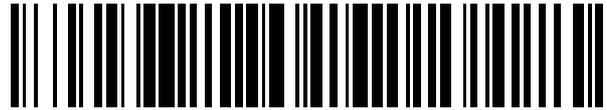


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 159**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09768220 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2366028**

54 Título: **Método para identificar inhibidores de ácido lipoteicoico sintasa**

30 Prioridad:

05.12.2008 GB 0822276

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE
(100.0%)
Kings Gate
Newcastle Upon Tyne NE1 7RU, GB**

72 Inventor/es:

**ERRINGTON, JEFFERY y
SCHIRNER, KATHRIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 396 159 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

Método para identificar inhibidores de ácido lipoteicoico sintasa

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos o ensayos para identificar agentes que pueden usarse como agentes antibacterianos, por ejemplo, como antibióticos.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha mostrado recientemente que el ácido lipoteicoico (LTA) es esencial para la viabilidad de *Staphylococcus aureus*. También se ha descrito una enzima responsable del ensamblaje de LTA en *S. aureus*. Esta enzima se ha nombrado ácido lipoteicoico sintasa, LtaS. Véase Gründling y Schneewind, 2007, PNAS 104: 8478-8483.

15 También existen homólogos de LtaS en otras bacterias. Por ejemplo, las cepas de *Bacillus* expresan un homólogo, previamente denominado *yfiE*. Gründling y Schneewind (mencionado anteriormente) demostraron que el homólogo de *ltaS* de *Bacillus subtilis* puede restaurar la síntesis de LTA y el crecimiento de estafilococos mutantes para *ltaS*. La inhibición de *ltaS* puede usarse por lo tanto como una diana para tratar infecciones humanas provocadas por *S. aureus* u otros patógenos bacterianos. Aunque Gründling y Schneewind (mencionado anteriormente) sugieren que LtaS podría ser una diana útil para la identificación de inhibidores que podrían usarse como compuestos antibacterianos, no se sugiere ningún método de ensayo específico. El ensayo usado por Gründling y Schneewind para encontrar el gen *ltaS* no sería fácilmente adaptable para exploración de compuestos.

25 En consecuencia, existe la necesidad de un ensayo para identificar inhibidores de LtaS.

Mbl es un homólogo de actina bacteriano que se cree que tiene un papel en la determinación de la forma celular situando la maquinaria sintética de la pared celular. También se cree que está implicado en el control de otras funciones incluyendo pluralidad celular y segregación de cromosomas en diversos organismos. *Bacillus subtilis* y muchas otras bacterias gram positivas tienen tres isoformas de actina, una de las cuales es Mbl, que se localiza conjuntamente con otras dos isoformas de actina MreB y MreBH en estructuras helicoidales que abarcan la longitud de la célula, cerca de la superficie interna de la membrana citoplasmática.

35 Estudios llevados a cabo con *Bacillus subtilis* han mostrado que los mutantes del gen *mbl* son inviables a niveles de Mg^{2+} normales. La aportación de altas concentraciones de Mg^{2+} , por ejemplo, 20 mM, rescata tales cepas de *Bacillus*. Véase Carballido-López *et al.*, 2006, Developmental Cell 11, 399-409.

Sumario de la invención

40 Los presentes inventores han identificado que la mutagénesis de transposón puede rescatar mutantes de *mbl*. En particular, las cepas de *Bacillus* que comprenden mutaciones de *mbl* pueden someterse a mutagénesis de transposón y sembrarse en placas en un medio de Mg^{2+} bajo para identificar y seleccionar mutaciones supresoras que permitan el crecimiento de las bacterias. El análisis de los mutantes de transposón identificó que la inactivación del gen *ltaS* provoca rescate de mutantes de *mbl* de modo que tales cepas puedan crecer en condiciones de Mg^{2+} bajo. En consecuencia, los presentes inventores describen ensayos para identificar inhibidores de LtaS identificando sustancias que pueden rescatar el crecimiento de mutantes de *mbl* en medio de Mg^{2+} bajo. Estos ensayos son métodos de exploración basados en células fáciles y económicos que posibilitan la exploración de un gran número de compuestos de una manera sencilla.

50 Por lo tanto, de acuerdo con los primeros aspectos de la presente invención, se proporciona un método para identificar un inhibidor de LtaS que comprende:

- (a) proporcionar una bacteria gram positiva que comprende una mutación en el gen *mbl* u homólogo del mismo que interrumpe la función del gen *mbl* u homólogo del mismo;
- 55 (b) cultivar la bacteria de (a) en presencia de una sustancia de ensayo en condiciones de magnesio menor de 3 mM;
- (c) supervisar el crecimiento de las bacterias;

60 en el que en el crecimiento o el crecimiento más rápido de las bacterias en comparación con crecimiento en ausencia de la sustancia de ensayo es indicativo de que la sustancia de ensayo es un inhibidor de LtaS.

