gel de 1% de agarosa. Las colonias recombinantes obtenidas elegidas se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/mL) para cultivarlas de forma rutinaria a 37°C en el laboratorio y paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80°C para su almacenamiento.

Con el inserto de ADN introducido en el plásmido y transformado en células de *E. coli* XL1blue, las extracciones de ADN plasmídico con el inserto de interés se secuenciaron por técnicas clásicas utilizando los primers de secuenciación específicos del vector (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14).

Las extracciones se realizaron mediante minipreps de cultivos de 24 h en 15 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) a 37°C, 170 rpm. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas Editseq y SeqMan Pro de Lasergene y MEGA 5.1 Beta3 (Tamura et al., 2008) para ensamblar adecuadamente las secuencias. Para traducir las secuencias se utilizó la herramienta informática *Protein translate* de ExPASy eligiendo el marco abierto de lectura (ORF) adecuado. La secuencia definitiva del gen *aII20J* modificado para su sobre-expresión y purificación se muestra en la SEQ ID NO: 3.

Una vez obtenida la secuencia del plásmido con el inserto y comprobado que la secuencia se encontraba en pauta (fase) para la correcta producción de la cola de polihistidina que tiene el plásmido pET28c(+) se procedió a clonar el gen de interés en la cepa de sobreexpresión *E. coli* BL21(DE3). Para transformar las células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) con el inserto de ADN, por un lado se realizó una miniprep con el kit de Quiagen, de un cultivo de 24 h de 15 mL de *E. coli* XL1blue con pET28c(+) y el inserto, en medio fresco LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) a 37°C, 170 rpm. Por otra parte, se hicieron las células competentes de un cultivo de BL21(DE3) de 24 horas en medio LB. Para ello se centrifugaron 1,5 mL del cultivo a 14.000 rpm durante 2 min, se lavaron dos veces las células con 1 mL de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 1 mM-Glicerol 10% pH 7,3, se resuspendieron con el volumen de enrase en MOPS-Glicerol, se vertieron en una cubeta de electroporación estéril de 90 µL y 1 mm Gap de VWR® enfriada anteriormente en hielo y se añadieron 5 µL del plásmido con el inserto. Se electroporaron las células en el *ECM® 399 Electroporation System*, BTX™ a 1.000 V, 4 ms. Luego se añadió a la cubeta 1 mL de medio fresco LB y se dejó incubar durante

1 hora a 37°C, tras la que se plaquearon con 100 µL placas de LB suplementadas con el antibiótico kanamicina (30 µg/mL) y se incubaron 24 h a 37°C. Se realizó como control una electroporación del plásmido sin el inserto para comprobar que el plásmido estaba bien digerido, en este caso observando que no crecían colonias en las placas.

5 Por último se realizó un bioensayo de actividad en placas con los biosensores de *Chromobacterium violaceum* para asegurarse de que la construcción del inserto en el plásmido transformado en la cepa de sobreexpresión presentaba actividad QQ. Para ello se sembraron al azar algunas de las colonias recombinantes obtenidas en nuevas placas de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL). Con estas colonias y con un
10 control negativo del *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido se realizaron cultivos en 15 mL de LB líquido suplementado con el antibiótico de 24 h a 37°C y 200 rpm. Tras 24 horas se realizaron bioensayos con las cepas biosensoras *C. violaceum* CV026 para comprobar la degradación de C6-HSL tal y como se describió con anterioridad. Como control negativo también se usó PBS pH 6,7 con la misma concentración de la AHL
15 añadida. Las colonias recombinantes obtenidas con actividad se pasaron a placas nuevas de LB con kanamicina (30 µg/mL) para cultivarlas de forma rutinaria a 37°C en el laboratorio y paralelamente se congelaron en viales de congelación *Cryoinstant Mixed* (VWR®) a -80°C para su almacenamiento.

20 Se realizó una electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar que la banda de la proteína estaba presente en la cepa de sobreexpresión (Figura 12). Para ello se preparó un cultivo de 50 mL de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) a 170 rpm, 37°C de una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) y el inserto de Aii20J, de una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con el
25 plásmido sin el inserto como control y de una colonia del mismo *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido y el inserto al que se le añadió el inductor IPTG a una concentración 1 mM al alcanzar una densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD₆₀₀) de entre 0,4-1 (0,6 la recomendada) para inducir la sobreexpresión de la proteína y dejándolo incubarse durante 3 horas más en las mismas condiciones. Los cultivos se centrifugaron a 9.000
30 rpm, 10 min, los pellets obtenidos se resuspendieron con vórtex en 3 mL de PBS pH 6,7. Luego se rompieron las células mediante sonicación con el aparato *Branson Sonifier 250* con pulsos constantes de 30-40% a potencia media durante media hora y en hielo para no sobrecalentar las muestras en el proceso. Por último, se filtraron con filtros Minisart® estériles de 1,20 µm (Sartorius Stedim Biotech). Tras la electroforesis
35 el gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad.

3.2 Purificación de Aii20J

Se preparó un cultivo de 50 mL de LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) de una colonia de *E.coli* BL21(DE3) con el plásmido pET28c(+) y el inserto correspondiente al gen de la lactonasa de la cepa de *Tenacibaculum* sp. determinada a purificar, incubándolo a 170 rpm, 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) del cultivo de entre 0,4-1 (0,6 la más recomendada). Se le añadió IPTG a una concentración 1 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína y se dejó incubar durante 3 horas más en las mismas condiciones. El cultivo se centrifugó a 9.000 rpm, 10 min, el pellet se resuspendió con vórtex en 20 mL de PBS pH 6,7. Luego se rompieron las células mediante sonicación con el aparato *Branson Sonifier 250* con pulsos constantes de 30-40% a potencia media durante media hora y en hielo para no sobrecalentar la muestra en el proceso. Se centrifugó para bajar las células durante 10 min, a 9.000 rpm. Se realizaron dos lavados resuspendiendo el pellet mediante vórtex en 10 mL de PBS pH 6,7 con Tritón al 1%, sonicando de forma continuada a potencia media durante 1 min. Después se resuspendió el pellet en 5 mL de tampón de unión (“*binding buffer*”) de la columna de purificación, se ajustó el lisado a pH 7,4 y se dejó reposar durante 1 hora en hielo. Se procedió a purificar a través de la columna de afinidad por histidina *His GraviTrap™ affinity column* de GE Healthcare con tampón de elución (“*elution buffer*”) según las instrucciones indicadas por el fabricante. El “*binding buffer*” y el “*elution buffer*” se prepararon mediante el kit *His Buffer Kit* de GE Healthcare con urea 6 M. Para eliminar el exceso de urea, se dializó el eluido obtenido de la columna que contenía la proteína. Se utilizaron para ello membranas *Seamless Tubing* de Sigma introducidas en agua destilada anteriormente, y rebajando la molaridad de la urea con PBS pH 6,7 a la mitad cada hora para evitar que precipite la proteína y hasta eliminarla por completo. Para comprobar que se obtenía la enzima purificada de forma correcta se realizó una SDS-PAGE de la proteína purificada y dializada (Figura 13). El gel se tiñó con azul de coomasie y la imagen fue obtenida con el Gel Doc™ XR+ system de Bio Rad. El resultado de la diálisis se repartió en tubos Eppendorf® y se conservó a 4°C en la nevera. Para su conservación a larga duración se congeló en alícuotas de 100 µL a -80°C, evitando ciclos de congelación/descongelación para asegurar que la enzima no perdía la actividad. La concentración de proteína obtenida en cada purificación fue cuantificada con el *UV-Vis Spectrophotometer Q500* de Quawell.

3.3 Caracterización de la actividad de Aii20J

Se caracterizó la actividad de la enzima Aii20J purificada obtenida mediante las técnicas descritas en el apartado 3.2. Para ello se estableció la Concentración Mínima Activa (CMA), definida como la cantidad mínima de enzima necesaria para eliminar completamente una concentración de AHL de 10 μ M en un periodo de tiempo determinado. Para ello se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000) en PBS pH 6,7 de una solución de enzima de concentración 0,2 mg/mL. A estas soluciones se añadieron C6-HSL y C10-HSL para obtener una concentración final de 10 μ M, incubándose durante 3 y 24 horas a 22°C en agitación, 200 rpm. Una vez finalizada la incubación se evaluó la presencia de C6-HSL y C10-HSL mediante bioensayo en placa con las cepas bioindicadoras *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* VIR07, estableciéndose que las CMA de Aii20J tanto para C6-HSL como para C10-HSL son 2 μ g/mL para tiempos de incubación de 3 horas y diez veces menos, 0,2 μ g/mL para tiempos de incubación de 24 horas (Figura 14). Sobre esta base, en todos los ensayos de caracterización se utilizó una concentración de 20 μ g/mL, correspondiente a 10 veces la CMA de 3 horas sobre C6-HSL y C10-HSL.

3.3.1 Cinética de degradación de C6-HSL y C10-HSL

En primer lugar se evaluó la cinética de degradación de dos AHLs: C6-HSL y C10-HSL en una solución de Aii20J purificada a una concentración de 20 μ g/mL. Se incubó, por triplicado, una solución de 140 μ L del enzima en PBS pH 6,7 a la concentración establecida con C6-HSL y C10-HSL a una concentración final de 10 μ M en agitación a una temperatura de 22°C. Se tomaron 200 μ L de la mezcla a tiempos 0, 5, 15, 30, 60 y 180 min, extrayéndose con el mismo volumen de acetato de etilo. El disolvente se recuperó y evaporó mediante flujo de nitrógeno en baño a 50°C y el extracto seco obtenido se resuspendió en 400 μ L de acetonitrilo para su posterior análisis. La concentración de AHL se valoró mediante HPLC-MS utilizando la metodología especificada en Romero et al. 2011. La cinética demostró que Aii20J degrada completamente C10-HSL en 5 minutos, mientras que tarda 30 minutos en degradar la misma cantidad de C6-HSL (Figura 15).

