



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 661**

51 Int. Cl.:
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06754422 .1**

96 Fecha de presentación : **10.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2016183**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54 Título: **Proceso de ingeniería cromosómica mediante el uso de un nuevo sistema de reparación del ADN.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

73 Titular/es: **DEINOVE**
22 rue Léon Jouhaux
75010 Paris, FR

72 Inventor/es: **Radman, Miroslav y**
Zahradka, Ksenija

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 661 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de Ingeniería Cromosómica Mediante el Uso de un Nuevo Sistema de Reparación del ADN

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un proceso de ingeniería cromosómica y a su uso, especialmente para la producción de grandes repertorios de mosaicos genómicos inter-especie que codifican una amplia diversidad de rutas metabólicas.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Cientos de fragmentos cromosómicos parcialmente solapantes se podrían volver a unir posiblemente por medio de mecanismos que implican una *síntesis de ADN no significativa*, p.ej., mediante (i) la unión de extremos no homólogos (NHEJ) de fragmentos de ADN^{1,2} registrados por alguna forma especial de cromatina³ o (ii) la recombinación homóloga (HR) por medio de entrecruzamientos conservativos que implican los extremos de fragmentos solapantes⁴⁻⁶. Debido al gran número de fragmentos de ADN, la *síntesis reparativa de ADN significativa* puede estar implicada en la (iii) hibridación monocatenaria (SSA) que requiere una erosión exonucleolítica sesgada de las cadenas de los extremos de los fragmentos de ADN, lo que libera las cadenas complementarias para la hibridación con las protrusiones monocatenarias complementarias de otros fragmentos⁴.

De manera alternativa, el ensamblaje de fragmentos podría requerir o implicar una *síntesis de ADN masiva*, p.ej., (iv) mediante invasión de cadenas entre fragmentos solapantes (formación de bucles D) que ceban la prolongación de los extremos 3' emparejados (p.ej., moviendo un bucle D, como en la transcripción, Fig. 4) hasta el extremo del fragmento que actúa como molde, seguido por la hibridación de los extremos así prolongados por medio de colas monocatenarias complementarias (el denominado mecanismo de hibridación de cadenas dependiente de la síntesis o SDSA⁷), o (v) mediante cualquier tipo de mecanismos de replicación del ADN de "elección de copia" (CC) que alterna y copia moldes bicatenarios de un fragmento a otro hasta que se sintetiza de nuevo un cromosoma de tamaño completo⁸.

Un objetivo de la presente invención es formar especies híbridas nuevas o cromosomas nuevos mediante recombinaciones intergenéricas y/o interespecíficas *in vivo*, de una manera que sea eficaz y fácil de llevar a la práctica.

Otro objetivo de esta invención es usar la ingeniería cromosómica *in vivo*, p.ej. en una bacteria extremófila *Deinococcus D. radiodurans*, o en cualquier otro organismo resistente a la radiación y/o a la desecación y/o al tratamiento químico que posea mecanismos de reparación del ADN similares (en la presente memoria descritos como ESDSA) para ensamblar su ADN fragmentado hasta cromosomas funcionales intactos.

Aún otro objetivo de esta invención es usar la ingeniería cromosómica *in vitro*, p.ej. en extractos exentos de células de *D. radiodurans*, o en extractos exentos de células activas de cualquier otro organismo resistente a la radiación y/o a la desecación que poseen mecanismos de reparación del ADN similares (en la presente memoria descritos como ESDSA) para ensamblar su ADN fragmentado en cromosomas funcionales intactos. Otro objetivo de esta invención es usar la estrategia anteriormente mencionada para proporcionar sitios de integración de ADN exógeno añadiendo adiciones terminales monocatenarias o bicatenarias idénticas, o similares, a cualquier secuencia cromosómica como sitios para su integración durante el proceso de la reparación del ADN *in vivo* o *in vitro*.

Otro objetivo de esta invención es usar ADN intacto o fragmentado de cualquier especie biológica, o incluso ADN creado mediante síntesis artificial, como elementos genéticos para ser integrados en el cromosoma bacteriano y para convertirse en una parte integral del mismo.

Aún otro objetivo de esta invención es usar ADN intacto o fragmentado de cualquier especie biológica, o incluso ADN creado mediante síntesis artificial, como elementos genéticos a integrarse en cromosomas artificiales mediante procesos de ensamblaje cromosómico *in vivo* o *in vitro*.

Otro objetivo de esta invención es usar una capacidad de transformación natural, o sexo bacteriano (p.ej., conjugación o transducción), o medios artificiales (electroporación o modificación química de la membrana celular) para introducir ADN exógeno en las células seleccionadas como objetivo que experimentan la reparación del ADN. Esta reparación en desarrollo mediante ensamblaje de fragmentos se desencadena por la irradiación ionizante o ultravioleta, o por productos químicos que dañan el ADN (p.ej., mitomicina C) antes o después de la introducción del ADN exógeno en la célula bacteriana.

Otro objetivo de esta invención es usar grandes fragmentos de ADN genómico o plasmídico que contienen operones completos de rutas biosintéticas que producen (i) moléculas pequeñas o proteínas terapéuticas útiles, (ii) actividades enzimáticas para la biodegradación o la biorreparación del medio o (iii) metabolismo generador de energía, por ejemplo aprovechando también la resistencia a la desecación extrema de *D. radiodurans* y lo inocua que es para los seres humanos.

Aún otro objetivo de esta invención es usar una fuente de actividad biológica según esta invención como vector para rutas de biodegradación y biorreparación naturales o modificadas mediante ingeniería genética.

Aún otro objetivo de esta invención es usar este proceso de ingeniería cromosómica en extractos exentos de células, o con proteínas purificadas, para generar nuevos ensamblajes cromosómicos que se pueden transferir a las células adecuadas, o células sin ADN, por lo que se crean nuevas entidades biológicas. Estas nuevas entidades o especies biológicas se pueden usar como máquinas biológicas adaptadas para resolver problemas importantes para la humanidad, p.ej., la limpieza ambiental por medio de la biodegradación, la síntesis de nuevos agentes terapéuticos, la producción de energías limpias, etc.

SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención se basa en una aproximación combinada mediante la cual la ingeniería cromosómica de una fuente de actividad biológica, y opcionalmente de una fuente exógena de material genético a recombinar, se hace factible basándose en una forma recién descubierta de reparación del ADN, que implica procesos de replicación y de recombinación del ADN mutuamente dependientes, uno de los cuales implica una "hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada" especial (ESDSA) para la reconstitución de cromosomas funcionales previamente fragmentados por la radiación o por una desecación considerable, mientras el otro hace uso de la recombinación homóloga.

La fuente de actividad biológica usada según la invención se selecciona de manera ventajosa del grupo que consiste en:

- (a) una bacteria resistente a la radiación ionizante y/o a la desecación y/o al tratamiento químico, y que muestra una ruta de reparación, tras la radiación y/o la desecación y/o el tratamiento químico, y dicha ruta de reparación implica procesos tanto de ESDSA como de recombinación homóloga;
- (b) cualquier organismo vivo con una ruta de reparación del ADN similar; y
- (c) extractos exentos de células de una bacteria según el punto (a) o de un organismo vivo según el punto (b) anteriores, preparados a la actividad máxima de reparación del ADN celular.

Una fuente ejemplar de actividad biológica según la invención es la bacteria *Deinococcus radiodurans*, que es una bacteria pequeña no esporulante y no patógena muy conocida.

Según esta invención, se puede seleccionar una fuente exógena de material genético del grupo que consiste en, p.ej., ADNs de diversa naturaleza y/o origen, e incluso cualquier material genético de la biosfera.

El proceso de ingeniería cromosómica según esta invención se puede usar, entre otros, para reensamblar el ADN fragmentado hasta cromosomas funcionales intactos, para integrar *in vivo* o *in vitro* ADN exógeno durante un proceso de reparación de ADN, para integrar elementos genéticos en un cromosoma bacteriano o en cromosomas artificiales, para la biodegradación y/o biorreparación natural o modificada mediante ingeniería genética, para la síntesis de compuestos nuevos, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una representación de la reparación y síntesis del ADN tras irradiación gamma de *D. radiodurans*. A, C, E muestran la cinética de la reparación del ADN en cepas de tipo natural, *polA* y *recA*, respectivamente. B, D, F muestran, en la escala logarítmica, las velocidades respectivas de la síntesis de ADN. **A:** El carril (c) muestra los patrones de restricción de Not1 mediante PFGE de ADN de células de tipo natural no irradiadas, (0) inmediatamente tras la irradiación gamma de 7 kGy (los fragmentos de ADN son de alrededor de 25-30 kb) y de las células irradiadas cultivadas en medio rico durante 1,5, 3 y 4,5 h. (s) muestra los cromosomas de *S. cerevisiae* como marcadores moleculares. **B:** La incorporación de 3H-timidina radiactiva durante un marcaje en pulso de 15 min mide la velocidad global de la síntesis de ADN en cultivos irradiados (línea roja) y no irradiados (línea negra). **C:** el mismo experimento que en A para el mutante *polA*. **D:** el mismo experimento que en B para el mutante *polA*, **E:** el mismo que en A y C para el mutante *recA*. **F:** el mismo que en B y D para el mutante *recA*.

La Fig. 2 es una representación de un análisis de ADN reparado de *D. radiodurans* mediante el marcaje por densidad con 5-BrdU. Se marcaron de manera radiactiva y por densidad células de *D. radiodurans thy-* mediante el cultivo en presencia de 3H-timidina y 5-BrdU, respectivamente. Se extrajo el ADN genómico y se analizó mediante centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. HH, HL y LL se refieren a moléculas bicatenarias pesada/pesada, pesada/ligera y ligera/ligera. H y L se refieren a moléculas monocatenarias pesadas y ligeras. A, A1, A2: ADN «pre-marcado» (marcado antes de la irradiación); B, B1 B2: ADN «post-marcado» (marcado tras la irradiación); C, C1, C2: ADN «pre- y post-marcado». A, B, C: ADN nativo en gradientes neutros de CsCl; A1, B1 C1: ADN desnaturalizado en gradientes alcalinos de CsCl; A2, B2, C2: ADN sonificado en gradientes neutros. Círculos claros: perfiles de densidad del ADN de cultivos no irradiados cultivados durante 2,5 horas (una duplicación de la masa) en medio complementado con 5-BrdU; círculos rojos oscuros: lo mismo para células irradiadas con 7 kGy cultivadas durante 3 horas en medio complementado con 5-BrdU.