Descripción de las figuras**Figura 1 - *B. subtilis* Δmbl depende de Mg^{2+}**

65 A. Eficacia de siembra después de transformación seleccionando delección de *mbl* con (izquierda) y sin (derecha) adición de Mg^{2+} 20 mM. B. Curva de crecimiento de *B. subtilis* de tipo silvestre (triángulos) y mutante de *mbl*

(cuadrados) a 37 °C en medio PAB sin (símbolos cerrados) y con (símbolos abiertos) adición de Mg^{2+} 20 mM. C-E. Morfología (microscopía de contraste de fases) de *B. subtilis* Δmbl cultivado en PAB (C) o en PAB complementado con Mg^{2+} 20 mM (D) en comparación con una cepa de tipo silvestre cultivada en PAB (E). Barra de escala 5 μm .

5 **Figura 2 - La delección de *ltaS* suprime la dependencia de Mg^{2+} de mutantes de *mbl*:**

A. Crecimiento de tipo silvestre (168), mutante de *mbl* (2505), mutante de *ltaS* (4283) y mutante de *mbl* suprimido ($\Delta mbl \Delta ltaS$, 4298) en placas NA con (izquierda) o sin (derecha) adición de Mg^{2+} 20 mM. B. Curvas de crecimiento de tipo silvestre (168, \blacklozenge), mutante de *mbl* (2505, \blacksquare), mutante de *ltaS* (4283, A) y mutante de *mbl* suprimido ($\Delta mbl \Delta ltaS$, 4298, O) en medio PAB a 37 °C. C. Microscopía de contraste de fases de tipo silvestre (168), mutante de *mbl* (2505), mutante de *ltaS* (4283) y doble mutante de *mbl ltaS* (4298) cultivados en medio PAB a 37 °C. Barra de escala 5 μm .

15 **Figura 3 - Efecto de la concentración de iones metálicos en la viabilidad de tipo silvestre y mutantes de *ltaS*:**
A. Crecimiento de tipo silvestre (168) y mutante de *ltaS* (cepa 4286) a 37 °C en placas NA sin aditivos (izquierda) que contienen Mg^{2+} 0,5 mM (medio) o con adición de Mn^{2+} 0,05 mM (derecha). B. Crecimiento de mutante de *ltaS* (cepa 4283, izquierda) y tipo silvestre (cepa 168, derecha) en placas de medio mínimo que contienen Mg^{2+} 10, 100 y 500 μM según se indica.

20 **Descripción de las secuencias**

La Tabla 4 a continuación expone las secuencias de los genes como se analizan en más posteriormente.

25 SEC ID N°: 1 y 2 son las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *yfiE* de *Bacillus subtilis*.
SEC ID N°: 3 y 4 son las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *mbl* de *Bacillus subtilis*.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona un método para la identificación de un inhibidor de LtaS. LtaS es una ácido lipoteicoico sintasa. LtaS de *Staphylococcus aureus* se ha identificado en la técnica anterior y se describe por ejemplo en Gründling y Schneewind (mencionado anteriormente). También se conocen homólogos de este gen en otras cepas bacterianas. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* porta un homólogo previamente identificado como *yfiE*. La secuencia para este gen se expone en SEC ID N°: 1 y 2.

35 De acuerdo con la presente invención se proporciona una cepa bacteriana de bacterias gram positivas, preferiblemente *Bacillus*, preferiblemente *B. subtilis*. La cepa bacteriana se selecciona o modifica para incluir una mutación funcional en el gen *mbl* de *B. subtilis* o un homólogo del mismo de otras bacterias gram positivas. Mbl es un homólogo de actina y se ha descrito previamente, por ejemplo, en Abhayawardhane y Stewart, 1995, J. of Bacteriol. 177: 765-773 y Jones *et al.*, Cell 104, 2001, 913-922.

40 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para Mbl se exponen en la Tabla 4, y se marcan como SEC ID N°: 3 y 4 respectivamente. Típicamente, un homólogo de *mbl* de otra bacteria es uno que tiene más de aproximadamente 50%, 55% o 65% de identidad, preferiblemente al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y particularmente preferiblemente al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4. Tales variantes pueden incluir variantes alélicas. La identidad de variantes de SEC ID N°: 4 puede medirse sobre una región de al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 330 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en SEC ID N°: 4 o más preferiblemente a lo largo de la longitud completa de SEC ID N°: 4.

50 La identidad de aminoácidos puede calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usado en sus ajustes por defecto) (Devereux *et al.* (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificar secuencias bivalentes o correspondientes (típicamente en sus ajustes por defecto)), por ejemplo como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36: 290-300; Altschul, S. F. *et al.* (1990) J Mol Biol 215: 403-10.

60 Está disponible software para realizar análisis de BLAST públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coincidan o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra de cercanía (Altschul *et al.*, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabra de cercanía iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativa.
65 Las extensiones para los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento

acumulativa queda fuera de la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sei. USA 89: 10915-10919), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la mínima probabilidad de suma (P(N)), que proporciona un indicio de la probabilidad con la que se produciría por azar una coincidencia entre dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la menor probabilidad de suma en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

La mutación funcional puede ser cualquier mutación que altere la función del gen *mbI*. Las mutaciones adecuadas incluyen mutaciones que interrumpen la fase abierta de lectura de modo que no puede expresarse una proteína Mbl funcional. Como alternativa, la mutación puede comprender una inserción, por ejemplo, por mutagénesis de transposón para alterar la expresión del gen. En una realización, se suprime parte de o todo el gen *mbI*. Típicamente, cuando se suprime el gen, se suprime al menos el 50% del gen *mbI*, por ejemplo, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. Pueden incluirse deleciones más pequeñas, por ejemplo, deleciones de una base para interrumpir la fase abierta de lectura o deleciones más pequeñas, por ejemplo en la región codificante N-terminal de modo que ya no se exprese una proteína funcional. Otras mutaciones que pueden incorporarse son las mutaciones que provocan sustituciones de aminoácidos en sitios críticos en la proteína, tales como las requeridas para unión de ATP. Puede usarse cualquier mutación en o cerca del gen *mbI* que genere un fenotipo en el que las células se hagan más dependientes de altas concentraciones de Mg²⁺ en el medio de crecimiento.