3.3.2 Especificidad de Aii20J

Se realizaron ensayos iguales a los descritos en el apartado 3.3.1 para las AHLs no sustituidas C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y para las AHLs oxo- o hidroxi- sustituidas OC6-HSL y OC12-HSL con una concentración de AHL de 2 μ g/mL y una concentración de enzima de 20 μ g/mL. Las concentraciones iniciales y

finales se midieron por triplicado en extractos realizados en PBS pH 6,7 y
 cuantificados mediante HPLC-MS (Romero et al., 2011). Aii20J presenta el menor
 grado de afinidad contra C4-HSL, seguido de la oxo-AHL OC6-HSL. El resto de las
 AHLs probadas son degradadas completamente en 1 hora por una concentración de
 20 µg/mL del enzima (Figura 16). Este amplio espectro de actividad convierte a Aii20J
 en una de las enzimas de QQ más activas descritas, ya que en otros casos el rango
 de AHLs que puede ser eliminado es menor. En el caso de AiiA_{Ai96} la mayor actividad
 se encuentra frente a C-6, C-7, C-8 y C-10-HSL, pero no se encontró actividad frente a
 C12-HSL (Cao et al., 2012).

3.3.3 Resistencia a pH

Con el objetivo de medir el efecto del pH del medio sobre la estabilidad de Aii20J y
 establecer por lo tanto la viabilidad de su inclusión en piensos u medicamentos de
 deban ser ingeridos por vía oral, se comprobó la estabilidad de la enzima después de
 ser expuesta a distintas soluciones de pH controlado en el intervalo 3-9. Una solución
 de Aii20J de 20 µg/mL se incubó en distintos tampones estériles con diferentes pH
 durante 30 min a 22°C. Luego se ajustó el pH con HCl 1M o NaOH 1M hasta alcanzar
 pH 6,7 (condiciones estándar para medir la actividad) y se añadió la AHL (C6-HSL y
 C10-HSL con concentración final de 2 µg/mL) dejando incubar durante 3 h, 22°C. La
 presencia de AHLs se reveló mediante bioensayo con las cepas indicadoras de *C.*
violaceum, CV026 y VIR07 (Figura 17). Los pocillos del centro se corresponden con
 los controles negativos de PBS pH 6,7 pH con la AHL correspondiente. Los buffers
 utilizados fueron el McIlvaine buffer (para pH 3, 4 y 5), tampón PBS (pH 6 y 7) y 0,05
 M Tris-HCl (pH 8 y 9). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un
 intervalo de estabilidad de Aii20J, mucho mayor que el descrito para AiiA_{Ai96}, que pierde
 significativamente su actividad cuando se expone a soluciones de pH inferior a 6 (Cao
 et al., 2012).

3.3.4 Resistencia a la acción de Proteinasa K y quimiotripsina

Con el mismo objetivo que la evaluación de la resistencia al pH, se probó la resistencia
 de Aii20J a la acción de la proteinasa K y la quimiotripsina (Figura 18). Se incubó
 individualmente Aii20J a una concentración de 20 µg/mL durante 30 min y 1 h a 30°C
 en PBS pH 6,7 con proteinasa K en proporción proteasa-proteína 1:10 (p/p) añadida
 desde una solución stock de 50 µg/mL en H₂O destilada y α-quimiotripsina en
 proporción proteasa-proteína 1:60 desde una solución stock de 25 µg/mL en 100 mM

Tris-HCl, pH 7,4. Después de los tiempos de incubación se añadieron C6-HSL y C10-HSL a una concentración final de 10 μ M y se dejaron otras 24 h a 22°C y 200 rpm. Por medio de bioensayo de inhibición con los biosensores *C. violaceum* CV026 y VIR07 se determinó la resistencia de la actividad de Aii20J a la proteólisis. Se realizaron

5 controles negativos de proteinasa K y quimiotripsina en PBS pH 6,7 sin la enzima con la misma concentración añadida de AHLs y control negativo de PBS con las AHLs a las mismas concentraciones.

3.3.5 Resistencia a temperatura

Se evaluó la termoestabilidad de Aii20J sometiendo una solución del enzima de concentración 20 μ g/mL por triplicado a distintas temperaturas durante 10 minutos, midiéndose la actividad del enzima así tratado sobre C6-HSL durante 1 h, 22°C, 200 rpm, que fue cuantificada mediante técnicas de HPLC-MS. Los resultados demuestran

15 una termoestabilidad limitada de Aii20J, ya que pierde su actividad catalítica por encima de los 60°C (Figura 19). Este resultado contrasta fuertemente con la termoestabilidad de la actividad enzimática en los extractos celulares crudos, en los que la actividad resiste tratamientos de hasta 100°C durante 10 minutos (no se muestran los resultados).

Para comprobar si la diferencia de termo-resistencia entre el enzima purificado y el extracto celular de la *Tenacibaculum* sp. cepa 20J se pudiera deber a la presencia en la cepa de un segundo enzima termo-resistente se probó la termorresistencia de la actividad en extractos celulares de *E. coli* BL21DE3 con el plásmido pET28c(+). EL

25 extracto celular crudo diluido a una concentración 10 veces mayor que la concentración mínima activa (46,8 μ g de proteína del extracto/mL tanto a las 3 como a las 24 h) se incubó en tubos Eppendorf® con PBS pH 6,7 a 22°C, 60°C, 80°C y 100°C durante 10 min. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les añadió la molécula señal C6-HSL a una concentración final de 2 μ g/mL y se dejaron en agitación

30 a 200 rpm durante 3 h a 22°C, tras la cual se realizó el bioensayo de inhibición de violaceína. Como control se usó el PBS con la misma cantidad de señal C6-HSL. Los resultados ponen de manifiesto que el extracto de *E. coli* en el que se expresa Aii20J presenta el mismo perfil de termorresistencia que la cepa original 20J (Figura 20), lo que indica que la baja termorresistencia de Aii20J purificada podría deberse a la falta

35 de algún co-factor que incrementa su sensibilidad y que está presente en los extractos celulares.

3.3.6 Interacción de Aii20J con antibióticos de la familia de los β -lactámicos

Debido a la homología de Aii20J y el resto de las lactonasas de AHLs con las β -lactamasas responsables de la resistencia de numerosas bacterias a estos antibióticos (Bebrone, 2007), se comprobó la posible actividad de Aii20J sobre un total de 11 antibióticos β -lactámicos pertenecientes a 5 familias del grupo (Penicilina G, Meticilina, Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefaclor, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefoperazona, Imipenem y Meropenem) y dos inhibidores de las β -lactamasas (Sulbactam y ácido clavulánico). Los antibióticos se incubaron durante 24 horas con una solución de 20 μ g/mL de Aii20J comprobándose su actividad en comparación con la misma solución de antibiótico no tratado enzimáticamente mediante antibiograma en pocillo con la bacteria *Staphylococcus aureus*. Se obtuvieron halos de diámetro idéntico en las placas correspondientes al antibiotico solo y al antibiotico tratado con Aii20J, lo que indica que no existe interacción ente Aii20J y la acción de estos antibióticos β -lactámicos y tampoco con los inhibidores de las β -lactamasas probados (Figura 21).

TRADUCCIÓN AL CASTELLANO DE LAS LEYENDAS EN INGLÉS CONTENIDAS EN LA LISTA DE SECUENCIAS

Término en inglés	Término en castellano
Sequence Listing	Lista de Secuencias
DNA	ADN
Artificial sequence	Secuencia artificial
Primer	Cebador

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S.F., Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol; 215(3):403-10.
- Bassler, B.L., Losick, R. 2006. Bacterially Speaking. Cell 125: 237-246.
- Bebrone, C. 2007. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. Biochemical Pharmacology 74:1686-1701.
- Boles B.R., Horswill A.R. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog.;4:e1000052

- Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buch, C., Larsen, J. L., Gram, L. 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Dis. Aquat. Org.* 65: 43-52.
- Buch, C., Sigh, J., Nielsen, J., Larsen, J. L., Gram, L. 2003. Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 338-349.
- Cam, D. T. V., Hao, N. V., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. Novel approach of using homoserine lactone degrading and poly- β -hydroxybutyrate accumulating bacteria to protect *Artemia* from the pathogenic effects of *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 291:23-30.
- Cao, Y., He, S., Zhou, Zhigang, Zhang, M., Mao, W., Zhang, H., Yao, B. 2012. Orally administered thermostable N-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. Strain AI96 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1899-1908.
- Carlier, A., Faure, D., Latour, X., Uroz, S., Fray, R., Smadja, B., Dessaux, Y. 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4989-4993.
- Croxatto, A., Chalker, V. J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Cámara, M., Milton, D. L. 2002. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 184: 1617-1629.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. 2000. AiiA, an enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3526-3531.
- Dong Y. H., Wang L. H., Xu J. L., Zhang H. B., Zhang X. F., and Zhang L. H. 2001: Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.
- Freeman, J. A., Bassler, B. L. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* 31: 665-677.
- Fuqua, C., Greenberg, E. P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nature Rev.* 3: 685-695.
- Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V. 2009. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog.*;5(8):e1000553.
- Izquierdo Rojo, M., Ingeniería Genética, Ediciones Pirámide, S.A., 1993. Capítulo 9.