La Fig. 3 es una representación de una fotólisis de ADN de *D. radiodurans* fragmentado mediante radiación ionizante y reparado en presencia de 5-BrdU. Patrones de PFGE de fragmentos Not1 de ADN de *D. radiodurans* (2-7) y patrones de peso molecular de cromosomas de *S. cerevisiae* (1). ADN de: (2) células sin irradiar; (3) células irradiadas con radiación gamma de 7 kGy e incubadas durante 3 h en medio estándar antes (5) y después (6) de la exposición a 1000 J/m² de luz UV; (6) células irradiadas reparadas en medio que contenía 5-BrdU antes (6) y después (7) de la exposición a 1000 J/m² de luz UV.

La Fig. 4 es una representación de modelos para el ensamblaje de fragmentos cromosómicos pequeños hasta intermedios lineales largos, respectivamente, mediante procesos de recombinación por hibridación monocatenaria (SSA) y por hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada (ESDSA). Hasta 10 copias genómicas de células de *D. radiodurans* en crecimiento exponencial se rompen aleatoriamente hasta alrededor de 100 fragmentos. Tras el retroceso de los extremos de 5' a 3' (1) los fragmentos difusos se pueden volver a unir directamente por medio de la hibridación de salientes monocatenarios complementarios de fragmentos solapantes (etapa 4, ruta de SSA): los huecos se reparan mediante síntesis, y cualquier cadena en exceso se recorta mediante nucleasas (5). En la ruta de ESDSA, los fragmentos con los extremos retrocedidos (1) actúan de cebadores para la síntesis teniendo como molde las partes intactas de otros fragmentos parcialmente solapantes (2), supuestamente por medio de un bucle D móvil mostrado en el intermedio entre corchetes. La prolongación de la cadena puede darse hasta el extremo del molde que produce fragmentos con la cadena monocatenaria de 3' prolongada mediante síntesis *de novo* (3). Todos los fragmentos pueden interactuar bajo las restricciones de la homología monocatenaria. Las cadenas monocatenarias prolongadas se pueden implicar *a priori* en múltiples rondas de prolongación (como en la PCR multiplex de una única etapa con un cebador en crecimiento) hasta que sus extremos prolongados hallan un homólogo complementario para SSA (4); estos intermedios lineales se recortan y/o se rellenan los huecos, y finalmente se ligan (5). La síntesis mediante prolongación de cadenas *de novo* se muestra mediante las líneas ensanchadas. Los puentes de hidrógeno se indican solamente para las asociaciones inter-fragmentos. Todos los datos apoyan la ruta de ESDSA para la producción de ADN lineal largo.

La Fig. 5 muestra un modelo para la maduración de los cromosomas circulares mediante recombinación homóloga. Mientras la ESDSA independiente de RecA (Fig.1 y 4) puede producir intermedios lineales largos, el cierre de la estructura del genoma de *D. radiodurans* (que consiste en cuatro elementos circulares) mediante ESDSA es muy improbable. Para madurar hasta los cromosomas circulares de tamaño unitario, los fragmentos lineales largos solapantes, o intermedios lineales más largos que el cromosoma, requieren entrecruzamientos (X) por medio de recombinación homóloga (HR). Esta etapa requiere RecA (Fig. 1, 5).

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

Se ha descubierto que se puede llevar a cabo un tipo nuevo de ingeniería cromosómica *in vivo* o *in vitro* con *D. radiodurans*, y/o posiblemente con otros organismos resistentes a la radiación, a la desecación y/o al tratamiento químico, como fuente de actividad biológica, con tal de que dicha fuente de actividad biológica sea capaz de realizar o de ser inducida a realizar un mecanismo de reparación del ADN fragmentado para ensamblar el ADN fragmentado hasta cromosomas funcionales intactos, preferiblemente junto con elementos genéticos exógenos a ser integrados en el cromosoma bacteriano y convertirse en una parte integral del mismo.

Los inventores, para distinguir entre los diferentes mecanismos hipotéticos enumerados en la sección "Antecedentes de la Invención" anterior de la presente memoria, han explorado en paralelo la cinética de la unión de fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la velocidad de la síntesis de ADN mediante marcaje con un pulso de ³H-TdR de 15 min tras radiación gamma de 7 kGy.

Así, se ha revelado que existe una coincidencia temporal del ensamblaje de los fragmentos y de la síntesis de ADN masiva observada que se da sin división celular a una velocidad mucho mayor que en el cultivo de células no irradiadas en crecimiento (Figs. 1A y B). Esta síntesis de ADN está ausente en una cepa *polA* (Fig. 1D) que tampoco muestra signos de reparación del ADN (Fig. 1C). Junto con la elevada sensibilidad a la radiación y/o a la desecación del mutante *polA*, estas observaciones no se pueden adaptar fácilmente a los mecanismos (i) y (ii). En general están de acuerdo con todos los mecanismos (iii-v) que implican una síntesis de ADN considerable. Los mecanismos de ESDSA (iv), y en un menor grado de SSA (iii), están favorecidos si la dependencia de PolA se debe a la elongación monocatenaria catalizada por PolA (con o sin la participación de la ADN pol III) (Fig. 4), pero el mecanismo de CC (v) no se puede excluir *a priori* debido a que PolA podría iniciar o facilitar de otra manera una síntesis bicatenaria semi-conservativa catalizada por Pol III (horquillas de replicación).

Los inventores han demostrado que se proporciona la ruta de reparación de ADN más eficaz y precisa cuando la reparación del ADN implica procesos de "hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada" (ESDSA) y de recombinación homóloga, y el que tal ruta de reparación del ADN se puede usar para la producción de grandes repertorios de mosaicos genómicos inter-especie que codifican una amplia diversidad de rutas metabólicas. La fuente de actividad biológica que proporciona la actividad para la ingeniería cromosómica según la invención debería ser resistente a la radiación ionizante y a la desecación, que fragmentan su genoma en fragmentos de ADN cortos que posteriormente se reensamblan hasta cromosomas funcionales.

5 La etapa de ESDSA requiere la ADN polimerasa I seguramente para la elongación considerable de los extremos monocatenarios de los fragmentos que facilitan su hibridación, mientras los intermedios lineales largos generados mediante ESDSA así obtenidos maduran en una etapa posterior mediante recombinación homóloga hasta cromosomas circulares que son conjuntos fragmentarios de los bloques de ADN "viejos" (es decir, sintetizados antes de la radiación y/o la desecación) y "nuevos" (es decir, sintetizados después de la radiación y/o la desecación).

10 Más específicamente, los inventores han demostrado así que las bacterias resistentes a la radiación, al tratamiento químico y/o a la desecación proporcionan dicho mecanismo eficaz y preciso, p.ej. la bacteria resistente a la radiación *Deinococcus radiodurans*, o cualquier otra fuente equivalente de actividad biológica o extractos exentos de células de la fuente de actividad biológica que poseen mecanismos de reparación del ADN similares para ensamblar su ADN fragmentado.

15 En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para la reconstitución o la recomposición de cromosomas fragmentados mediante radiación, tratamiento químico y/o desecación, en el que el proceso comprende las etapas de:

- 20 1) someter al menos una fuente de actividad biológica (p.ej. *D. radiodurans*) a radiación, desecación y/o tratamiento químico, para fragmentar sustancialmente sus cromosomas hasta fragmentos cortos;
- 2) hibridar las colas monocatenarias complementarias prolongadas mediante la síntesis que utiliza como molde fragmentos de ADN parcialmente solapantes de dichos cromosomas fragmentados;
- 3) convertir los intermedios de ADN lineales largos resultantes en cromosomas circulares intactos, por medio de una recombinación homóloga dependiente de RecA; y
- 25 4) opcionalmente separar y recoger los cromosomas recombinados así obtenidos.

Este proceso se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, dependiendo del tipo de fuente o de combinación de fuentes de actividad biológica que se usa.

30 Esta invención se basa en la ingeniería cromosómica por medio de una forma recién descubierta de reparación del ADN, que implica procesos de replicación y de recombinación del ADN mutuamente dependientes, uno de los cuales implica la "hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada" especial (ESDSA) para reconstituir cromosomas funcionales previamente fragmentados por la radiación o por una desecación considerable, mientras el otro hace uso de la recombinación homóloga.

35 En las realizaciones del primer aspecto de la invención, la fuente de actividad biológica usada según la invención se selecciona de manera ventajosa del grupo que consiste en:

- 40 (a) una bacteria resistente a la radiación ionizante y/o a la desecación y/o al tratamiento químico, y que muestra una ruta de reparación, tras la radiación y/o la desecación y/o el tratamiento químico, que implica procesos tanto de ESDSA como de recombinación homóloga;
- (b) cualquier organismo vivo con una ruta de reparación del ADN similar; y
- (c) extractos exentos de células de una bacteria según el punto (a) o de un organismo vivo según el punto (b) anteriores.

45 Este proceso se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*.

En ciertas realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención, el proceso de la invención se puede llevar a cabo en la bacteria *Deinococcus radiodurans*, o cualquier organismo con una ruta de reparación del ADN similar, o en extractos exentos de células de la bacteria *Deinococcus radiodurans*, o cualquier organismo con una ruta de reparación del ADN similar.