Los mutantes de *mbI* dependen de Mg²⁺ para su crecimiento. Por lo tanto, los mutantes *mbI* útiles de acuerdo con la presente invención son inviables o crecen poco en condiciones de Mg²⁺ bajo. La complementación del medio de cultivo con Mg²⁺ restaura el crecimiento celular a tales mutantes bacterianos.

Las mutaciones funcionales en el gen *mbI* pueden romper la función del gen de modo que ya no se exprese una proteína funcional. Por lo tanto, tales mutaciones pueden afectar a la segregación de los cromosomas o al posicionamiento de la maquinaria sintética de pared celular. La identificación de mutantes adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo a través de un análisis simple de la capacidad de tales mutantes para crecer con Mg²⁺ bajo o normal. Como se ha explicado anteriormente, los mutantes de *mbI* dependen de Mg²⁺ para su crecimiento. Los métodos de ensayo de acuerdo con la presente invención usan niveles altos de Mg²⁺, y por lo tanto, un mutante adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención es uno en el que una mutación del gen *mbI* conduce a una bacteria que es inviable, o que crece poco en condiciones de Mg²⁺ bajo, por ejemplo, en las que el tiempo de duplicación de un mutante tal a concentraciones de magnesio de menos de 5 mM es típicamente mayor de 12 horas o mayor de 24 horas.

De acuerdo con los métodos de ensayo de la presente solicitud, las cepas mutantes de *mbI* se cultivan en condiciones de Mg²⁺ bajo en presencia de una sustancia de ensayo. Una sustancia de ensayo que actúa como un inhibidor de LtaS restaura la viabilidad de las cepas bacterianas en tales condiciones de Mg²⁺ bajo.

Antes de llevar a cabo los métodos de ensayo de la presente invención, en presencia de una sustancia de ensayo, las cepas mutantes de *mbI* pueden cultivarse en condiciones de Mg²⁺ alto o complementado, de modo que las bacterias puedan crecer en estas condiciones. Típicamente, para crecimiento bacteriano de mutantes de *mbI*, Mg²⁺ está presente en el intervalo de 1 a 100 mM, preferiblemente 3 mM a 50 mM, preferiblemente 5 mM a 30 mM. Por ejemplo, el medio de crecimiento puede complementarse con Mg²⁺ aproximadamente 20 mM. Para el fin de un ensayo, y la compleción del ensayo en un periodo de tiempo conveniente, puede usarse cualquier medio que soporte una tasa de crecimiento razonable del mutante de *mbI* (por ejemplo tiempo de duplicación mayor de 120 minutos a 37 °C).

Típicamente, un cultivo bacteriano de un mutante de *mbI* cultivado en condiciones de Mg²⁺ alto puede diluirse y situarse en un pocillo de muestra. Como alternativa, dichas bacterias pueden sembrarse en placas adecuadas con medio de crecimiento apropiado tales como placas de agar, en condiciones de Mg²⁺ bajo. Las referencias a condiciones de Mg²⁺ bajo se refieren a concentraciones de magnesio de menos de 3 mM, típicamente menos de 1 mM. Típicamente, las bacterias pueden cultivarse en medio de cultivo que no se ha complementado con Mg²⁺. Por lo tanto, una vez que las bacterias mutantes de *mbI* se han diluido o sembrado en placas en condiciones de Mg²⁺ bajo, su crecimiento se ralentizará o se detendrá.

También puede identificarse condiciones de Mg²⁺ bajo y definirse con respecto a cultivos bacterianos complementados con Mg²⁺ 20 mM. Por ejemplo, puede usarse una concentración de Mg²⁺ que conduzca a una tasa

de crecimiento de menos del 50%, típicamente menos del 20% o menos del 10% de la tasa de crecimiento de mutantes de *mbI* cultivados en medio 20 mM para identificar condiciones de Mg^{2+} bajo adecuadas para realizar los ensayos de acuerdo con la presente invención.

- 5 Para llevar a cabo los ensayos de la presente invención, se añaden sustancias de ensayo a las bacterias mutantes de *mbI* que crecen en condiciones de Mg^{2+} bajo. Por ejemplo, pueden añadirse sustancias de ensayo a los pocillos de muestra o aplicarse puntualmente en placas

- 10 De acuerdo con los ensayos de la presente invención, el crecimiento bacteriano de los mutantes de *mbI* se supervisa en presencia de la sustancia de ensayo. Típicamente, las bacterias se cultivan en condiciones de temperatura y tiempo habituales, por ejemplo, entre 30 y 45 °C, típicamente 37 °C. Los niveles de crecimiento bacteriano pueden medirse en un punto temporal definido, por ejemplo, después de 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas. Como alternativa, el crecimiento bacteriano puede supervisarse a intervalos regulares por ejemplo cada 15 minutos, 30 minutos, cada hora, cada 2 horas o cada 4 horas. Como alternativa, el crecimiento bacteriano puede
15 supervisarse de forma continua.