- Morohoshi, T., Inaba, T., Kato, N., Kanai, K., Ikeda, T. 2004. Identification of quorum sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. J. Biosci. Bioeng. 98: 274-281.
- Otero Casal, A., Muñoz Crego, A., Benárdez Hermida, M. I., Fábregas, J. 2004. Quorum sensing: el lenguaje de las bacterias. Ed. Acribia, Zaragoza, España. 120 pp.
- Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiology 149: 1541-1550.
- 10 Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y. 2008. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum galaicum* sp. nov. Isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 21-25.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. J. Bacteriol. 15 187: 1799-1814.
- Riaz, K., Elmerich, C., Raffoux, A., Moreira, D., Dessaux, Y., Faure, D. 2008. Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 73: 3-6.
- 20 Romero, M. 2010. Interceptación de señales de comunicación bacteriana tipo N-acylhomoserine lactona (AHL) en bacterias marinas aisladas del medio marino. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., Otero, A. 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen 25 *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group. FEMS Microbiol. Lett. 304: 131-139.
- Romero, M., Martín-Cuadrado, A. B., Roca-Rivada, A., Cabello, A. M., Otero, A. 2011. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. FEMS Microb. Ecol. 75: 205-217.
- 30 Romero, M., Martín-Cuadrado, A. B., Otero, A. 2012. Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences. Appl. Environ. Microbiol. 78:6345-6348.
- Sambrook, J., et al., 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- 35 Swift, S., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. 1999. N-acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. En Cell-cell signaling in Bacteria. Dunne, G. M., Winans, S. C. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology., pp.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., Salmond, G. P. 2001.
Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25: 365-404.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., Cámara, M. 2007. Look who's talking:
communication and quorum sensing in the bacterial world. Phil. Trans. R. Soc. B.

5 362: 1119-1134.

Zhang, H. B., Wang, L. H., Zhang, L. H. 2002. Genetic control of quorum-sensing
signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:
4638-4643.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ
5 ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un 76% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 y codifica un péptido con actividad inhibidora de Quorum Sensing (QS).
2. Polinucleótido según la reivindicación 1, cuya secuencia de nucleótidos tiene un
10 grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 de, al menos, 90% y codifica un péptido con actividad inhibidora de QS.
3. Polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, cuya secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 de, al menos, 99% y
15 codifica un péptido con actividad inhibidora de QS.
4. Polinucleótido según la reivindicación 1, cuya secuencia de nucleótidos consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una célula que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un vector según la reivindicación 5, o un péptido según
25 cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, con la condición de que dicha célula no es una bacteria del género *Tenacibaculum*.
7. Un organismo no humano transgénico que comprende, insertado en su genoma, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un vector según
30 la reivindicación 5, con la condición de que dicho organismo no es una bacteria del género *Tenacibaculum*.
8. Un péptido codificado por la secuencia nucleotídica de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 9. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, o una variante del mismo que tiene un grado de identidad de al menos un

76% con respecto a dicha SEQ ID NO: 2 y mantiene la actividad inhibidora de Quorum Sensing (QS).

10. Péptido según la reivindicación 8 ó 9, cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de, al menos 76%, con respecto a dicha SEQ ID NO: 2 y mantiene la actividad inhibidora de QS.

11. Péptido según la reivindicación 8, 9 ó 10, cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de, al menos 93%, con respecto a dicha SEQ ID NO: 2 y mantiene la actividad inhibidora de QS.

12. Péptido según la reivindicación 8, 9, 10 ú 11, cuya secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad de, al menos 99%, con respecto a dicha SEQ ID NO: 2 y mantiene la actividad inhibidora de QS.

13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 2.

14. Una composición que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

15. Composición según la reivindicación 14, que comprende, además, un vehículo seleccionado entre:

- un vehículo apto para alimentación;
- un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- un vehículo agrícolamente aceptable.

16. Un producto alimenticio que comprende una composición según la reivindicación 15 y un vehículo apto para alimentación.

17. Empleo de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la elaboración de un producto alimenticio.

18. Una composición farmacéutica que comprende una composición según la reivindicación 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Empleo de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un
5 vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana.
- 10 20. Empleo según la reivindicación 19, en el que la bacteria causante de la infección bacteriana es una bacteria productora de señales de quorum sensing (QS).
21. Empleo según la reivindicación 19 ó 20, en el que la bacteria causante de la infección bacteriana es una bacteria formadora de biofilms.
- 15 22. Empleo según la reivindicación 20, en el que dichas señales de QS producidas por la bacteria causante de la infección comprenden una N-acil-homoserin lactona (AHL), en donde dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en donde dicha AHL no sustituida se selecciona del grupo formado por C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-
20 HSL, C12-HSL, C14-HSL y sus combinaciones; (ii) una AHL oxo- o hidroxi-sustituida, en donde dicha AHL oxo- o hidroxi- sustituida se selecciona del grupo formado por OC6-HSL, OC12-HSL y sus combinaciones; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).
- 25 23. Una composición agrícola que comprende una composición según la reivindicación 15 y un vehículo agrícolamente aceptable.
24. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que comprende poner en contacto dicha planta con un péptido según cualquiera de las
30 reivindicaciones 8 a 13, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de quorum sensing (QS), bajo condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.
25. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que
35 comprende transformar dicha planta con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o con un vector según la reivindicación 5, en donde dicha

enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de quorum sensing (QS).

26. Un método para controlar una enfermedad bacteriana en una planta, que
5 comprende el empleo de una bacteria transformada con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o con un vector según la reivindicación 5, en donde dicha enfermedad bacteriana es causada por una bacteria productora de señales de quorum sensing (QS), bajo condiciones que permiten controlar dicha enfermedad bacteriana.
10
27. Empleo de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para provocar un proceso de quorum
15 quenching (QQ) en respuesta a un proceso de quorum sensing (QS), en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, con la condición de que dicho empleo no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.
- 20 28. Un método para provocar un proceso de quorum quenching (QQ) en respuesta a un proceso de quorum sensing (QS), en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un
25 organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, bajo condiciones que permiten provocar dicho proceso de QQ, con la condición de que dicho método no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.
- 30 29. Empleo de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para inhibir un proceso de quorum
35 sensing (QS), en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, con la condición de que dicho empleo no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.

30. Un método para inhibir un proceso de quorum sensing (QS), en donde dicho proceso de QS es causado por una bacteria productora de señales de QS, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una
5 célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, bajo condiciones que permiten inhibir dicho proceso de QS, con la condición de que dicho método no consiste en un método de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal.
10
31. Un método *in vitro* para degradar una señal de quorum sensing (QS), que comprende poner en contacto un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o
15 un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, con dicha señal de QS, bajo condiciones que permiten degradar dicha señal de QS.
32. Un método *in vitro* para modular la actividad señalizadora de una N-acil-homoserin lactona (AHL), que comprende poner en contacto un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una
20 célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, con dicha AHL, bajo condiciones que permiten modular la actividad señalizadora de dicha AHL.
25
33. Empleo de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, para inhibir la formación de un biofilm bacteriano *ex vivo* o *in vitro*.
30
34. Empleo según la reivindicación 33, en el que dicha bacteria causante de la formación de biofilm es una bacteria productora de señales de quorum sensing (QS).
35
35. Un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir la formación de un biofilm bacteriano, en donde dicho biofilm bacteriano es producido por una bacteria productora de una señal de quorum sensing (QS), que comprende poner en contacto un polinucleótido

según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un vector según la reivindicación 5, una célula según la reivindicación 6, un organismo no humano transgénico según la reivindicación 7, o un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, con dicha bacteria productora de señales de QS, bajo condiciones que permiten inhibir la formación de dicho biofilm bacteriano.

36. Empleo según cualquiera de las reivindicaciones 27, 29, ó 34, en el que dichas señales de QS producidas por la bacteria comprenden una N-acil-homoserin lactona (AHL), en donde dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en donde dicha AHL no sustituida se selecciona del grupo formado por C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y sus combinaciones; (ii) una AHL oxo- o hidroxisustituida, en donde dicha AHL oxo- o hidroxisustituida se selecciona del grupo formado por OC6-HSL, OC12-HSL y sus combinaciones; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).

37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, 28, 30, 31, 32 ó 35, en el que dichas señales de QS producidas por la bacteria comprenden una N-acil-homoserin lactona (AHL), en donde dicha AHL es (i) una AHL no sustituida, en donde dicha AHL no sustituida se selecciona del grupo formado por C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL y sus combinaciones; (ii) una AHL oxo- o hidroxisustituida, en donde dicha AHL oxo- o hidroxisustituida se selecciona del grupo formado por OC6-HSL, OC12-HSL y sus combinaciones; o (iii) combinaciones de (i) y (ii).