50 Este proceso se basa en mecanismos por los que dicha al menos una fuente de actividad biológica reconstituye su genoma a partir de los fragmentos producidos por un procedimiento que consiste en dosis muy elevadas de radiación ionizante, tal como rayos gamma o X, desecación considerable, irradiación ultravioleta, o el uso de productos químicos que pueden dañar el ADN, tales como mitomicina C.

55 El proceso implica como etapa 2 una "hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada", o ESDSA, cuyas características principales son: (i) emparejamiento de un extremo monocatenario de un fragmento con la secuencia idéntica de otro fragmento parcialmente solapante, (ii) prolongación del extremo emparejado mediante la síntesis de ADN, (iii) los extremos recién sintetizados prolongados de los diferentes fragmentos hallan en la célula otro extremo prolongado que es complementario, es decir, comparte homología de secuencia, y se hibridan entre sí para formar una molécula doble de ADN recién sintetizada que une los dos fragmentos.

65 Dicho proceso puede continuar con otros extremos complementarios, lo que conduce finalmente a intermedios largos que se unen entre sí para formar cromosomas circulares intactos mediante un proceso de recombinación homóloga que requiere RecA o una proteína similar.

En este proceso, las etapas 2 y 3 consideradas en conjunto representan un proceso completo de reparación del ADN cromosómico.

5 En ciertas realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención, la al menos una fuente de actividad biológica se expone a al menos una irradiación gamma menor o mayor de 0,7 megarad (7 kGy), usada en este estudio que es suficiente para fragmentar los cromosomas de dicha fuente de actividad biológica.

10 Como alternativa, la al menos una fuente de actividad biológica se puede exponer a un procedimiento de desecación, preferiblemente durante un período de tiempo de alrededor de 2 meses.

Más preferiblemente, la etapa 2) del proceso de la invención comprende una hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada (ESDSA).

15 En un segundo aspecto, la invención proporciona un proceso que comprende además, para proporcionar sitios de integración del ADN exógeno en el cromosoma o la al menos una fuente de actividad biológica, la adición de secuencias terminales monocatenarias o bicatenarias idénticas o similares a cualquier secuencia cromosómica como sitios para su integración durante el proceso de reparación del ADN *in vivo* o *in vitro*.

20 En un tercer aspecto, la invención comprende además el uso de al menos una fuente de material genético, p.ej. de al menos un ADN seleccionado del grupo que consiste en ADN intacto o fragmentado de cualquier especie biológica o ADN creado mediante síntesis artificial. Preferiblemente, dicha fuente de material genético o de elementos genéticos se integra en dichos cromosomas fragmentados para convertirse en una parte integral de los mismos durante las etapas 2) y/o 3) del proceso según esta invención.

25 Lo más preferiblemente, en las realizaciones del tercer aspecto de la invención, el proceso comprende el uso de más de un ADN seleccionado del grupo que consiste en ADN intacto o fragmentado de cualquier especie biológica y ADN creado mediante síntesis artificial.

30 En las realizaciones preferidas del tercer aspecto de la invención, la bacteria *D. radiodurans* que de manera natural es sumamente transformable por ADN, el al menos un ADN exógeno y/o fragmento de ADN se introduce en células irradiadas de *D. radiodurans* durante el proceso de reparación del ADN.

35 Lo más preferiblemente, la integración de los fragmentos de ADN exógeno en el genoma de *D. radiodurans* se asegura mediante prolongaciones sintéticas de los extremos 3' del ADN exógeno.

40 Para asegurar la integración eficaz en el cromosoma bacteriano, el ADN exógeno se prolonga preferiblemente mediante síntesis o adición en los extremos mediante una ADN ligasa con una secuencia bacteriana elegida, p.ej. que corresponde a una de sus secuencias IS, para ofrecer múltiples elecciones de integración inocua.

45 En ciertas realizaciones del tercer aspecto de la invención, tras una ruptura considerable del ADN cromosómico mediante radiación ionizante, desecación y/o productos químicos, dicha secuencia 3' terminal se usa para el cebado en la síntesis de ADN y la prolongación de la cadena en cada una de las secuencias IS hasta su secuencia vecina única específica durante el transcurso de la reparación del ADN.

50 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, todos los fragmentos de ADN de cualquier fuente elegida de material genético, o mezcla de materiales, se prolonga mediante la misma secuencia de manera que, en la misma célula, estos fragmentos de ADN se pueden hibridar directamente en los extremos, en cualquier combinación posible, antes de integrarse en el cromosoma.

Se puede usar cualquier fuente de ADN cromosómico o extracromosómico (p.ej. plasmídico) genómico como candidato para la inserción en dicho cromosoma fragmentado.

55 En ciertas realizaciones del tercer aspecto de la invención, se pueden usar genes que codifican rutas biosintéticas completas, p.ej. para la biodegradación de contaminantes ambientales, para la bioconversión de energía, o para la síntesis de antibióticos, proteínas terapéuticas u otros compuestos útiles.

60 Para la aplicación a la síntesis de proteínas terapéuticas, también se pueden integrar los genes para su modificación post-sintética.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un ADN artificial preparado con el proceso según esta invención. Lo más preferiblemente, dicho ADN artificial comprende fragmentos grandes de ADN cromosómico o no cromosómico genómico que contienen operones completos para rutas biosintéticas.

En un quinto aspecto, la invención proporciona el uso de tal ADN artificial para producir (i) moléculas pequeñas o proteínas terapéuticas útiles, (ii) actividades enzimáticas para la biodegradación o la biorreparación del medio, o (iii) metabolismo generador de energía.

5 En ciertas realizaciones del quinto aspecto de la invención, el ADN artificial así preparado se va a usar para producir grandes repertorios de mosaicos genómicos inter-especie que codifican una amplia diversidad de rutas metabólicas.

10 En otra realización del quinto aspecto de la invención, el proceso se va a usar en extractos exentos de células, o con proteínas purificadas, para generar nuevos ensamblajes cromosómicos que se pueden transferir a células adecuadas, o a células sin ADN, por lo que se crean nuevas entidades biológicas. Lo más preferiblemente, dichas entidades biológicas nuevas están destinadas a ser usadas como máquinas biológicas adaptadas a resolver problemas importantes para la humanidad, en especial la limpieza ambiental por medio de la biodegradación selectiva, la síntesis de nuevos agentes terapéuticos y/o la producción de energías limpias.

15 En ciertas realizaciones de todos los aspectos de la invención, el proceso comprende además el uso de al menos un medio seleccionado del grupo que consiste en la capacidad de transformación natural, el sexo bacteriano, tal como la capacidad de conjugación o transducción, y medios artificiales, tales como la electroporación o la modificación química de la membrana celular, para introducir ADN exógeno en las células vivas de al menos una fuente de actividad biológica seleccionada como objetivo que experimenta la reparación del ADN.

20 En las realizaciones preferidas de todos los aspectos de la invención, el proceso comprende además el desencadenamiento mediante irradiación ionizante o ultravioleta, o mediante productos químicos que dañan el ADN, tales como mitomicina C, antes o después de la introducción de ADN exógeno en dicha fuente de actividad biológica.

25 Lo más preferiblemente, se usa *D. radiodurans* como vector para rutas de biodegradación y biorreparación naturales o modificadas mediante ingeniería genética.

30 Otras ventajas y características de la presente invención serán evidentes a la luz de la sección experimental y de los ejemplos siguientes.

En la presente descripción, cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en la presente memoria y las enseñanzas específicas de esta memoria descriptiva se deberán resolver en favor de estas últimas. De forma similar, cualquier conflicto entre una definición entendida en la técnica de una palabra o frase y una definición de la palabra o frase tal como se enseña específicamente en esta memoria descriptiva se deberá resolver en favor de esta última.

35 Las siguientes indicaciones están destinadas a ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas de la invención y el mecanismo en el que se basa la invención. No se debería considerar que tengan una naturaleza limitante. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, mediante el uso únicamente de experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a las sustancias y procedimientos específicos descritos en la presente memoria. Se considera que tales equivalentes están dentro del alcance de esta invención, y están cubiertos por las reivindicaciones siguientes.

Otras ventajas y características de esta invención serán evidentes a la luz de la descripción detallada que sigue.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Junto con la privación de nutrientes, el frío y el calor, la deshidratación o la desecación es uno de los desafíos más frecuentes y graves para las células vivas⁹. Por lo tanto, la resistencia a la desecación es una parte importante de la solidez de la vida. La bacteria *Deinococcus radiodurans* es el extremófilo mejor conocido de un grupo de organismos que se ha descubierto que resisten a exposiciones extremadamente elevadas a la radiación ionizante y a la desecación^{10,11}. Parece que la evolución de la resistencia a la radiación extrema de *D. radiodurans* es un subproducto de la selección natural de su resistencia a la desecación¹². La selección de la resistencia a la desecación en las bacterias co-selecciona la resistencia a la radiación¹³, y los 41 mutantes analizados de *Deinococcus radiodurans* sensibles a la radiación son sensibles también a la desecación proporcionalmente a su sensibilidad a la radiación¹². Ambos tratamientos tienen en común que provocan una ruptura bicatenaria considerable del ADN intracelular (DSB)¹² que es la forma más grave de lesión genómica, debido a que una única DSB sin reparar normalmente es letal¹⁴. Las células procarióticas y eucarióticas vegetativas habituales pueden reparar menos de una docena de DSBs simultáneas¹⁵. *D. radiodurans* sobrevive a la radiación ionizante que rompe su genoma en varios cientos de fragmentos (hasta 2000 DSBs por célula que contiene 4 a 10 copias de su genoma) debido a un proceso de reparación del ADN que lleva a cabo un ensamblaje de fragmentos eficaz y preciso^{16,10,11} que es un equivalente físico del ensamblaje de cóntigos asistido por computador de fragmentos genómicos aleatorios secuenciados mediante secuenciación aleatoria.