- El crecimiento bacteriano puede medirse por cualquier método adecuado. Típicamente, puede llevarse a cabo evaluación visual o de densidad óptica del crecimiento de las bacterias. Otros métodos adecuados incluyen el uso de un colorante que genera un cambio de color durante el crecimiento (por ejemplo, debido a cambio de pH),
20 centrifugación seguida de medición de masa húmeda, secado seguido de medición de masa seca, determinación química de un componente macromolecular de células, tal como ADN o proteína, o recuento del número de células por microscopía o mediante un dispositivo electrónico tal como un contador Coulter o citómetro de flujo, recuento de células viables por dilución y siembra en placas en un medio de crecimiento adecuado, complementado con Mg^{2+} . La medición del crecimiento bacteriano identifica los mutantes cuyo crecimiento se ha rescatado a pesar de las
25 condiciones de Mg^{2+} bajo. La capacidad de una sustancia de ensayo para rescatar tal crecimiento identifica la sustancia de ensayo como un inhibidor de LtaS.

- Una vez que se ha identificado un agente con un inhibidor de LtaS, puede llevarse a cabo estudios adicionales, por ejemplo, para evaluar si dicho agente es específico para LtaS. Típicamente, tales sustancias de ensayo pueden formularse como composiciones farmacéuticas para administración posterior como antibióticos.
30

- Pueden usarse agentes identificados de acuerdo con la presente invención como antibióticos contra bacterias gram positivas, y en particular las que comprenden LtaS o un homólogo de la misma. Tales agentes son útiles en el tratamiento de infección por *Staphylococcus aureus*. Tales agentes pueden usarse solos o en combinación con otros
35 antibióticos.

- Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, vía de administración, tasa de excreción, combinación farmacológica y la gravedad de la enfermedad particular para la que se realiza el tratamiento. Los niveles de dosis y frecuencia de dosificación óptimos se determinarán por ensayo clínico, pero una dosificación ejemplar sería de 0,1-1000 mg por día.
40

- Los compuestos identificados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse para administración por cualquier vía coherente con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones administrables por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, grageas, preparaciones líquidas o en gel, tales como soluciones o suspensiones orales, tópicas o parenterales estériles. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de presentación de dosis unitaria, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, goma de tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricante de formación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata, o agentes humectantes aceptables tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas de gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, sorbitán monooleato o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo metil o propil p-hidroxibenzoato o ácido sórbico, y si se desea agentes saporíferos o colorantes convencionales.
50
55
60

- El principio activo también puede administrarse por vía parenteral en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y concentración usados, el fármaco puede estar suspendido o disuelto en el vehículo.
65

La invención se describe a continuación en este documento en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

5 Los efectos letales de la delección de *mbl* pueden rescatarse por altas concentraciones de magnesio

El homólogo de actina Mbl se ha descrito como no esencial en *B. subtilis* (Abhayawardhane y Stewart, 1995; Jones *et al.*, 2001), pero los anteriores autores ya habían indicado que los mutantes de *mbl* crecen lentamente y tienden a captar mutaciones que potencian el crecimiento. La dependencia de Mg^{2+} indicada de mutantes tanto *mreB* (Formstone y Errington, 2005) como (aunque solo a niveles bajos) *mreBH* (Carballido-López *et al.*, 2006) condujo a los inventores a reconstruir la cepa de delección de *mbl* en presencia de Mg^{2+} 20 mM. La selección de transformantes en estas condiciones dio como resultado un aumento de 10 veces de la eficacia de siembra dando colonias relativamente pequeñas pero de forma uniforme (Figura 1A). Las colonias que se seleccionaron continuaron creciendo en placas de Agar Nutriente complementadas con Mg^{2+} , pero no crecieron en placas no complementadas (Figura 3A). En cultivo líquido (medio PAB) una concentración de magnesio elevada mejoró de nuevo en gran medida la tasa de crecimiento (Figura 1B). El examen microscópico de células de tipo silvestre y mutantes reveló la morfología enrollada e hinchada característica del mutante en el medio no complementado (Figura 1C). Sin embargo, en presencia de Mg^{2+} , la morfología celular mejoró en gran medida (Figura 1D). No obstante, en condiciones de Mg^{2+} alto las células mutantes de *mbl* aún diferían del tipo silvestre de dos maneras: en primer lugar, estaban ligeramente curvadas y tenían forma irregular; en segundo lugar, su diámetro medio era aproximadamente 12% mayor (Tabla 1). Las células de tipo silvestre tenían su morfología de bastón recto típica en ambas condiciones (no mostrado).