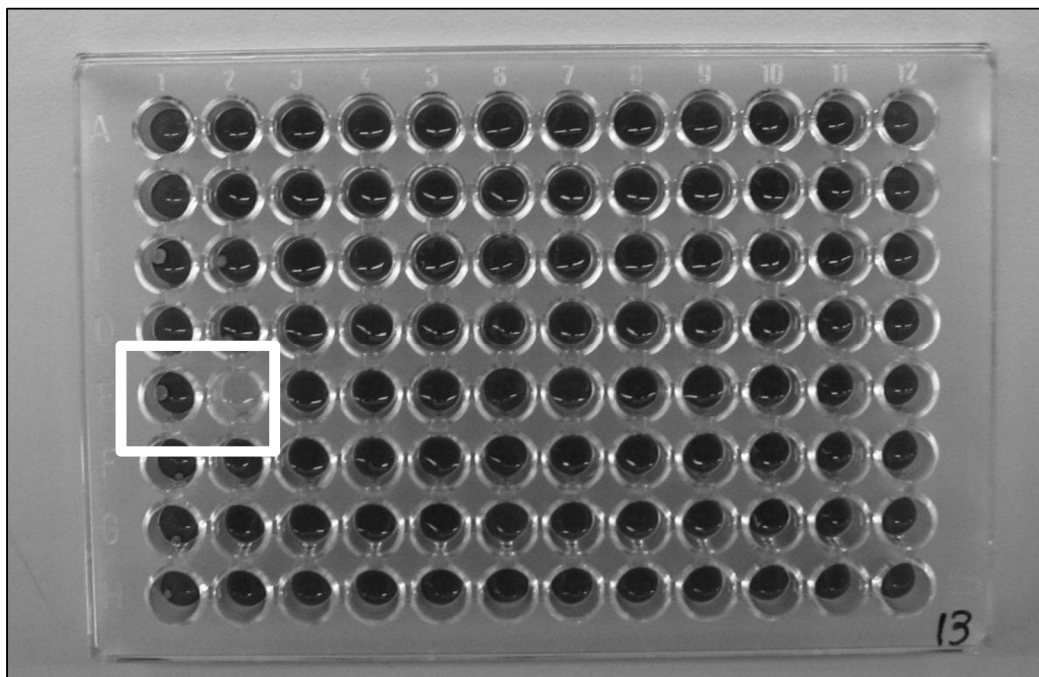


Fig. 1

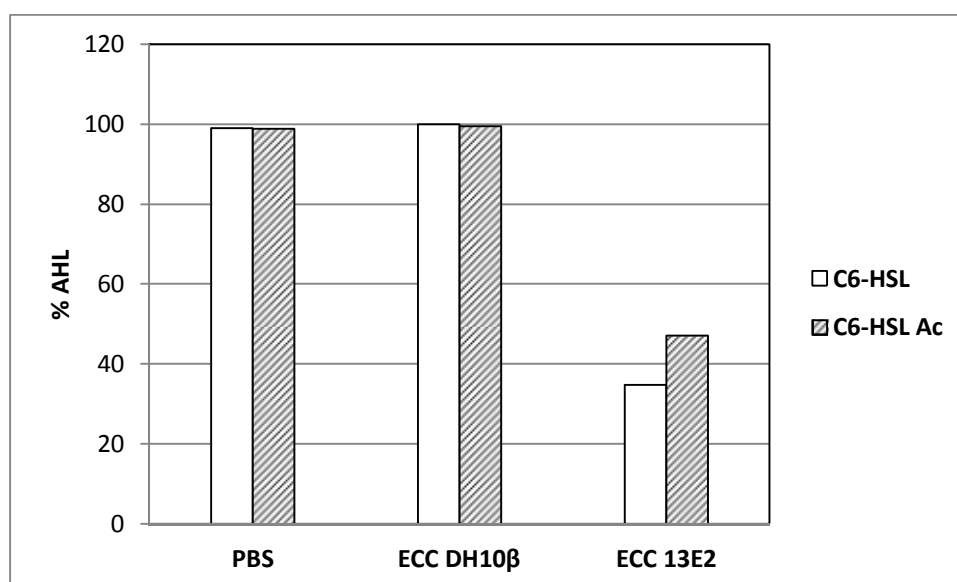


Fig. 2

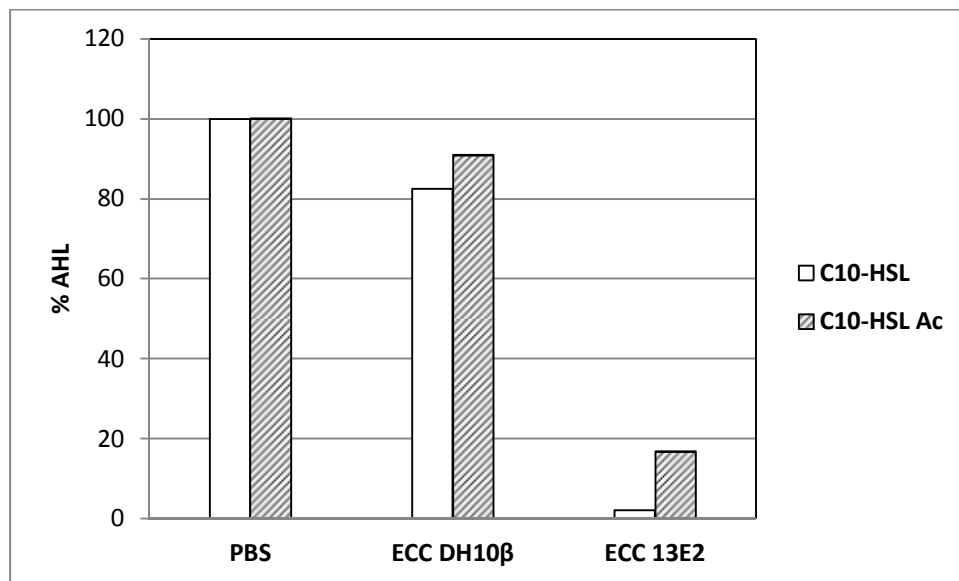


Fig. 3

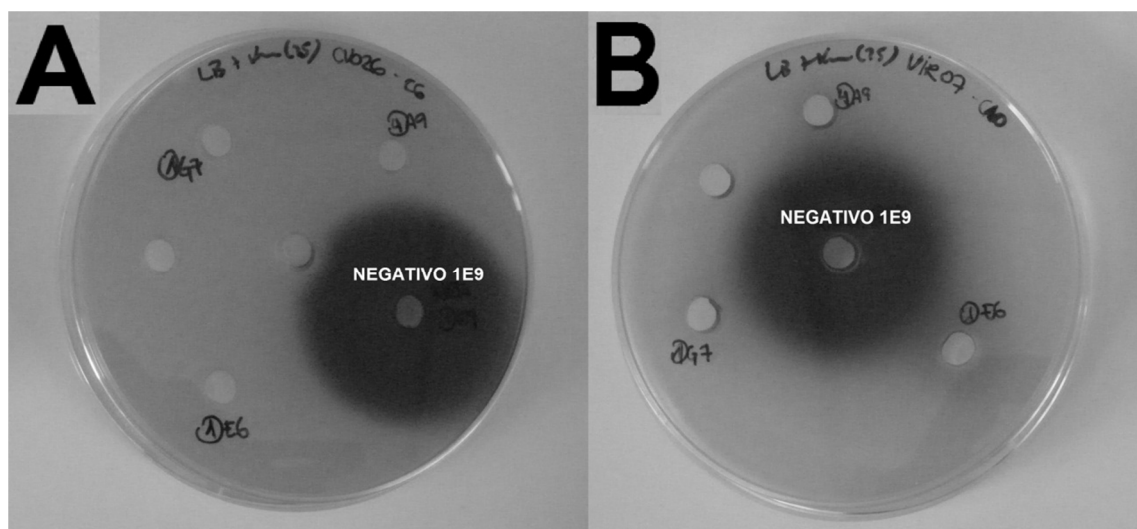


Fig. 4



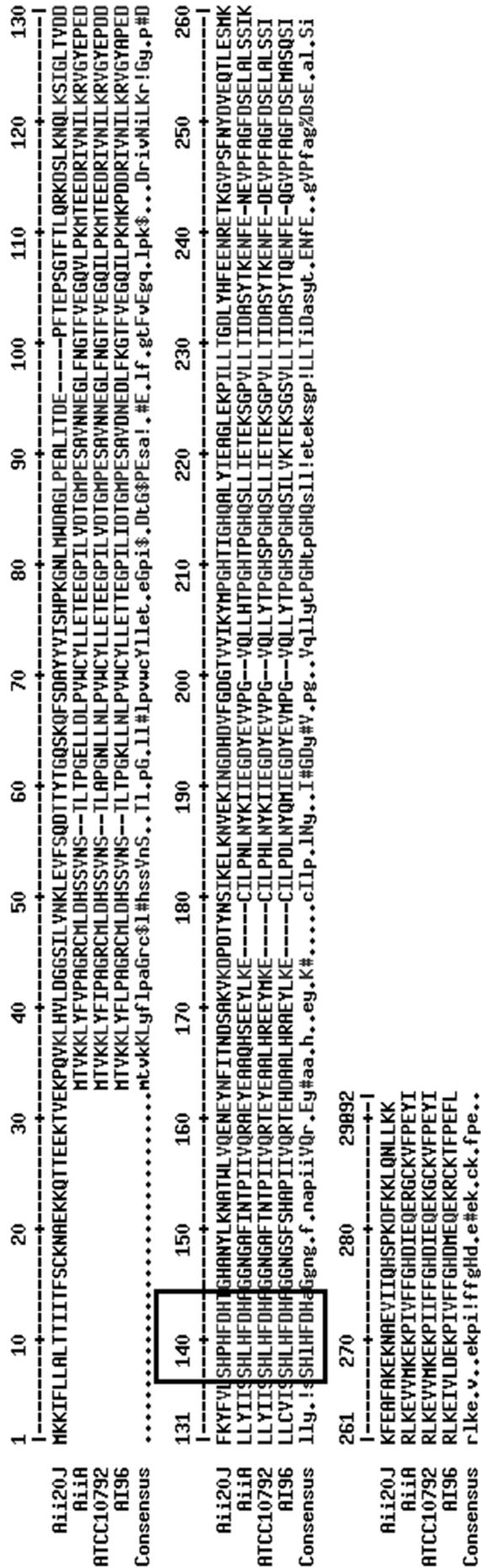


Fig. 6

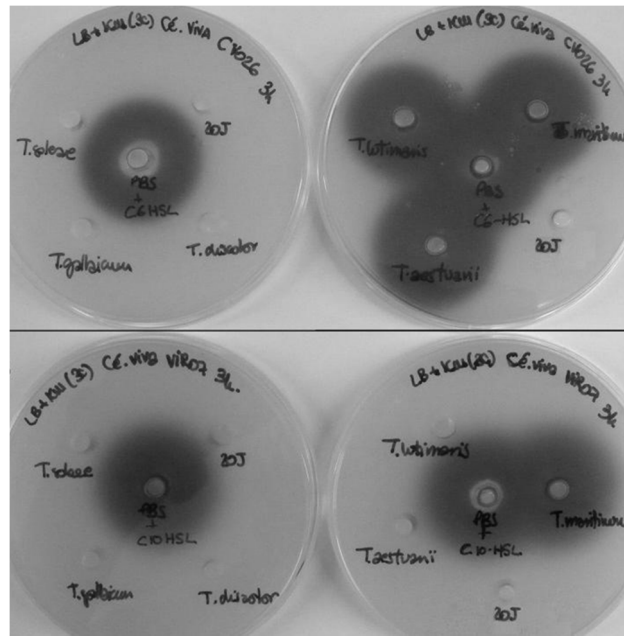


Fig. 7

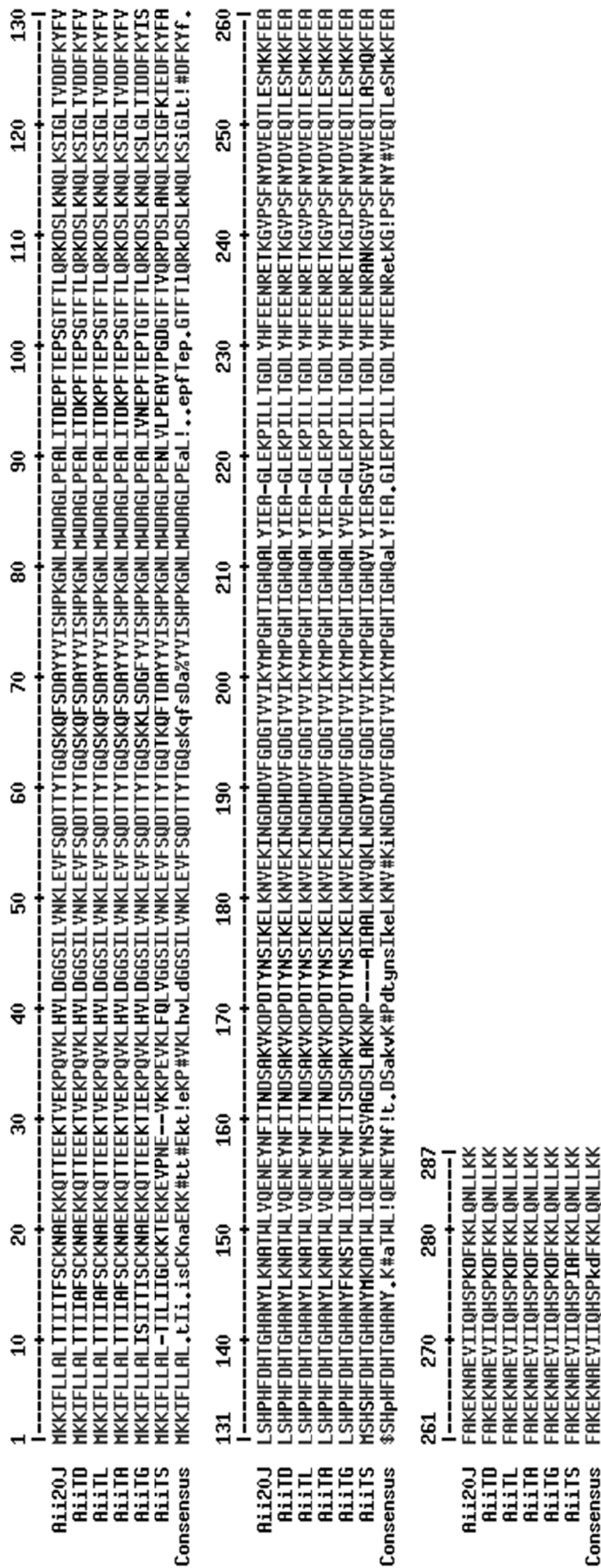


Fig. 8

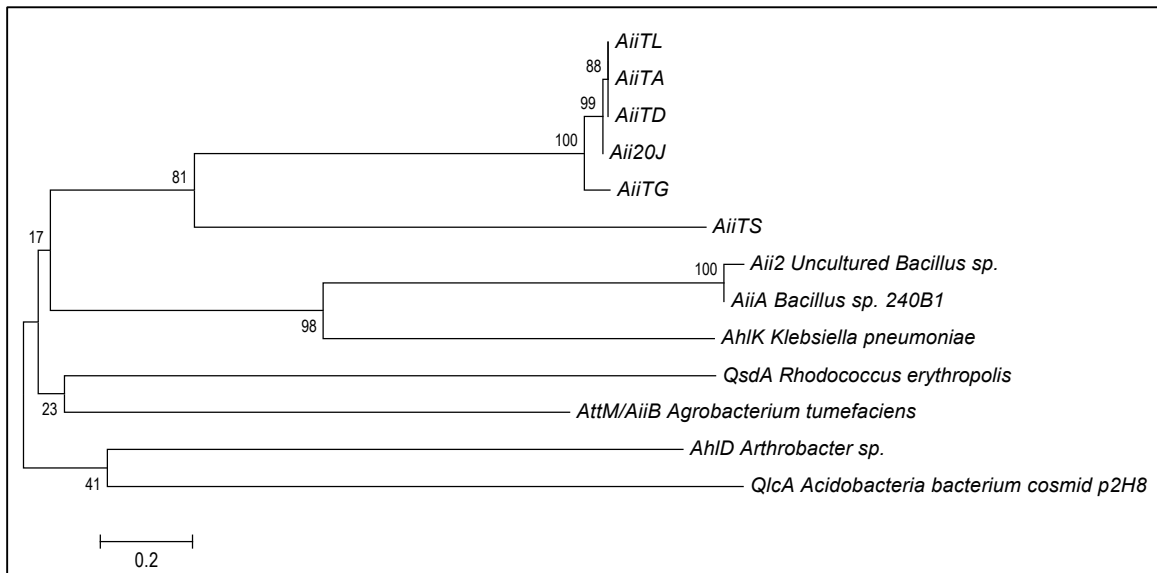


Fig. 9

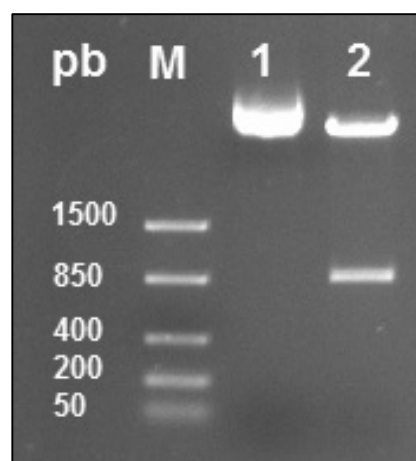


Fig. 10

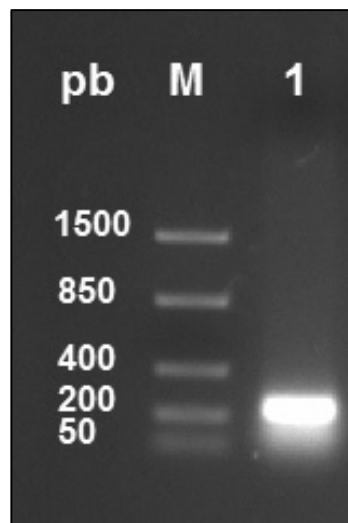


Fig. 11

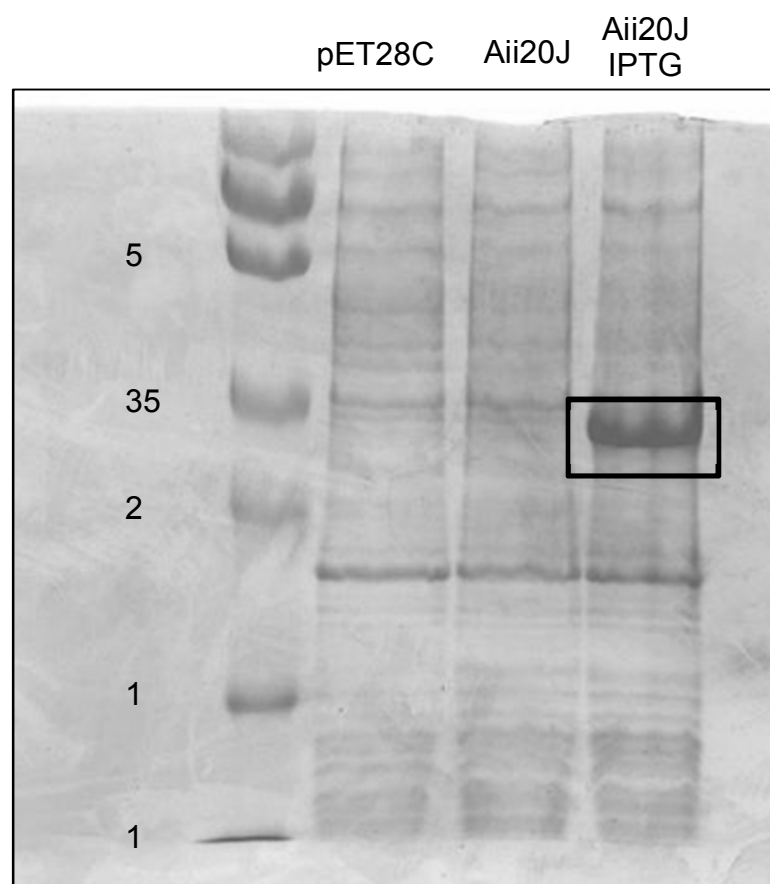


Fig. 12

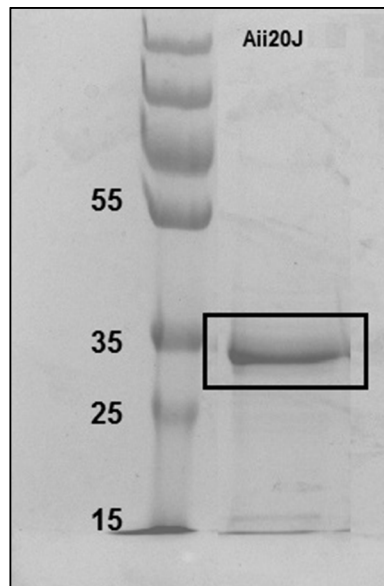


Fig. 13

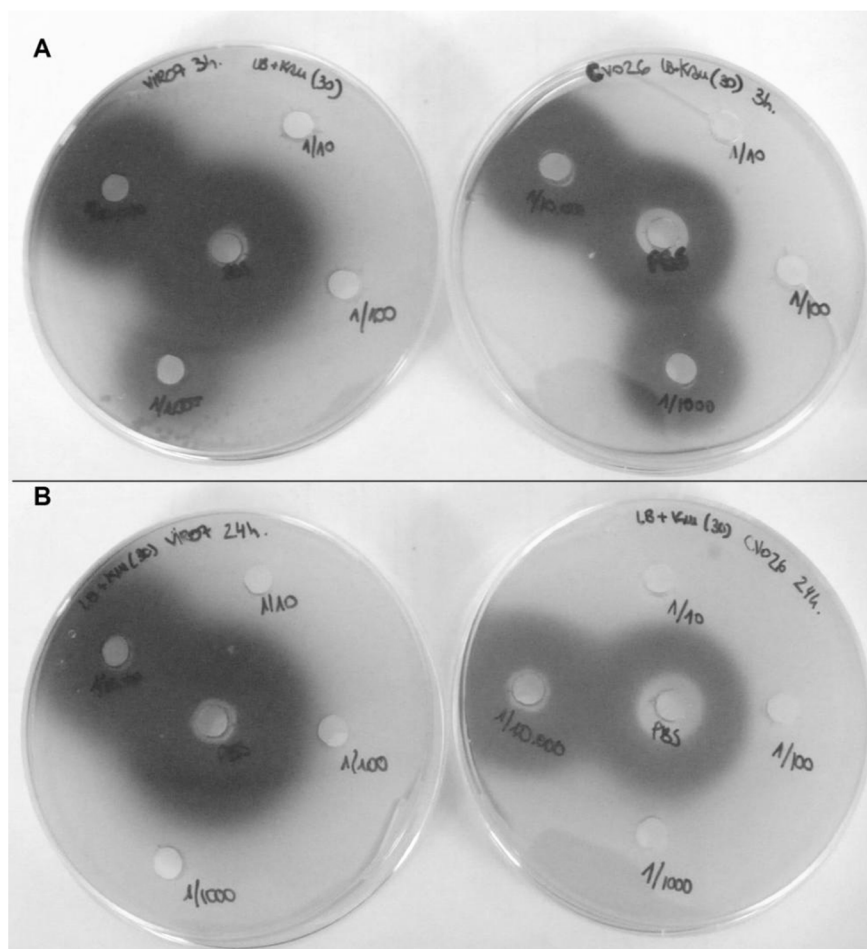


Fig. 14

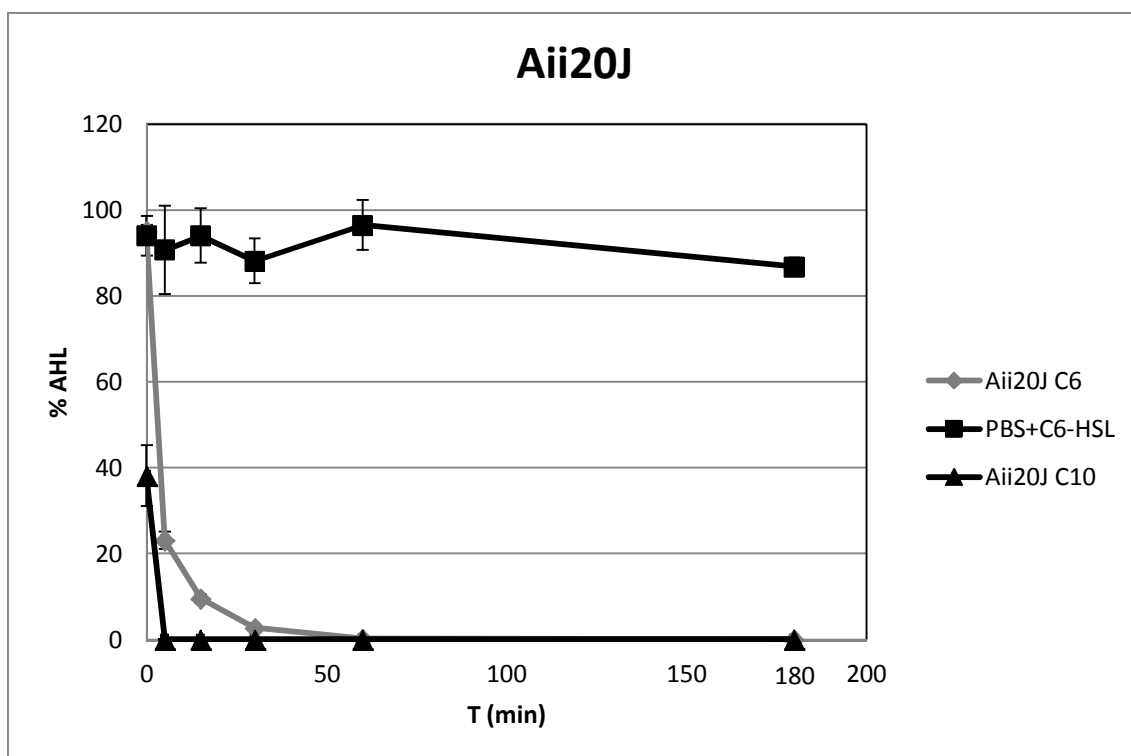


Fig. 15

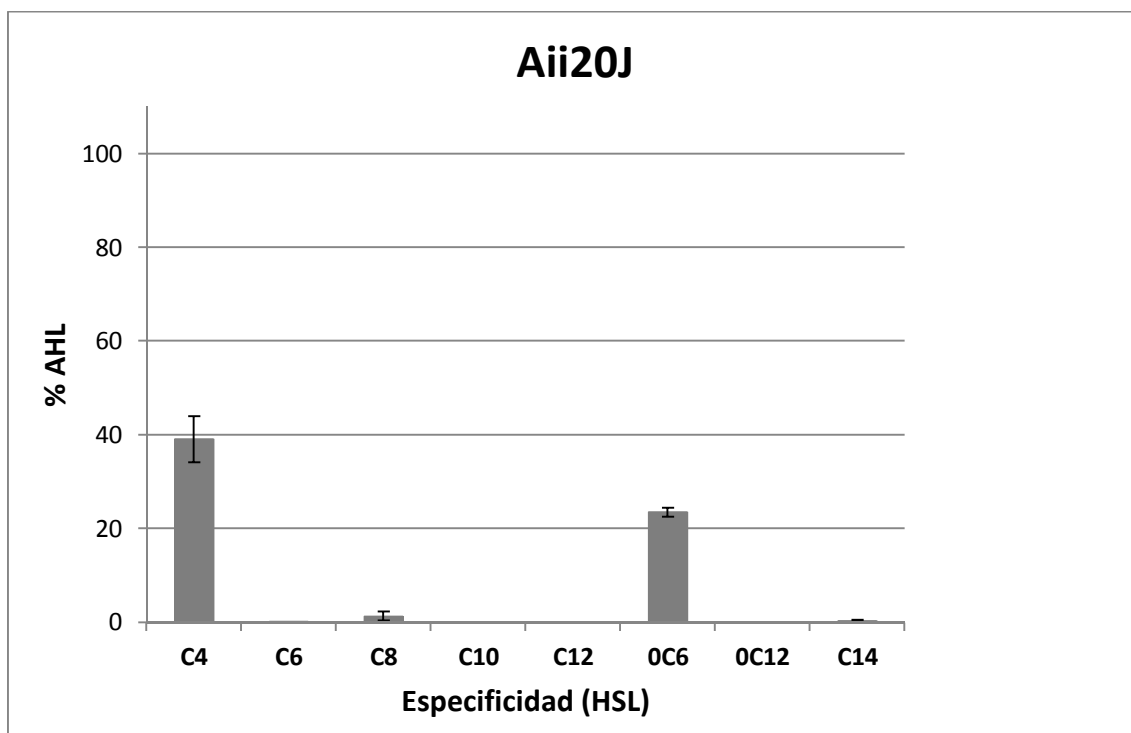


Fig. 16

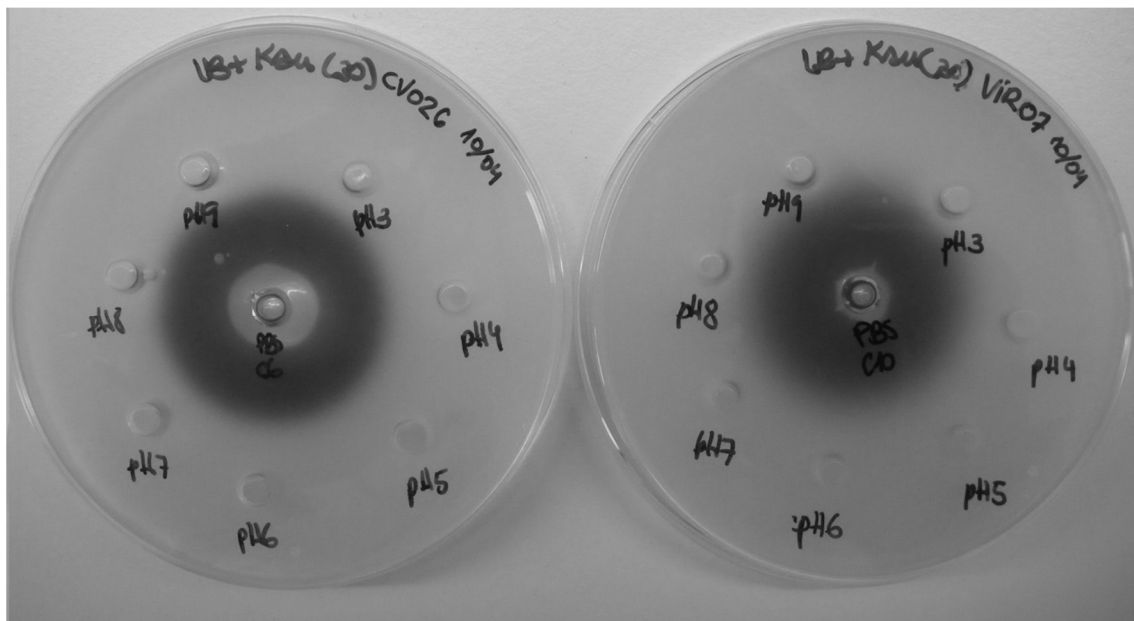


Fig. 17

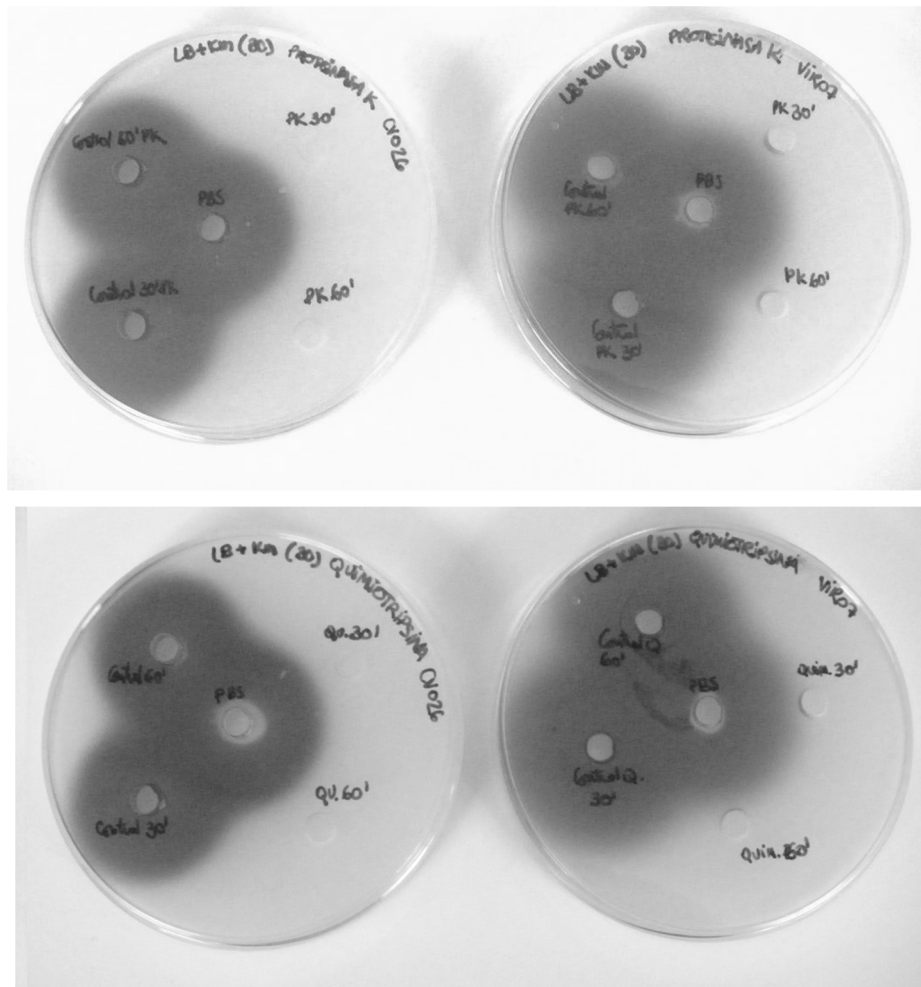


Fig. 18

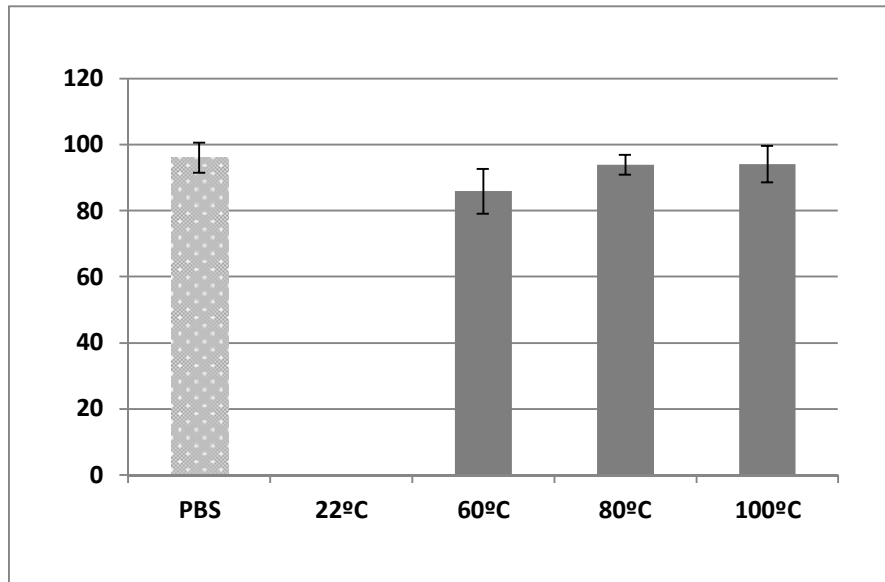


Fig. 19

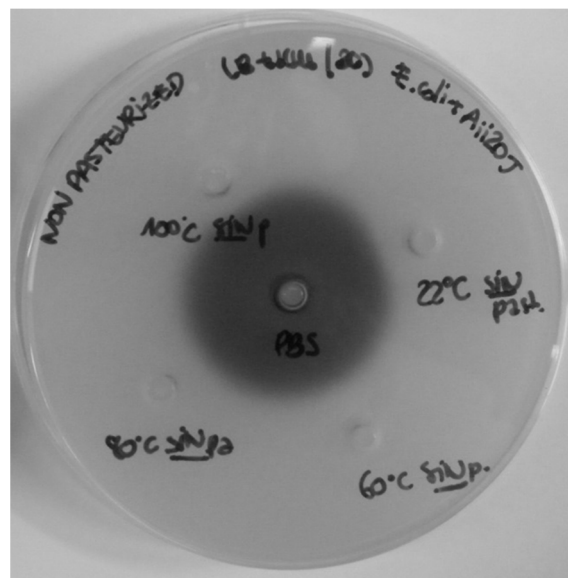


Fig. 20

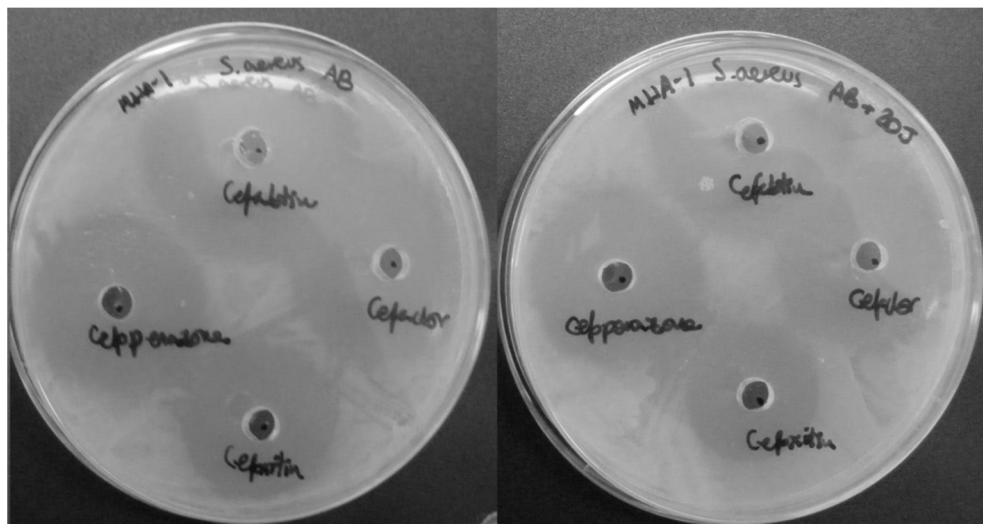