65 *D. radiodurans* es una bacteria pequeña no esporulante y no patógena cuyo genoma secuenciado está compuesto de dos cromosomas circulares (2,65 y 0,41 mega pb) y dos plásmidos circulares (0,177 y 0,046 mega pb)¹⁷. Debido a que los mutantes *recA* y *polA* de *D. radiodurans* son sus mutantes más sensibles a la radiación^{10,11}, la recombinasa RecA y la ADN Polimerasa I (PolA) desempeñan claramente papeles fundamentales en la reparación del ADN

5 cromosómico fragmentado. Con pocas excepciones, si las hay¹⁸, este proceso de reparación del ADN en *D. radiodurans* es mucho más eficaz que los procesos de reparación dependientes de RecA y PolA en otras especies biológicas, pero su mecanismo molecular sigue siendo un misterio¹⁹. Ni las cantidades comparativas, ni las propiedades enzimáticas de las proteínas RecA y PolA han proporcionado una pista clara^{19,20}. Se ha mencionado el número de copias cromosómico²¹ y las formas especiales de la cromatina^{14,15}, pero los resultados no justifican la resistencia de *D. radiodurans*^{19,20}.

10 Esta invención revela y hace uso de una nueva forma de reparación del ADN que implica procesos de replicación y recombinación del ADN mutuamente dependientes, uno de los cuales tiene similitudes con una PCR multiplex de una única etapa (Fig. 4), que reconstituye cromosomas funcionales de *D. radiodurans* fragmentados mediante 7 kGy (0,7 megarad) de radiación de rayos gamma hasta fragmentos de ADN de 25-30 kb y que provoca solamente una letalidad del 10%.

15 A este respecto, la eficacia de la luz UV para producir DSBs mediante fotólisis de 5-BrdU indica que tales bloques de ADN bicatenario recién sintetizado en los cromosomas reparados son grandes, de acuerdo con el análisis en gradiente de densidad (Fig. 4). Los cromosomas fragmentados se emparejan probablemente de forma no homóloga debido a que en tal caso (p.ej., una meiosis en levaduras) la síntesis reparativa mediante SDSA se limita a la región corta entre los extremos retrocedidos de las DSBs individuales^{4,6}. La estructura de los cromosomas reparados mediante ESDSA se muestra en la Figura 1. La característica distintiva del modelo de ESDSA es que implica una etapa similar a PCR multiplex con "extremos salientes" (etapas 2 y 3 de la Fig. 1) que da como resultado extremos salientes monocatenarios largos recién sintetizados que permiten un proceso de hibridación exacto. Las alternativas al mecanismo de ESDSA, p.ej., NHEJ o HR que funcionan exclusivamente sobre extremos de ADN recién sintetizados, son muy poco probables. Es concebible un mecanismo de SSA con un traslado de mella considerable; sin embargo, el fragmento Klenow de PolA de *E. coli* complementa a los mutantes de *polA* de *D. radiodurans* para la resistencia a la radiación gamma²², lo que demuestra que no existe la necesidad de traslado de mella para la reparación del ADN.

20 El patrón de reparación del ADN observado en PFGE (Fig. 2E) y en experimentos de cartografía óptica²³ sugiere que la mayoría de los fragmentos de ADN "crecen" progresivamente, y que la mayoría de los fragmentos se usan pronto en el proceso de ensamblaje cromosómico (Fig. 2). Se pueden imaginar, por lo tanto, "reacciones en cadena" de ESDSA que implican numerosos puntos de "nucleación" en la célula que producen intermedios de reparación del ADN lineal largos. No sería probable que tal ADN lineal largo, si es más corto que el tamaño del cromosoma, hallase el segmento cromosómico exacto que coincide con los dos extremos para completar la estructura cromosómica circular mediante ESDSA o SSA. Tales intermedios lineales más cortos que el cromosoma, así como aquellos más largos que el tamaño del cromosoma, requerirían una recombinación homóloga, en general dependiente de RecA²⁴, para producir cromosomas circulares únicos maduros (Fig. 3). Esto es coherente con los experimentos de PFGE con un mutante *recA* (Fig. 2E). Tanto la síntesis como la reparación del ADN son menos eficaces en el mutante *recA* (Fig. 2E,F) que en el tipo natural, de manera que es posible, por tanto, que la RecA deinocócica, por medio de su actividad de unión bicatenaria preferente²⁰, reúna fragmentos de ADN con homología solapante que debería facilitar el mecanismo de ESDSA. Sin embargo, la implicación clave de RecA se da más tarde en el proceso de reparación (Fig. 3).

45 El mutante *PolA*, pero no el *recA*, es claramente deficiente en reparación de ESDSA (Fig. 2). Sin embargo, el daño de las bases y de los carbohidratos del ADN por parte de los radicales libres de oxígeno inducidos por la radiación, que pueden provocar directamente rupturas monocatenarias y, más frecuentemente, sucesos de reparación por escisión de bases proximales (BER), son al menos 10 veces más frecuentes que las DSBs²⁵, y generalmente requieren PolA para completar la reparación²⁶. Por lo tanto, se espera que la PolA proteja la integridad de los fragmentos de ADN (véase la pérdida de fragmentos en la Fig. 2C) producidos por la radiación gamma reparando huecos de nucleótidos únicos creados por las enzimas BER, un prerrequisito para su ensamblaje en el que PolA supuestamente está implicada directamente en el proceso de ESDSA (Fig. 1). Sin embargo, antes del aislamiento de un mutante condicional de la ADN polimerasa III, no se puede excluir la posibilidad de que la PolA solamente inicie una elongación monocatenaria catalizada por la ADN polimerasa III o que incluso contribuya solamente al mantenimiento de los fragmentos.

55 A diferencia de otras bacterias, todas las especies bacterianas resistentes a la radiación muestran nucleoides condensados incluso después de la radiación ionizante²⁷. Se sugirió que una cromatina especial similar a un anillo mantiene registrados los extremos del ADN fragmentado y facilita la reparación mediante NHEJ³. Sin embargo, se espera que la alta concentración de fragmentos de ADN en el nucleoide condensado facilite cualquier interacción homóloga bimolecular necesaria para la reparación del ADN, p.ej., en SDSA/ESDSA, SSA y HR. Quizás, además de la peculiaridad de la RecA²⁰, la cromatina condensada es otra innovación evolutiva de *D. radiodurans* que asegura una eficacia elevada de ESDSA y, por lo tanto, de resistencia a la radiación.

60 En cuanto a la pregunta de si ESDSA puede explicar la aparente fidelidad de la reparación del ADN en *D. radiodurans*, se puede decir en general que cuanto mayor es el número de fragmentos de ADN, mayor es la precisión necesaria para evitar su ensamblaje incorrecto, y mayor debe ser la homología requerida. Si excepcionalmente hay muchas DSBs, se requiere una homología excepcionalmente larga, y por tanto una exposición de cadenas simples. Tales salientes excepcionalmente largos se sintetizan de nuevo en el transcurso de la ESDSA (Fig. 1). Sin

embargo, cualquier reparación basada en la homología del ADN fragmentado suscita la cuestión de la exactitud del ensamblaje de los fragmentos cromosómicos que contienen secuencias repetitivas. El hecho de que todas las repeticiones largas, p.ej., los transposones, se hayan seleccionado negativamente por completo del genoma de *D. radiodurans*^{17,28} puede ser debido a su efecto perjudicial sobre la precisión de la ESDSA. El problema de un ensamblaje de fragmentos incorrecto a través de las secuencias repetitivas se podría evitar en ESDSA si los salientes monocatenarios fueran mucho más largos que las secuencias repetitivas más largas. En ese caso, la hibridación de solamente un bloque de secuencias repetidas en un saliente monocatenario no podría enlazar fácilmente los dos fragmentos. Tales estructuras parcialmente hibridadas son los sustratos preferidos para las ADN helicasas y, por lo tanto, estas asociaciones anormales de ADN se deberían eliminar fácilmente. La evitación del ensamblaje letal de fragmentos de ADN no contiguos puede haber proporcionado una presión selectiva suficiente para la evolución del mecanismo de ESDSA (salientes monocatenarios largos) en vez del mecanismo de SSA (con salientes más cortos) (Fig. 1). Los experimentos de los inventores sugieren que el tamaño de los salientes de ESDSA es similar al tamaño de los fragmentos, es decir, alrededor de 20 a 30 kb, mucho más largo que las secuencias repetitivas más largas de *D. radiodurans* (IS de alrededor de 1 kb)^{17,28}.

A medida que la precisión del ensamblaje de fragmentos en el proceso de ESDSA se hace elevada debido a los salientes largos, la fidelidad de la producción de tales salientes mediante la prolongación de cadenas (los intermedios entre corchetes en la Fig. 1) se hace limitante para la fidelidad global de la reparación del ADN. Se sugiere, por lo tanto, que se pueden considerar cuatro estrategias para asegurar la fidelidad tanto del cebado como de la hibridación:

- (1) emparejamiento homólogo de fragmentos de ADN bicatenarios antes del inicio de bucles D, quizás mediante la RecA deinocócica²⁰,
- (2) edición del proceso de emparejamiento mediante la reparación de los emparejamientos incorrectos^{29,30},
- (3) proteínas de unión a repeticiones¹⁷ que impiden que las repeticiones de secuencias se hagan monocatenarias o que hibriden, y
- (4) estructuras secundarias estables (en la práctica horquillas) de secuencias repetitivas²⁸ que impiden su hibridación.

Con tal de que se pudiera averiguar cuáles son las etapas intermedias en la reparación del ADN deinocócico, y después reproducir, *in silico*, el proceso de ensamblaje de fragmentos, se podía convertir en una alternativa a los programas de contiguos actuales. Finalmente, dada la elevada transformabilidad de *D. radiodurans* por el ADN exógeno, tal como se demuestra en esta invención, puede ser que, en el pasado evolutivo de *D. radiodurans*, una reparación similar a ESDSA tras periodos de desecación haya conducido a la incorporación de ADN exógeno. Esto explicaría la extraordinaria diversidad de linajes genéticos representados en el cromosoma de *D. radiodurans* (*Bacillus*, *Thermus* y de múltiples genes eucarióticos)^{17,28}.