25 Exploración con respecto a mutantes supresores independientes de magnesio de *B. subtilis* Δmbl

Para obtener información sobre la función de Mbl los inventores exploraron con respecto a mutantes en los que la dependencia de Mg^{2+} del mutante se suprimió. El plásmido pMarB que portaba el transposón *mariner* (Le Breton *et al.*, 2006) se introdujo en un fondo de cepa Δmbl de nueva construcción en presencia de Mg^{2+} 20 mM. Se sembró en placas una biblioteca de aproximadamente 60.000 mutantes con selección con respecto al crecimiento independiente de Mg^{2+} . La pérdida del plásmido pMarB (Erm^R), presencia del transposón (Kan^R) e interrupción de *mbl* (Spc^R) se verificaron mediante parcheo en placas complementadas con antibióticos apropiados. Se seleccionaron diez cepas supresoras fuertes y se comprobaron con respecto a unión de la inserción del transposón con el fenotipo de supresión mediante tres retrocruces consecutivos en el fondo del mutante Δmbl . Los sitios de inserción de transposón se determinaron mediante secuenciación de los productos de reacciones PCR inversa usando los cebadores IPCR1-3 (Le Breton *et al.*, 2006).

En dos de las diez cepas supresoras, se descubrió que el transposón se había insertado de forma independiente en el gen *rsgI* (previamente *ykrl*). RsgI actúa como un factor anti-sigma para SigI (Asai *et al.*, 2007). Otro acierto en la exploración fue en *yfIE* (tres inserciones independientes), que codifica un homólogo de la ácido lipoteicoico sintasa LtaS de *S. aureus* (Gründling y Schneewind, 2007). Se descubrieron dos inserciones independientes en *ylxA* (sinónimos *yfIC* o *mraW*) que queda en un operón con *ylIB*, *ftsL* y *pbpB* y codifica una proteína de función desconocida. Sin embargo, la delección de *ylxA* demostró no ser muy potente en la supresión de la dependencia de Mg^{2+} de *B. subtilis* Δmbl (no mostrado). Se descubrió una inserción de transposón en cada una en *yaaT* que codifica una proteína de función desconocida implicada en la cascada de fosfotransferencia durante el inicio de la esporulación (Hosoya *et al.*, 2002), en el gen para el transportador de glutamato GltT (Slotboom *et al.*, 2001; Tolner *et al.*, 1992), y en *pnpA* que codifica polinucleótido fosforilasa (Luttinger *et al.*, 1996; Mitra *et al.*, 1996; Wang y Bechhofer, 1996).

50 Función solapante pero distinta de los homólogos de actina en *B. subtilis*

El hallazgo de que los mutantes de homólogos de actina de *B. subtilis* *MreB* y *MreBH* son sensibles a una concentración de Mg^{2+} baja (Carballido-López *et al.*, 2006; Formstone y Errington, 2005) condujo a los inventores a reconstruir el mutante de *mbl* en presencia de altas concentraciones de Mg^{2+} . El aumento de la eficacia de siembra en placas, uniformidad de la forma de las colonias y mejora de la morfología celular recapituló los hallazgos anteriores realizados para los mutantes de *mreB* y *mreBH*. Sin embargo, los mutantes varían en los niveles óptimos de Mg^{2+} : el mutante de *mreBH* requiere solamente Mg^{2+} aproximadamente 100-200 μM para viabilidad y las células presentan una anchura celular reducida (Carballido-López *et al.*, 2006); el mutante de *mreB* tiene un requisito mayor de Mg^{2+} (2,5 mM) y el agotamiento del catión da como resultado un aumento del diámetro celular y en última instancia lisis (Formstone y Errington, 2005); finalmente, el mutante de *mbl* de nueva construcción requiere adición de Mg^{2+} aproximadamente 3 mM que está en un intervalo similar del mutante de *mreB* previamente descrito. En medio no complementado la cepa crece lentamente, las células tienden a enrollarse, formar cadenas, hincharse a lo largo de su longitud y son propensas a lisis.

En un fondo por lo demás de tipo silvestre, el único mutante doble viable fue $\Delta mbl \Delta mreBH$, que tiene un fenotipo similar al de un mutante sencillo de *mbl*. Las combinaciones con $\Delta mreB$ fueron letales, y el agotamiento de *MreB* en

fondos mutantes de *mbl* o *mreBH* condujo a una pérdida de forma de bastón y muerte celular (Defeu Soufo y Graumann, 2006; A. Formstone y J. Errington, no publicado) independientemente de los niveles de Mg^{2+} . Por lo tanto, las tres proteínas de tipo MreB parecen tener funciones solapantes, debido a que *mreB* es esencial en cepas suprimidas con respecto a cualquiera de los otros dos homólogos. Sin embargo, aunque los tres mutantes comparten ciertas características como la dependencia de Mg^{2+} y los efectos en la forma celular, las diferencias fenotípicas entre los mutantes sencillos muestran que cada uno tiene una función parcialmente diferenciada.

Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Se enumeran cepas de *B. subtilis* y plásmidos usados en el presente estudio en la Tabla 2, oligonucleótidos en la Tabla 3.