Fig. 21

ES 2 528 673 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FUNDACIÓN PEDRO BARRIÉ DE LA MAZA

<120> PÉPTIDO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE QUORUM SENSING,
POLINUCLEÓTIDO QUE CODIFICA DICHO PÉPTIDO Y SUS APLICACIONES

<130> P9915ES00
<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 861
<212> DNA
<213> Tenacibaculum sp. cepa 20J

<400> 1
atgaaaaaaa tattttttatt agctcttacg actattatta catttagttg taaaaatgcc 60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt 120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac 180
acaggacagt ctaaacagtt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat 240
ttaatgtggg atgctggttt acctgaagca ctaattactg acgaaccttt tacagagcct 300
agtgggtactt ttacttttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaactaaa atctattggt 360
ttaactgttg atgatttttaa atactttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt 420
cacgcaaact acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgagta taattttata 480
actaatgact ctgcaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaaag 540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttattaaa 600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa 660
cctatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaga atagagaaac taaaggtggt 720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc 780
gctaaagaaa agaatgctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta 840
caaatctat taaaaaagta a 861

<210> 2
<211> 286
<212> PRT
<213> Tenacibaculum sp. cepa 20J

<400> 2
Met Lys Lys Ile Phe Leu Leu Ala Leu Thr Thr Ile Ile Thr Phe Ser
1 5 10 15

ES 2 528 673 B1

Cys Lys Asn Ala Glu Lys Lys Gln Thr Thr Glu Glu Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 Lys Pro Gln Val Lys Leu His Val Leu Asp Gly Gly Ser Ile Leu Val
 35 40 45
 Asn Lys Leu Glu Val Phe Ser Gln Asp Thr Thr Tyr Thr Gly Gln Ser
 50 55 60
 Lys Gln Phe Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Ile Ser His Pro Lys Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Met Trp Asp Ala Gly Leu Pro Glu Ala Leu Ile Thr Asp Glu Pro