Los experimentos en los que se basa la presente invención se resumen como sigue.

40 **Síntesis de ADN y reparación de cromosomas de *D. radiodurans* fragmentados mediante radiación.**

Para distinguir entre estos mecanismos hipotéticos, se exploró en paralelo la cinética de la unión de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la velocidad de la síntesis de ADN mediante marcaje por pulso de 3H-TdR de 15 min tras radiación gamma de 7 kGy.

Existe claramente una coincidencia temporal del ensamblaje de los fragmentos y de la síntesis de ADN masiva observada que se da sin división celular a una velocidad mucho mayor que en el cultivo de células no irradiadas en crecimiento (Figs. 1A y B). Esta síntesis de ADN está ausente en una cepa *polA* (Fig. 1D) que tampoco muestra signos de reparación del ADN (Fig. 1C). Junto con la sensibilidad a la radiación del mutante *polA*, estas observaciones no se pueden adaptar fácilmente a los mecanismos (i) y (ii). En general están de acuerdo con todos los mecanismos (iii-v) que implican una síntesis de ADN considerable. Los mecanismos de SDSA (iv), y en un menor grado de SSA (iii), están favorecidos si la dependencia de PolA se debe a la elongación monocatenaria catalizada por PolA (con o sin la participación de la ADN pol III) (Fig. 4), pero el mecanismo de CC (v) no se puede excluir *a priori* debido a que PolA podría iniciar o facilitar de otra manera una síntesis bicatenaria semi-conservativa catalizada por Pol III (horquillas de replicación).

Se confirma el ensamblaje de fragmentos en gran medida independiente de RecA ya observado⁵ (Fig. 1E) que va en paralelo a una síntesis de ADN sustancial durante el tiempo de reparación efectiva (Fig. 1F). Estos experimentos establecen una correlación entre la síntesis de ADN dependiente de PolA y la reparación por recombinación de cromosomas muy fragmentados de *D. radiodurans*. El requerimiento estricto de RecA para la aparición de cromosomas de tamaño completo, un prerrequisito para la supervivencia celular, sugiere la implicación clave de RecA en la maduración de cromosomas circulares funcionales (Fig. 5).

Análisis mediante gradiente de densidad de la estructura de los cromosomas reparados

El análisis mediante gradiente de densidad del ADN de cultivos sin irradiar de *D. radiodurans* (Fig. 2C) está de acuerdo con el experimento de Meselson-Stahl con *E. coli*, es decir, la replicación de todos los elementos cromosómicos parece semi-conservativa: la densidad H/L (pesada/ligera) aparece tras el primer ciclo de replicación, H/H durante el segundo. Además, tras la desnaturalización del ADN y la centrifugación en gradientes alcalinos de CsCl, todo el material monocatenario se separa en densidades H o L (Figs. 2A1, B1 C1). Debido al patrón de marcaje con (L 3H-TdR)* radiactivo (* indica el marcador radiactivo) y de marcaje por densidad (H 5-BrdU), los cultivos no irradiados de *D. radiodurans* en crecimiento muestran, en el régimen pre-marcaje, solamente material H/L* (Fig. 2A) (y solamente L* en los gradientes desnaturalizantes, Fig. 2A1); en el régimen post-marcaje predominantemente H*/L y, hasta el grado de la segunda ronda de replicación, también el H*/H* (Fig. 2B) (y solamente *H en gradientes desnaturalizantes, Fig. 2B1). Se llamará "viejo" al ADN ligero sintetizado antes de la irradiación, y "nuevo" al ADN pesado sintetizado tras la irradiación.

Debido a que solamente el ADN viejo se daña en los experimentos de radiación, y a que la reparación tiene lugar en el medio pesado, se espera que las dos cadenas del ADN reparado mediante NHEJ y HR sean básicamente viejo/viejo y las producidas mediante CC completamente nuevo/nuevo. Los patrones de densidad del ADN reparado durante 3 horas tras la radiación gamma no se parecen a una replicación semi-conservativa y no apoyan NHEJ, HR ni CC como mecanismo de reparación predominante (texto anterior y Figs. 2A-C). En los gradientes neutros de densidad, el ADN viejo "pre-marcado" se propaga hacia las densidades intermedias por la incorporación de 5-BrdU tras la irradiación (Fig. 2A). Por otra parte, el ADN nuevo "post-marcado" sintetizado tras la irradiación se desplaza hacia las densidades pesadas (Fig. 2B). Ambos resultados son compatibles con el mecanismo de SDSA (y, en menor grado, SSA) pero sólo si, tras la desnaturalización, las cadenas monocatenarias también muestran densidades intermedias debido al conjunto fragmentario esperado de bloques de material viejo y nuevo (Fig. 4). De hecho, en gradientes alcalinos de densidad de CsCl, las densidades de las cadenas monocatenarias pre-marcadas se desplazan sustancialmente de la densidad ligera (vieja) hacia la densidad pesada (nueva) (Fig. 2C1). Debido a que el tamaño del ADN aislado mediante el método descrito está en el intervalo de 15 a 20 kb, es decir, en general menor que el tamaño *in vivo* de los fragmentos tras una irradiación de 7 kGy (alrededor de 30 kb), la detección de los fragmentos que contienen material viejo y nuevo disminuye. Estos resultados apoyan el modo "distributivo" hipotético³¹ de replicación (reparativa) del ADN predicho mediante el mecanismo de SDSA y, en menor grado, SSA.

¿Cuál es el tamaño relativo de los fragmentos recién sintetizados? La Figura 2A1 muestra que, en el régimen de "pre-marcaje", la densidad de la mayoría del material monocatenario es más pesada que la densidad ligera (vieja) pero más ligera que la densidad pesada (nueva). Lo recíproco no es cierto: en el régimen "post-marcaje", el ADN monocatenario está bajo el pico pesado y se desvía hacia las densidades más ligeras (Fig. 2B1). En otras palabras, durante la reparación en presencia de 5-BrdU de los fragmentos inicialmente ligeros, las cadenas ligeras viejas se hacen más pesadas (por la asociación con el material pesado) de lo que las cadenas pesadas nuevas se hacen más ligeras (por la asociación con el material ligero). Esto sugiere que, en los fragmentos de ADN analizados, la extensión del material recién sintetizado (marcado por densidad y radiactivamente) es a menudo más largo que la extensión del material ligero original (marcado radiactivamente pero no por densidad). Esto coincide con el modelo de SDSA. Si el modelo de SSA fuera correcto, requería que el retroceso de los extremos de los fragmentos fuera muy considerable para explicar la síntesis masiva de ADN dependiente de PolA asociada a la reparación (Fig. 1A,B). A nivel monocatenario, el ADN reparado parece un conjunto fragmentario de material viejo y nuevo, esperado a partir de los mecanismos SDSA y SSA (Fig. 4).

Si un mecanismo es predominante, ¿se puede distinguir entre los dos? El mecanismo de SSA predice que, tras la ruptura del ADN mediante sonicación (hasta fragmentos de alrededor de 3 kb, no mostrados), el ADN bicatenario se debería estar separando hacia el nuevo/viejo y viejo/viejo, mientras el mecanismo de SDSA predice (en el régimen post-marcaje) una segregación significativa hacia las densidades nuevo/nuevo en gradientes neutros (véase la Fig. 4). Las Figuras 2 A2-C2 muestran una distribución de densidades muy grande de fragmentos de ADN sometidos a sonicación, lo que complica la detección de cualquier especie molecular de densidad diferente minoritaria.

La cantidad de material L/L en el experimento pre-marcaje (Fig. 2A) demuestra que una gran fracción de moléculas no contiene una extensión significativa de síntesis reparativa de ADN. Debido a que el tamaño del ADN aislado es aún menor que el tamaño de los fragmentos del ADN roto mediante radiación, podría ser que el material L/L represente (a) fragmentos de ADN disociados de la síntesis reparativa, (b) los fragmentos de ADN sin reparar de células muertas, y/o (c) los fragmentos sin utilizar de las células supervivientes. Dado que no se observa ningún signo de fragmentos de ADN sin usar en los experimentos de PFGE (Fig. 1A,E), la opción (a) sigue siendo la más probable.

Distribución de los fragmentos de ADN recién sintetizados revelada mediante fotolisis del ADN

La sustitución con 5-BrdU sensibiliza a las cadenas de ADN a la ruptura mediante fotolisis mediante el uso de luz UV o luz visible de longitud de onda corta³²⁻³⁴. Se confirma que, también en estas condiciones experimentales, la sustitución monocatenaria con 5-BrdU (durante 1,5 h, es decir, menos de un tiempo de generación) de cromosomas no irradiados de *D. radiodurans* no sensibiliza de manera significativa al ADN a la ruptura bicatenaria mediante fotolisis

inducida por UV. La sustitución bicatenaria con 5-BrdU provoca una ruptura considerable del ADN (resultados no mostrados). La fotolisis intracelular descompone el ADN reparado en 5-BrdU mediante ruptura bicatenaria prácticamente reproduciendo el patrón de la ruptura inicial del ADN mediante rayos gamma observada antes del inicio de la reparación (Fig. 3). La fragmentación del ADN inducida por luz UV no se incrementa más allá de la dosis de saturación de 250-500 J/m², a la vez que sí lo hace para el ADN completamente sustituido (no mostrado). Este patrón de fotolisis dependiente de 5-BrdU sugiere que la mayoría, quizás todos, los fragmentos reensamblados se enlazan entre sí por medio de bloques bicatenarios de ADN recién sintetizado (en color rojo en la Fig. 4), tal como se predice mediante SDSA.