Métodos generales

Se dejaron crecer cultivos líquidos de cepas de *B. subtilis* en Medio Antibiótico de Difco 3 (PAB) a 37 o 50 °C según se indique. Se usaron placas de agar nutriente (Oxoid) para crecimiento en medio sólido. Las concentraciones mínimas de Mg^{2+} requeridas para el crecimiento se determinaron en Agar Nutriente o Medio de Sales Modificadas (Carballido-López *et al.*, 2006). Se añadió $MgSO_4$ a todos los medios a la concentración final indicada de Mg^{2+} . Se llevaron a cabo manipulaciones de ADN y transformaciones de *E. coli* DH5 α usando métodos convencionales (Sambrook, 1989). Se transformaron cepas de *B. subtilis* de acuerdo con el método de Anagnostopoulos y Spizizen (1961) como se modificó por Jenkinson (1983). La selección de transformantes de *B. subtilis* se llevó a cabo en agar nutriente (Oxoid), complementado con antibióticos, según se requirió, con: kanamicina (5 mg ml⁻¹), cloranfenicol (5 mg ml⁻¹), eritromicina (1 mg ml⁻¹), lincomicina (25 mg ml⁻¹) y/o espectinomicina (50 mg ml⁻¹). Se añadió IPTG (1 mM) según se indica.

Exploración con respecto a mutantes supresores independientes de Mg^{2+}

Se realizó mutagénesis de transposones aleatoria usando el transposón basado en *mariner* tnYLB-1 como se ha descrito anteriormente (Le Breton *et al.*, 2006). Brevemente, el plásmido pMarB se introdujo en una cepa mutante de *mbl* (2505) a 30 °C en presencia de concentraciones de Mg^{2+} altas. Se seleccionaron colonias individuales, se cultivaron en medio LB a 37 °C durante 8 h, y después se sembraron en placas de agar nutriente no complementado con Mg^{2+} pero que contenía kanamicina para seleccionar las inserciones de transposón creando cepas independientes de Mg^{2+} . Se seleccionaron colonias individuales y se comprobó la delección de *mbl* (*spc*^r), integración del transposón tnYLB-1 (*neo*^r) y pérdida del plásmido (*erm*^s) por parcheado en placas que contenían el antibiótico apropiado. La unión entre la inserción de transposón y la independencia de Mg^{2+} se verificó mediante retrocruzamiento de ADN cromosómico de colonias sencillas tres veces en un fondo mutante de *mbl*. Se seleccionaron tres supresores fuertes y se determinó el sitio de inserción del transposón mediante amplificación por PCR inversa y secuenciación como se ha descrito previamente (Le Breton *et al.*, 2006).

Construcción de mutantes de delección de inserción

Se amplificaron por PCR regiones cromosómicas de aproximadamente 2,5 - 3 kb que flanqueaban el gen o los genes para suprimir usando cebadores *mbl-A/mbl-B* y *mbl-C/mbl-D* para la delección de *mbl*. Estos productos de PCR se ligaron después con un casete de resistencia a antibióticos (*cat* de pCotC; Veening *et al.*, 2006) y después se volvieron a amplificar usando los cebadores externos B + D. La transformación de los productos de PCR resultantes en *B. subtilis* 168 con selección del antibiótico adecuado dio lugar después a cepas en las que el gen diana se sustituye por un casete de resistencia a antibióticos. La delección del gen e inserción del casete de resistencia se verificó mediante PCR.

Captura de imágenes microscópicas

Para microscopía, se diluyeron células a partir de un cultivo líquido o sólido durante una noche en medio PAB complementado con $MgSO_4$ 20 mM cuando se requirió y se cultivaron a 37 °C o 50 °C. Las células se montaron en portaobjetos de microscopio cubiertos con una película delgada de agarosa 1% en medio mínimo (Glaser *et al.*, 1997). Se consiguió tinción de la membrana mezclando 2 μ l de solución de Rojo Nilo (Molecular Probe) (12,5 mg ml⁻¹) con 600 μ l de agarosa en el portaobjetos. Los nucleoides se tiñeron mezclando 8 μ l de la suspensión celular con 2 μ l de solución de DAPI (Sigma) (1 mg ml⁻¹ en glicerol 50%) en un tubo Eppendorf antes de montar la muestra en el portaobjetos cubierto con agarosa. Se adquirieron imágenes con una cámara CCD enfriada 14 Sony CoolSnap HQ (Roper Scientific) unida a un microscopio Zeiss Axiovert M135 o a un microscopio Zeiss 15 Axiovert 200M. Se usó ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para analizar las imágenes, la manipulación se limitó a alterar el brillo y el contraste para obtener impresiones óptimas.

Tabla 1. Dimensiones celulares de cepas de tipo silvestre y mutantes

Cepa	Genotipo relevante	Temperatura	Mg ²⁺ añadido	Diámetro medio (± DT)
168		37 °C		0,92 (0,07)
168		37 °C	20 mM	0,91 (0,07)
168		50 °C		0,97(0,10)
2505	<i>Δmbl</i>	37 °C	20 mM	1,00 (0,09)
2505	<i>Δmbl</i>	50 °C		1,12 (0,12)

Los cultivos se dejaron crecer en medio PAB en las condiciones indicadas.