 85 90 95
 Phe Thr Glu Pro Ser Gly Thr Phe Thr Leu Gln Arg Lys Asp Ser Leu
 100 105 110
 Lys Asn Gln Leu Lys Ser Ile Gly Leu Thr Val Asp Asp Phe Lys Tyr
 115 120 125
 Phe Val Leu Ser His Pro His Phe Asp His Thr Gly His Ala Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Lys Asn Ala Thr Trp Leu Val Gln Glu Asn Glu Tyr Asn Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Asn Asp Ser Ala Lys Val Lys Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Ser Ile
 165 170 175
 Lys Glu Leu Lys Asn Val Glu Lys Ile Asn Gly Asp His Asp Val Phe
 180 185 190
 Gly Asp Gly Thr Val Val Ile Lys Tyr Met Pro Gly His Thr Ile Gly
 195 200 205
 His Gln Ala Leu Tyr Ile Glu Ala Gly Leu Glu Lys Pro Ile Leu Leu
 210 215 220
 Thr Gly Asp Leu Tyr His Phe Glu Glu Asn Arg Glu Thr Lys Gly Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Phe Asn Tyr Asp Val Glu Gln Thr Leu Glu Ser Met Lys Lys
 245 250 255
 Phe Glu Ala Phe Ala Lys Glu Lys Asn Ala Glu Val Ile Ile Gln His