10 Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, condiciones de cultivo, e irradiación gamma. Se usaron las siguientes cepas de *D. radiodurans*: R1 (ATCC 13939) de tipo natural³⁵, GY10922 D(*cinA-recA*)1::kan³⁶, e IRS501 *poIA* (J. R. Battista). Se aisló un derivado que requería timina (*thy*-) de la cepa R1 mediante selección en medio mínimo sólido que contenía timina (50 mg/ml) y trimetoprim (100 mg/ml)³⁷.

Las bacterias se cultivaron en caldo TGY (0,5 % de triptona, 0,1 % de glucosa, 0,15 % de extracto de levadura) a 30 °C hasta la fase exponencial tardía (OD₆₅₀=0,6 - 0,8). Los cultivos se lavaron en tampón de fosfato sódico 10 mM, se concentraron 10 veces en el mismo tampón, y se irradiaron sobre hielo con una fuente de rayos gamma de 60Co a una dosis de 11 Gy/s. La dosis de 7 kGy se aplicó a las células en todos los experimentos de radiación. El número de células viables se estimó colocando diluciones en serie en placas de TGY. Las placas se incubaron durante 3-4 días a 30 °C antes de contar las colonias.

Cinética de la reparación del ADN medida mediante electroforesis en gel de campo pulsado. Los cultivos irradiados se diluyeron en TGY hasta una OD₆₅₀=0,2 y se incubaron a 30 °C. A intervalos durante la incubación post-irradiación, se tomaron muestras de 5 ml para preparar bloques de ADN como describieron Mattimore y Battista⁴. El ADN contenido en los bloques se digirió con 60 unidades de la enzima de restricción NotI (Roche) durante 16 h a 37 °C. Tras la digestión, los bloques se sometieron a electroforesis en gel de campo pulsado en 0,5xTBE mediante el uso de un sistema de electroforesis CHEF-DR III (Bio-Rad) a 6 V/cm² durante 20 h a 14 °C, con una rampa de pulsos lineal de 50-90 s y un ángulo de desviación de 120°.

Velocidad de la síntesis del ADN medida mediante marcaje del ADN por pulsos. A intervalos durante el crecimiento exponencial de cultivos no irradiados e irradiados, se tomaron muestras de 0,5 ml y se mezclaron con 0,1 ml de medio TGY pre-calentado que contenía 6 mCi de 3H-timidina (Amersham; actividad específica de 86 Ci/mmol). Los pulsos se terminaron tras 15 min mediante la adición de 2 ml de TCA helado al 10%. Las muestras se mantuvieron en hielo durante al menos 1 h, y después se recogieron mediante succión en filtros Whatman GF/C, seguido de lavado con TCA al 5% y etanol al 96%. Los filtros se secaron durante la noche a temperatura ambiente, y se colocaron en 5 ml de líquido de centelleo. Las cuentas precipitadas se midieron en un contador de centelleo líquido (Wallac).

Marcaje del ADN radiactivo y por densidad. Se marcaron radiactivamente y por densidad células de *D. radiodurans thy*- durante el cultivo en presencia de 3H-timidina y 5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU), respectivamente. El marcaje por densidad se llevó a cabo en todos los experimentos añadiendo 5-BrdU al medio únicamente tras la irradiación. El marcaje radiactivo se llevó a cabo en tres regímenes diferentes. (a) "Pre-marcaje": las células se cultivaron durante la noche en TGY complementado con 5 mCi/ml de 3H-timidina. Se recogieron mediante centrifugación, se lavaron dos veces con tampón fosfato, se concentraron 10 veces en el mismo tampón, y se expusieron a radiación gamma de 7 kGy. Los cultivos tanto irradiados como no irradiados se diluyeron hasta una OD₆₅₀=0,2 en TGY que contenía 20 mg/ml de 5-BrdU. El cultivo no irradiado se cultivó en TGY complementado con 5-BrdU durante 2,5 h (que correspondía a una duplicación de la masa), mientras el cultivo irradiado se cultivó durante 3 h (el tiempo necesario para que se completase la reparación de DSBs) a 30 °C. (b) "Post-marcaje": las células se cultivaron durante la noche en TGY no radiactivo, y se añadió radiactividad (20 mCi/ml de 3H-timidina) al TGY complementado con 5-BrdU únicamente tras la irradiación. El procedimiento experimental fue, por otra parte, el mismo que el descrito para el "pre-marcaje". (c) "Pre- y post-marcaje": el procedimiento fue una combinación de (a) y (b), es decir, las células se marcaron radiactivamente antes y después de la irradiación.

Preparación del ADN y análisis mediante gradiente de densidad. Se aisló ADN marcado radiactivamente y por densidad de *D. radiodurans* mediante el uso del equipo DNeasy Tissue Kit de Qiagen según las instrucciones del proveedor. En ciertos experimentos, el ADN se fragmentó adicionalmente mediante sonicación. Para ese fin, se sometió a muestras de ADN de 100 ml a sonicación (Vibracell 72434, Bioblock) con un número creciente de ráfagas de 5 seg. Las condiciones de sonicación óptimas que producían fragmentos de 3-5 kb se determinaron mediante electroforesis en gel.

El ADN se centrifugó hasta el equilibrio en una disolución de cloruro de cesio neutro o alcalino (CsCl) (1,7246 g/ml) en un rotor VTi90 (Beckman) durante 24 h a 40.000 rpm y 20 °C. Para obtener la concentración deseada de CsCl, se ajustó el índice refractivo de la disolución de CsCl (mediante la adición de agua) hasta 1,4030 para los gradientes neutros, y hasta 1,4050 para los gradientes alcalinos. Para los gradientes alcalinos, se desnaturalizó el ADN me-

diante un calentamiento de 10 min en agua hirviendo, se enfrió en agua helada, y se ajustó la disolución de CsCl hasta un pH 11,8. Los gradientes se recogieron del fondo de tubos perforados (OptiSeal 4,9 ml, Beckman) en aproximadamente 25 fracciones (12 gotas). Se aplicaron alícuotas de 100 ml de las fracciones sobre filtros redondos, se secaron bajo una lámpara durante varias horas, y se midió la radiactividad mediante recuento de centelleo.

5 **Fotolisis inducida mediante UV del ADN sustituido con BU.** Se incubó un cultivo de *D. radiodurans thy-* y se irradió con radiación gamma de 7 kGy gamma tal como se describió anteriormente. El cultivo irradiado se diluyó hasta una OD₆₅₀=0,2 y se cultivó en TGY complementado con 5-BrdU durante 3 h. Las células se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón fosfato y se incubaron (privadas de nutrientes) en tampón durante una hora a 30 °C. La suspensión celular se enfrió en hielo y se expuso en una capa fina a 1000 J/m² de luz UV de 254 nm. Tanto las células irradiadas con UV como las no irradiadas se incrustaron en bloques de agarosa para el análisis del ADN mediante PFGE (véase anteriormente).

10

REFERENCIAS

- 1 Lees-Miller, S. P. & Meek, K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**, 1161-1173 (2003).
- 2 Wilson, T. E., Topper, L. M. & Palbos, P. L. Non-homologous end-joining: bacteria join the chromosome breakdance. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 62-66 (2003).
- 3 Levin-Zaidman S. *et al.* Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* **299**, 254-256 (2003).
- 4 Haber, J. E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* **16**, 259-264 (2000).
- 5 Daly, M. J. & Minton, K. W. An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **178**, 4461-4471 (1996).
- 6 Paques, F. & Haber, J. E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 349-404 (1999).
- 7 Gloor, G. B., Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science* **253**, 1110-1117 (1991).
- 8 Lederberg, J. Recombination mechanisms in bacteria. *J. Cell Comp. Physiol.* **45**, 75-107 (1955).
- 9 Potts, M. Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol.* **9**, 553-559 (2001).
- 10 Minton, K. W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **13**, 9-15 (1994).
- 11 Battista, J. R., Earl, A. M. & Park, M. J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol.* **7**, 362-365 (1999).
- 12 Mattimore, V. & Battista, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**, 633-637 (1996).
- 13 Sanders, S. W. & Mawcy, R. B. Isolation of radiation-resistant bacteria without exposure to radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 436-439 (1979).

- 14 Krasin, F. & Hutchinson, F. Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* which requires *recA* function and the presence of duplicate genome. *J. Mol. Biol.* **116**, 81-98 (1977).
- 15 Fujimori, A. et al., Rad52 partially substitutes for Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **20**, 5513-5520 (2001).
- 16 Dean, C. J., Feldschreiber, P. & Lett, J. T. Repair of X-ray damage to the deoxyribonucleic acid in *Micrococcus radiodurans*. *Nature* **209**, 49-52 (1966).
- 17 White, O. et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Science* **286**, 1571-1577 (1999).
- 18 Ferreira, A. C. et al. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. *Extremophiles* **3**, 235-238 (1999).
- 19 Narumi, I. Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go. *Trends Microbiol.* **11**, 422-425 (2003).
- 20 Cox, M. M. & Battista, J. R. Resisting ionizing radiation: *Deinococcus radiodurans* is a little different (not that there's anything wrong with that). *Nature Microbiology* in press.
- 21 Harsojo, Kitayama, S. & Matsuyama, A. Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 877-880 (1981).
22. Gutman, P.D., Fuchs, P. & Minton, K.W. Restoration of the DNA damage resistance in *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase I mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment, *Mutation Research, DNA repair* **314**, 87-97 (1994).
- 23 Lin, J. et al. Whole-genome shotgun optical mapping of *Deinococcus radiodurans*. *Science* **285**, 1558-1562 (1999).
- 24 Radding, C.M. Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. *Annu Rev Genet* **16**, 405-437 (1982).
- 25 Harris, D. R. et al. Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol.* **2**, e304 (2004).
- 26 Lindahl, T. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem.* **51**, 61-87 (1982).
- 27 Zimmerman, J. M. & Battista, J. R. A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in *Deinococcaceae*. *BMC Microbiol.* **5**, 17-27 (2005).