5

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa/plásmido	Genotipo relevante	Referencia/construcción
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	reserva de laboratorio
3728	<i>trpC2 Ωneo3427Δ mreB</i>	Formstone y Errington, 2005
2505	<i>trpC2 Ω(mbl::spc)</i>	(Jones <i>et al.</i> , 2001)
4261	<i>trpC2 Δmbl::cat</i>	el presente trabajo
4283	<i>trpC2 ΔltaS::neo</i>	el presente trabajo
4284	<i>trpC2 ΔltaS::spc</i>	el presente trabajo
4285	<i>trpC2 ΔltaS::cat</i>	el presente trabajo
4286	<i>trpC2 ΔltaS::erm</i>	el presente trabajo
4298	<i>trpC2 Ω(mbl::spc)ΔltaS::neo</i>	el presente trabajo
Plásmidos		
PMarB	<i>bla erm P_{cotC}-Himar1 kan</i> (TnYLB-1)	Le Breton <i>et al.</i> , 2006
pBEST501	<i>bla neo</i>	Itaya <i>et al.</i> , 1989
pVK71	<i>bla neor::spc</i>	Chary <i>et al.</i> , 1997
PMUTIN4	<i>bla erm P_{spac}-lacZ lacI</i>	Vagner <i>et al.</i> , 1998
pCotC-GFP	<i>bla cat P_{cotC}-cotC-gfp</i>	Veening <i>et al.</i> , 2006
pLOSS*	<i>Bla spc P_{spac}-mcs P div IVA-lacZ lacI reppLS20</i>	Claessen <i>et al.</i> , 2008

Tabla 3. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Descripción
IPCR1	GCTTGTAATTCTATCATAATTG	Amplificación por IPCR
IPCR2	AGGGAATCATTGAAG GTTGG	Amplificación por IPCR
IPCR3	GCATTTAACTAGCGACGCC	Secuenciación de ADN por IPCR
mbl-A	GCTCACTCTAGACCGAGGTCAATACCAATATCC	XbaI
mbl-B	GTGATGAAGCGTCCTATG	
mbl-C	CTGAGCGAATTCGCAAACCTAAGCTGATTTAC	EcoRI
mbl-D	CCTATATGGCCTGGAAGAC	
mbl-dir	CTCGAGGATCCACCTGGCATTGCCTTCTTG	BamHI
mbl-inv	CATACTGAATTCATGACACCT GTGCCCGATG	EcoRI
yflE-A1	CTAGCAGCATGCGTTGAGCGAAACGATAG	SphI
yflE_A2	GTACGGTCTAGAGTTGAGCGAAACGATAG	XbaI

Nombre	Secuencia	Descripción
yflE-B	CATCGTGATTCCGGCACTC	
yflE-CI	CATCTAGGTACCGAGAGGTTGCCCTCTCC	KpnI
yflE_C2	CTAGCTGAATTCGAGAGGTTGCCCTCTCC	EcoRI
yflE-D	CTGCCGTAATGCATGTCAG	
yflEdir	G ACAGTGGATCCCACCTTCTCCCTCATACG	BamHI
yflEinv	CATCCAGAATTCGCAGCTGAGGAATTGAGG	EcoRI

Ejemplo 2

La delección de la LTA sintasa YflE suprime la dependencia de Mg²⁺ de los mutantes de *mbl*

5 Los inventores han mostrado anteriormente que los mutantes de *mbl* no son viables a [Mg²⁺] bajo y que las mutaciones que suprimen este fenotipo pueden obtenerse fácilmente. En una recogida de mutantes suprimidos inducidos por transposón había tres cepas con inserciones en el gen *yflE*. El gen de tipo silvestre codifica una proteína de 649 aminoácidos con un peso molecular predicho de 74,2 kDa. La secuenciación de ADN mostró que cada inserción interrumpiría la fase abierta de lectura de *yflE*, después de los codones 41, 72 y 387, respectivamente. Mientras se estaba realizando el trabajo, (Gründling y Schneewind, 2007) mostraron que un gen cercanamente relacionado (79% idéntico) en *Staphylococcus aureus* codifica LTA sintasa. También mostraron que el gen *yflE* de *B. subtilis* podría complementar el fenotipo letal de *ltaS* en *S. aureus* restaurando la síntesis de LTA. Por lo tanto, en lo sucesivo los inventores renombran el gen *yflE* de *B. subtilis* como *ltaS*.

15 Los inventores construyeron una delección completa del gen *ltaS* (cepas 4283) y confirmaron que el mutante doble de *ltaS mbl* (cepa 4298) no es dependiente de Mg²⁺ (Figura 2). Tanto en placas como en medio líquido (PAB o LB) el mutante doble creció sin Mg²⁺ añadido (Figura 2A y B), aunque el crecimiento fue más lento que para el cultivo de tipo silvestre. Resulta interesante que la delección de *ltaS* también contrarrestaba el hinchamiento y enrollamiento típicos de células mutantes de *mbl*; en su lugar el mutante doble parecía similar al mutante sencillo de *ltaS* (Figura 2C) (véase posteriormente).