ES 2 528 673 B1

260	265	270	
Ser	Pro	Lys	Asp Phe Lys Lys Leu Gln Asn Leu Leu Lys Lys
	275		280 285

<210> 3
 <211> 1130
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia del gen aii20J modificado para su sobre-expresión y purificación

<400> 3

cgcgaaatta atacgactca ctatagggga attgtgagcg gataacaatt cccctctaga	60
aataattttg tttaacttta agaaggagat ataccatggt aaaaaaata tttttattag	120
ctcttacgac tattattaca tttagttgta aaaatgccga aaagaagcaa acaacagaag	180
aaaaaacagt tgaaaagcct caagtaaaac ttcattgtttt agatggaggt tcaattttag	240
ttaacaaact tgaagttttt tctcaagata caacatacac aggacagtct aaacagtttt	300
cagatgctta ctatgtaata tctcacccta aaggaaattt aatgtgggat gctggtttac	360
ctgaagcact aattactgac gaacctttta cagagcctag tggtagctttt actttacaac	420
gtaaagactc attaaaaaac caactaaaat ctatttggtt aactgttgat gattttaaat	480
actttgtatt atctcatcct catctcgatc atactggtca cgcaaaactac ttaaaaaacg	540
caacatgggt agttcaggag aacgagtata attttataac taatgactct gcaaaagtta	600
aagatcctga cacttataat tctattaagg aattaaagaa tgtagaaaaa attaagtgtg	660
accatgacgt ttttgagac ggcacagtag ttattaaata catgccaggt catacaatag	720
gtcaccaagc tttatatatt gaagctggtt tagaaaaacc tatcttatta acaggtgatt	780
tatatcactt tgaagagaat agagaaacta aaggtgttcc ttcttttaac tacgatgttg	840
aacaaactct agaaagcatg aaaaagtttg aagctttcgc taaagaaaag aatgctgagg	900
tgattattca aactcacca aaagatttca aaaaattaca aaatctatta aaaaagttga	960
attcgagctc cgtcgacaag cttgcggccg cactcgagca ccaccaccac caccactgag	1020
atccggctgc taacaaagcc cgaaaggaag ctgagttggc tgctgccacc gctgagcaat	1080
aactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag gggttttttg	1130

<210> 4
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Tenacibaculum discolor

ES 2 528 673 B1

<400> 4
 atgaaaaaaaa tattttttatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc 60
 gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt 120
 ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac 180
 acaggacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat 240
 ttaatgtggg atgctggttt acctgaagca ctaattactg acaaaccttt tacagagcct 300
 agtgggtactt ttactttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctattggt 360
 ttaactggtg atgattttta atacttttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt 420
 cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata 480
 actaatgact ctgcaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag 540
 aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa 600
 tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa 660
 cctatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaaggtggt 720
 ccttctttta actacgatgt tgaacaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc 780
 gctaaagaaa agaatgctga ggtgattatt caacattcac caaaagattt caaaaaatta 840
 caaatctat taaaaaagta a 861

<210> 5
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Tenacibaculum gallaicum

<400> 5
 atgaaaaaaaa tattttttatt agctcttata agcattatta caattagttg taaaaacgct 60
 gaaaagaaac aaacaacaga agaaaaaaca attgagaagc ctcaagtaaa acttcatggt 120
 ttagatgggtg gatcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga cacaacatat 180
 acaggacagt ctaaaaaact ttcagatggt ttttatgtaa tctctcacc taaaggaaac 240
 ttaatgtggg atgctgggtt accagaagct ttaattgtaa acgagccttt tactgaacct 300
 actggtacat ttacattaca acgtaaagac tctttaaaga atcaattaaa atcttttaggt 360
 ttaactatag atgattttta atacatttcc ctatctcacc cacattttga tcatactggt 420
 catgctaact actttaagaa ttcaacgtgg ttaattcagg agaatgagta taattttata 480
 actagtgatt ctgcaaaagt taaggaccct gacacctata attctattaa ggaattaaaa 540
 aatgtagaaa aaataaatgg tgaccatgat gtttttggag atggtacggt agttataaaa 600
 tatatgcctg gtcatactat aggtcatcaa gctttatatg ttgaagctgg tttagaaaaa 660
 ccaatcttat taacaggtga tttatatcac tttgaagaaa acagagaaac taaaggtatt 720

ES 2 528 673 B1

ccttcttttta attacgatgt tgagcaaact ctagaaagta tgaagaagtt tgaagctttc 780
gctaaagaaa agaattgctga ggtgattata caacactcac caaaagattt caaaaaatta 840
caaaatctat taaaaaagta a 861

<210> 6
<211> 843
<212> DNA
<213> *Tenacibaculum solae*

<400> 6
atgaaaaaaa tatTTTTatt agctcttact atccttatta ttggttgtaa aaaaaccgaa 60
aagaaagaag tacctaacga agttaaaaaag cccgaagtaa aattatttca attagttggt 120
ggatcaattt tagtaaataa attagagggt ttttcgcaag atacaacgta caccggtcaa 180
acaaaacagt ttaccgatgc ctattatgta atatcgcacc caaaagggaa cttaatgtgg 240
gatgctgggt tacctgaaaa cttggtatta cctgaagcgg ttactcctgg cgacggaacc 300
tttactgtac aaagacccga ttcttttagca aatcaattaa aatcgattgg ttttaaaatt 360
gaagatttca agtatttttgc aatgtctcac tcgcattttg atcatactgg gcatgcaaac 420
tatatgaaag acgctacttg gttgatacaa gaaaacgaat acaattcggg tgcaggagat 480
tcttttagcta aaaaaaatcc tgcgatagca gccttaaaaa atgtacaaaa attaaacggg 540
gattatgatg tttttggtga cgggtactgtt gttataaaaat acatgccagg tcatactatt 600
ggatcatcaag tatttatatat tgaagcttct ggagttgaaa aaccaatttt attaacagga 660
gatttatatc attttgaaga aaacagagcc aacaaaggcg ttccttcatt caactataat 720
gttgaacaaa ctttagcaag catgcaaaaa tttgaagctt ttgctaaaga aaaaaatgct 780
gaggtgatca ttcaacattc accaatagct ttcaaaaaat taaaaaatct attaaaaaag 840
taa 843

<210> 7
<211> 861
<212> DNA
<213> *Tenacibaculum aestuarii*

<400> 7
atgaaaaaaa tatTTTTatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc 60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt 120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac 180
acaggacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat 240
ttaatgtggg atgctggttt acctgaagca ctaattactg acaaaccttt tacagagcct 300

ES 2 528 673 B1

agtgggtactt ttacttttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctattggt	360
ttaactggtg atgatttttaa atacttttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt	420
cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata	480
actaatgact ctgcaaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag	540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa	600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa	660
cctatcttat taacagggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaagggtgtt	720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc	780
gctaaagaaa agaatgctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta	840
caaatctat taaaaaagta a	861

<210> 8
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> *Tenacibaculum lutimaris*

<400> 8 atgaaaaaaa tattttttatt agctcttacg actattattg catttagttg taaaaatgcc	60
gaaaagaagc aaacaacaga agaaaaaaca gttgaaaagc ctcaagtaaa acttcatggt	120
ttagatggag gttcaatttt agttaacaaa cttgaagttt tttctcaaga tacaacatac	180
acaggcacagt ctaaacaatt ttcagatgct tactatgtaa tatctcacc taaaggaaat	240
ttaatgtggg atgctgggtt acctgaagca ctaattactg acaaaccttt tacagagcct	300
agtgggtactt ttacttttaca acgtaaagac tcattaaaaa accaattaaa atctattggt	360
ttaactggtg atgatttttaa atacttttgta ttatctcatc ctcatctcga tcatactggt	420
cacgcaaatt acttaaaaaa cgcaacatgg ttagttcagg agaacgaata taattttata	480
actaatgact ctgcaaaaagt taaagatcct gacacttata attctattaa ggaattaaag	540
aatgtagaaa aaattaatgg tgaccatgac gtttttggag acggcacagt agttatcaaa	600
tacatgccag gtcatacaat aggtcaccaa gctttatata ttgaagctgg tttagaaaaa	660
cctatcttat taacagggtga tttatatcac tttgaagaaa atagagaaac taaagggtgtt	720
ccttctttta actacgatgt tgaacaaaact ctagaaagca tgaaaaagtt tgaagctttc	780
gctaaagaaa agaatgctga ggtgattatt caacactcac caaaagattt caaaaaatta	840
caaatctat taaaaaagta a	861

<210> 9
 <211> 34
 <212> DNA

ES 2 528 673 B1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Lact20JF

<400> 9

gattaacccat ggtaaaaaaa atatTTTTat tagc

34

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer Lact20JR

<400> 10

gctatgaatt caactTTTT aatagatttt gtaat

35

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer TEN1F

<400> 11

tctcatcctc atttcgatca tactggt

27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer TEN1R

<400> 12

ttggtgacct attgtatgac ctgg

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer T7Fwd

<400> 13

taatacgact cactataggg gaa

23

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 528 673 B1

<220>

<223> T7Rev

<400> 14

gctagttatt gctcagcgg

19