- 28 Makarova, K. S. *et al.* Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 44-79 (2001).
- 29 Rayssiguier, C., Thaler, D. S. & Radman, M. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**, 396-401 (1989).
- 30 Menecier, S., Coste, G., Servant, P., Bailone, A. & Sommer, S. Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Genet. Genomics* **272**, 460-469 (2004).
- 31 Meselson, M. & Stahl, F. W. The replication of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **23**, 9-12 (1958).
- 32 Lion, M. B. Search for a mechanism for the increased sensitivity of 5-bromouracil-substituted DNA to ultraviolet radiation. II. Single-strand breaks in the DNA of irradiated 5-bromouracil-substituted T3 coliphage. *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 24-33 (1970).
- 33 Radman, M., Roller, A. & Errera, M. Protection and host cell repair of irradiated bacteriophage lambda: III Ultraviolet irradiation of 5-bromouracil-substituted phage. *Mol. Gen. Genet.* **104**, 152-156 (1969).
- 34 Lohman, P. H. M., Bootsma, D. & Hey, A. H. The influence of 5-bromodeoxyuridine on the induction of breaks in deoxyribonucleic acid of cultivated human cells by X-irradiation and ultraviolet light. *Radiation Res.* **52**, 627-641 (1972).
- 35 Anderson, A. W., Nordon, H. C., Cain, R. F., Parrish, G. & Duggan, D. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation. *Food. Technol.* **10**, 575-578 (1956).
- 36 Bonacossa de Almeida, C., Coste, G., Sommer, S. & Bailone, A. Quantification of RecA protein in *Deinococcus radiodurans* reveals involvement of RecA, but not LexA, in its regulation. *Mol. Genet. Genomics* **268**, 28-41 (2002).
- 37 Little, J. G. & Hanawalt, P.C. Thymineless death and ultraviolet sensitivity in *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **113**, 233-240 (1973).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de ingeniería cromosómica, que comprende las etapas de:
- 5 1) proporcionar una bacteria resistente a la radiación y/o a la desecación y/o al tratamiento químico que tiene un mecanismo de reparación del ADN que comprende una etapa de hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada (ESDSA) y una etapa de recombinación homóloga dependiente de RecA;
- 10 2) inducir el mecanismo de reparación del ADN sometiendo a la bacteria a radiación, desecación y/o tratamiento químico que puede dañar el ADN, para fragmentar sustancialmente sus cromosomas hasta fragmentos cortos, y dicho mecanismo de reparación del ADN comprende:
- 15 - hibridar colas monocatenarias complementarias prolongadas mediante la síntesis (ESDSA) que utiliza como molde fragmentos de ADN parcialmente solapantes de dichos cromosomas fragmentados, y
- convertir los intermedios de ADN lineales largos resultantes en cromosomas circulares intactos, por medio de una recombinación homóloga dependiente de RecA;
- 20 3) insertar en los cromosomas fragmentados al menos una fuente exógena de material genético para que se convierta en parte integral del mismo durante el proceso de reparación del ADN de la etapa 2), y dicha fuente exógena de material genético comprende al menos un ADN seleccionado del grupo que consiste en ADN intacto o fragmentado de cualquier especie biológica o ADN creado mediante síntesis artificial; y
- 4) opcionalmente separar y recoger los cromosomas recombinados así obtenidos.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la bacteria se expone a al menos una irradiación gamma de alrededor de 0,7 megarad (7 kGy) o a desecación.
- 25 3. El proceso de la reivindicación 1 ó 2, en el que la fuente exógena de material genético comprende operones completos que codifican rutas biosintéticas, p.ej. para la biodegradación de contaminantes ambientales, para la bioconversión de energía, o para la síntesis de antibióticos, proteínas terapéuticas u otros compuestos útiles.
- 30 4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los fragmentos de ADN exógeno comprenden prolongaciones en 3' sintéticas.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ADN exógeno se prolonga mediante síntesis o adición en los extremos mediante una ADN ligasa con una secuencia bacteriana elegida, preferiblemente que corresponde a una de sus secuencias IS, para ofrecer múltiples elecciones de integración inocua.
- 35 6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que todos los fragmentos de ADN de cualquier fuente elegida de material genético o mezcla de materiales se prolonga mediante la misma secuencia de manera que, en la misma célula, estos fragmentos de ADN se pueden hibridar directamente en los extremos, en cualquier combinación posible, antes de integrarlos en el cromosoma.
- 40 7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el uso de al menos un medio seleccionado del grupo que consiste en la capacidad de transformación natural, sexo bacteriano, tal como la capacidad de conjugación o transducción, y medios artificiales, tales como electroporación o modificación química de la membrana celular, para introducir ADN exógeno en la bacteria viva que experimenta la reparación del ADN.
- 45 8. El proceso de la reivindicación 7, que comprende además desencadenar el proceso de reparación del ADN mediante irradiación ionizante o ultravioleta, o mediante productos químicos que dañan el ADN, tales como mitomicina C, antes o después de la introducción de ADN exógeno en la bacteria.
- 50 9. El uso de una bacteria resistente a la radiación y/o la desecación y/o el tratamiento químico que tiene un mecanismo de reparación del ADN que comprende una etapa de hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada (ESDSA) y una etapa de recombinación homóloga dependiente de RecA, para producir especies híbridas nuevas o cromosomas nuevos mediante recombinaciones intergenéricas y/o interespecíficas *in vivo* que comprende:
- 55 - preparar ADN exógeno que está provisto de sitios de integración añadiendo adiciones terminales monocatenarias o bicatenarias idénticas, o similares, a cualquier sitio del cromosoma bacteriano en el que integrarse durante el proceso de reparación del ADN;
- 60 - introducir dicho ADN exógeno en un cromosoma bacteriano durante un mecanismo de reparación del ADN, y dicho mecanismo de reparación del ADN comprende una etapa de hibridación de cadenas dependiente de una síntesis prolongada (ESDSA) y una etapa de recombinación homóloga dependiente de RecA.
- 65 10. El uso de la reivindicación 9, en el que la bacteria es *Deinococcus radiodurans*.

FIG 1: Cinética de la reparación del ADN y velocidad de síntesis del ADN

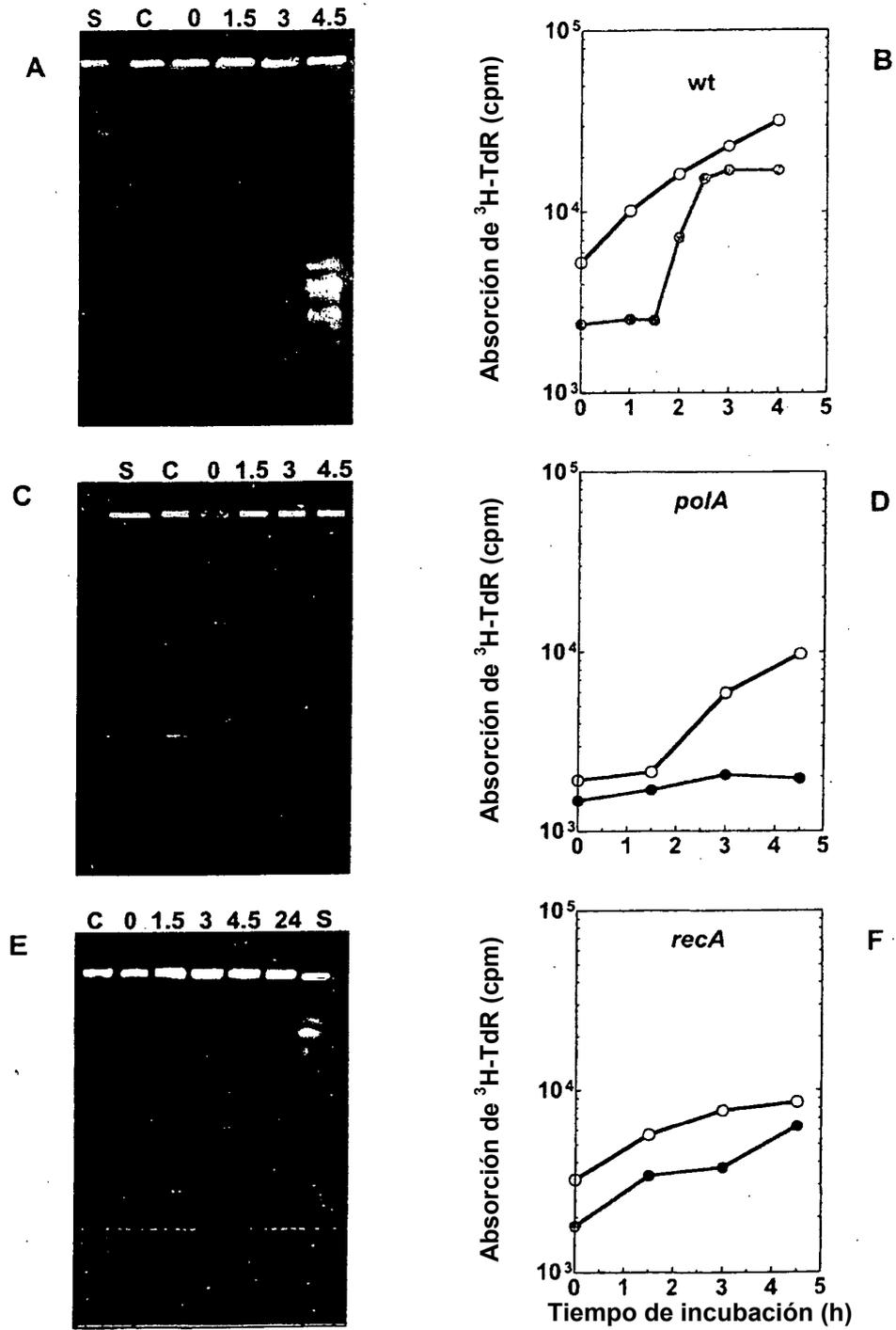
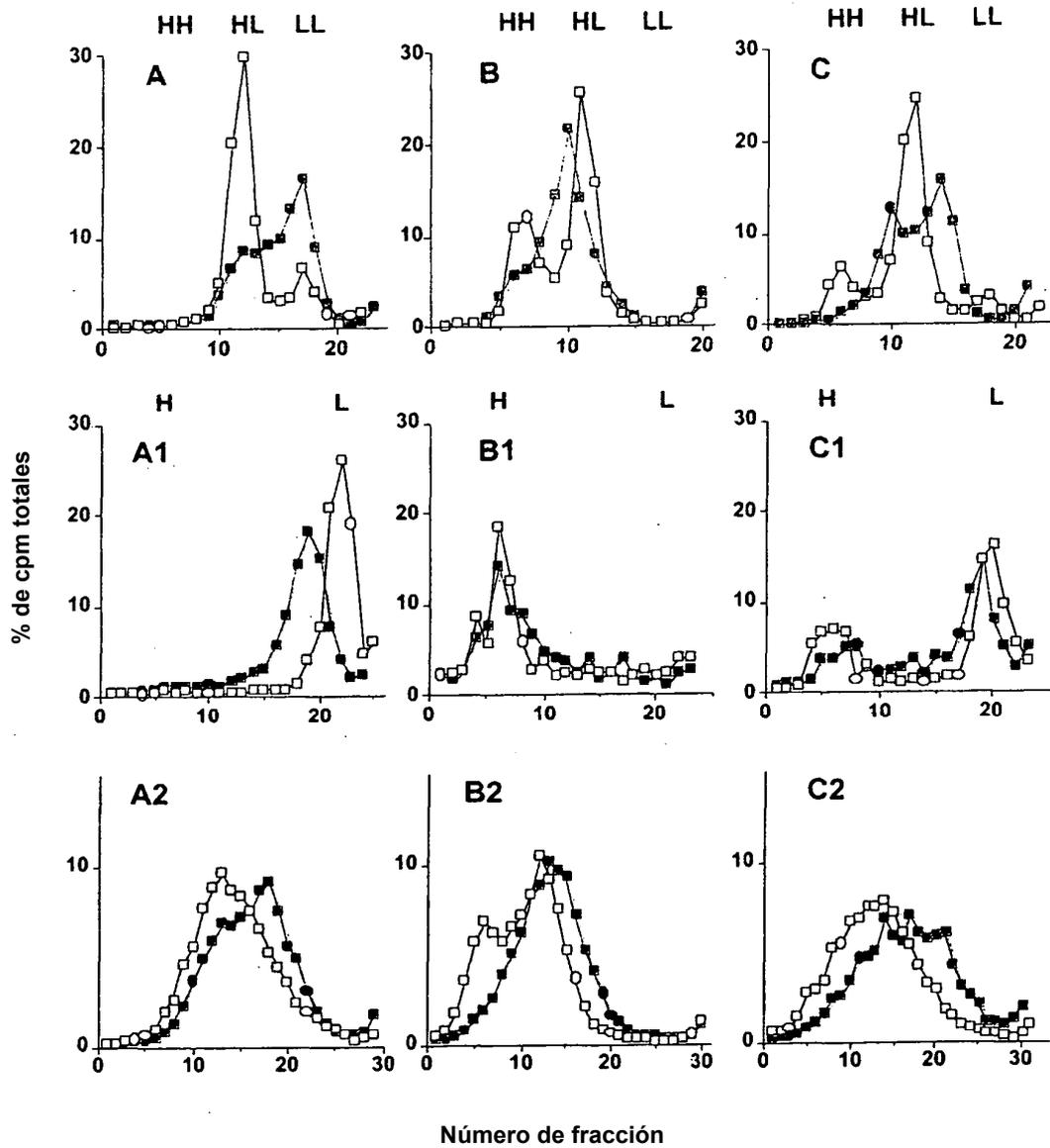
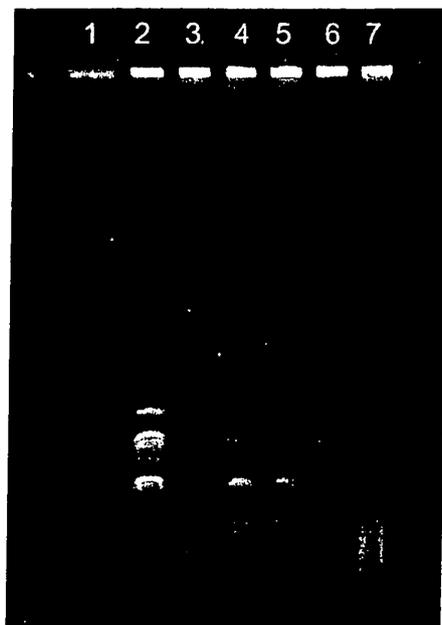


FIG 2: Análisis en gradiente de densidad del ADN reparado tras irradiación gamma en presencia de análogo pesado de 5-BrdU



Símbolos claros: cultivo no irradiado; símbolos rojos oscuros: irradiado, reparación de 3 h. A1-A3: ADN pre-marcado; B1-B3: ADN post-marcado; C1-C3: pre y post-marcado. A-C: gradientes de CsCl neutros; A1-C1: gradientes alcalinos; A2-C2: ADN sonicado, gradientes neutros.

FIG 3: LA ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS REPARADOS
Síntesis reparativa en *D. radiodurans* γ -irradiadas revelada
mediante fotolisis de ADN sustituido con 5-BrdU



- Carril 1: patrón de *S. cerevisiae* (225 – 2200 kpb)
Carriles 2-7: ADN de *D. radiodurans thy*
2: sin irradiar, tiempo 0
3: irradiadas con 7 kGy, tiempo 0
4: 3h post-irradiación
5: 3 h post-irradiación + UV (1000 J/m²)
6: 3 h post-irradiación + BUdR
7: 3 h post-irradiación + BUdR + UV (1000 J/m²)

FIG 4: Mecanismos de SSA frente a SDSA para reparar ADN de *D. radiodurans* fragmentado mediante radiación ionizante

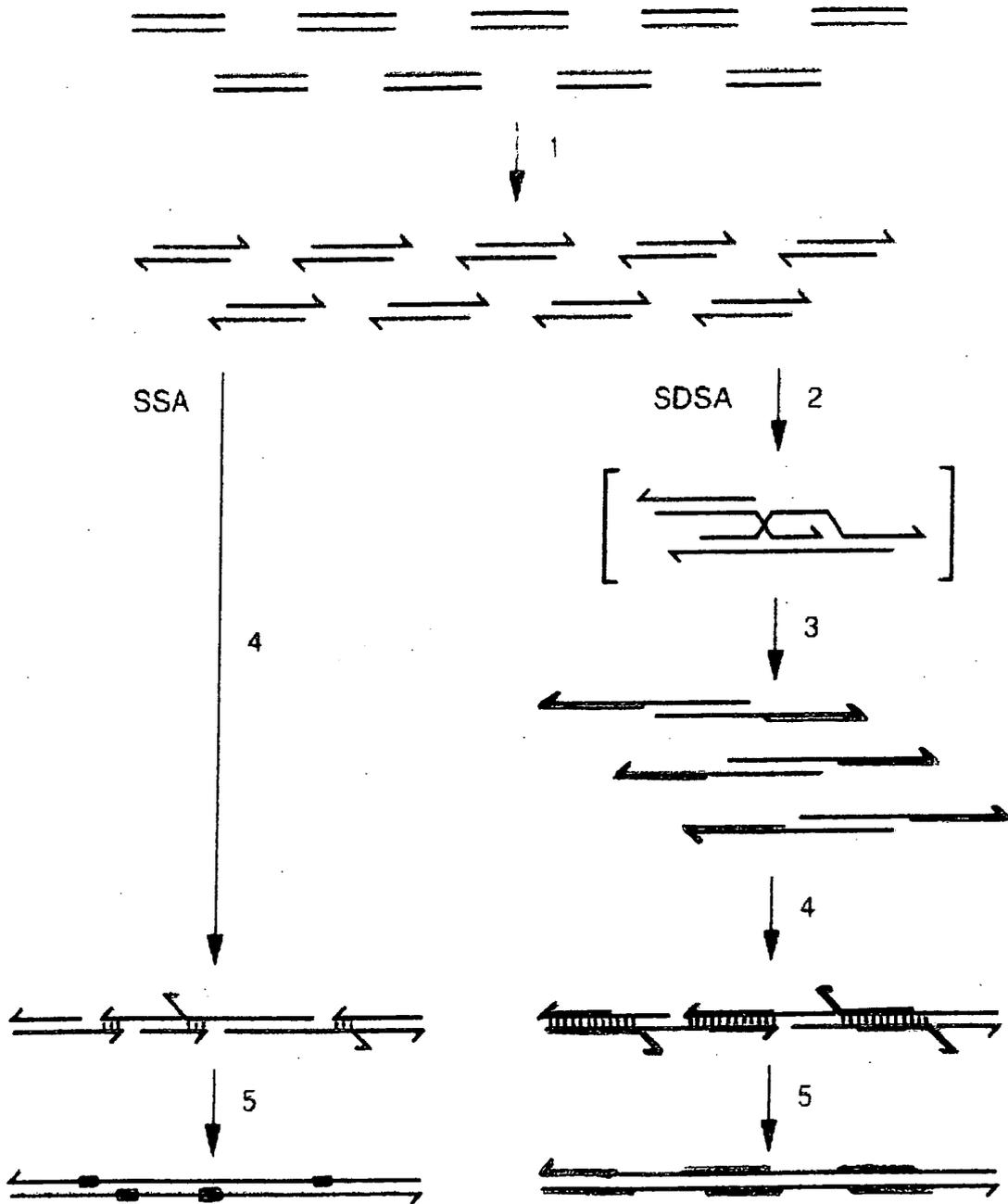


FIG 5

**DE 100 FRAGMENTOS HASTA EL CROMOSOMA REPARADO:
Implicación de dos mecanismos de reparación por recombinación
del ADN en *D. radiodurans***