Efectos de las condiciones de crecimiento e iones metálicos en los mutantes de *ltaS*

25 El mutante de *ltaS* también mostró crecimiento alterado dependiendo del medio de crecimiento. Para entender las consecuencias de la pérdida de actividad de LTA sintasa los inventores caracterizaron el crecimiento del mutante en una serie de condiciones. El mutante tenía una tasa de crecimiento lenta en medio rico tal como PAB (véase posteriormente) y no crecía en absoluto en medio CH o S. El análisis sistemático de los efectos de los componentes de estos medios añadidos a PAB mostró que la cepa mutante era particularmente sensible a niveles elevados de Mn²⁺. En los ejemplos mostrados en la Figura 3A, la adición de MnSO₄ 0,05 mM a agar nutriente (NA) suprimió el crecimiento del mutante, mientras que el crecimiento del tipo silvestre no se vio afectado. La adición de Mg²⁺ 0,5 mM no tuvo ningún efecto en el crecimiento del mutante, lo que muestra que el efecto no era una sensibilidad general a cationes divalentes. Por otro lado los inventores observaron que en placas de medio mínimo con concentraciones de Mg²⁺ definidas el mutante de *ltaS* crecía a concentraciones de Mg²⁺ menores que la cepa de tipo silvestre (Figura 3B). La menor necesidad de Mg²⁺ podría ser la razón por la que una delección de *ltaS* suprime el fenotipo dependiente de Mg²⁺ de mutantes de *mbl* y *mreB* (Formstone y Errington, 2005). Los inventores proponen que, de forma coherente con funciones previamente sugeridas de LTA en la eliminación de iones de Mg²⁺ (Neuhaus y Baddiley, 2003), la ausencia de LTA (sintetizado por *ltaS*) conduce a una pérdida de una zona de tamponamiento alrededor de la envoltura bacteriana. Como consecuencia los iones tienen un acceso más inmediato a la célula, lo que conduce a menores requisitos de iones con alta afinidad tales como Mg²⁺, que es un cofactor en muchas enzimas bacterianas. Al mismo tiempo, la toxicidad de los iones de Mn²⁺ aumenta: estos pueden reemplazar Mg²⁺ debido a sus propiedades químicas similares pero no participan correctamente en la función enzimática (Cowan, 1995). Estos resultados proporcionan pruebas directas de que LTA tiene un papel principal en la fisiología de la pared celular y en particular para proporcionar un ambiente fisicoquímico que favorece la retención de Mg²⁺ frente a Mn²⁺.

50 En el proceso de construcción de la cepa de delección, los inventores observaron que el mutante de *ltaS* también era hipersensible a diversos antibióticos y lisozimas. Por ejemplo, el crecimiento del mutante de *ltaS* (cepa 4285) se suprimió a kanamicina 0,5 µg/ml, una concentración que no tenía ningún efecto discernible en el crecimiento de células de tipo silvestre. En otros experimentos en medio sólido la zona de inhibición de todos los antibióticos ensayados (kanamicina, ampicilina, vancomicina, penicilina, espectinomicina, eritromicina, lincomicina, carbenicilina) era más amplia para el mutante de *ltaS* que para el tipo silvestre (no mostrado). Finalmente, el mutante también mostró susceptibilidad aumentada a lisozima (no mostrado). El aumento general de la sensibilidad del mutante a antibióticos y lisozima es coherente con la noción de que LTA también proporciona una capa protectora que restringe el acceso de muchos agentes bioactivos a sitios sensibles en la envoltura celular.

Cepas bacterianas y plásmidos

Se enumeran cepas de *B. subtilis* y plásmidos usados en el presente estudio en la Tabla 2 (anteriormente).

5

Métodos generales

Se dejaron crecer cultivos líquidos de cepas de *B. subtilis* en Medio Antibiótico de Difco 3 (PAB), medio CH (Nicholson & Setlow, 1990), o medio S (Karamata & Gross, 1970) a 37 °C. Se usaron placas de agar nutriente (Oxoid) para cultivo en medio sólido, se prepararon placas de Medio de Sales Modificadas con concentraciones de Mg^{2+} definidas como se ha descrito previamente (Carballido-López *et al.*, 2006). La concentración dada de Mg^{2+} se consiguió mediante adición de $MgSO_4$ al medio. Se transformaron cepas de *B. subtilis* y manipulaciones de ADN de acuerdo con el método de Anagnostopoulos y Spizizen (1961) como se modificó por Jenkinson (1983). Se llevó a cabo selección de transformantes de *B. subtilis* en agar nutriente (Oxoid), complementado con antibióticos, según se requirió, con: kanamicina (5 mg ml^{-1}), cloranfenicol (5 mg ml^{-1}), eritromicina (1 mg ml^{-1}), lincomicina (25 mg ml^{-1}) y/o espectinomicina (50 mg ml^{-1}). Para ensayar la sensibilidad a cationes, se dejaron crecer cultivos hasta fase de crecimiento semiexponencial en medio PAB, después se resuspendieron en PBS hasta una DO_{600} de 1,0. Se aplicaron puntualmente $10 \mu\text{l}$ de diluciones 10^{-1} a 10^{-6} en PBS en placas NA que contenían $MnSO_4$ o $MgSO_4$ en las concentraciones indicadas.

10

15

20

Exploración con respecto a mutantes supresores de *mbi* independientes de Mg^{2+}

Se realizó mutagénesis de transposones aleatoria usando el transposón basado en *mariner* tnYLB-1 como se ha descrito anteriormente (Le Breton *et al.*, 2006). En resumen, el plásmido pMarB se introdujo en una cepa mutante de *mbi* (2505) a 30 °C en presencia de concentraciones altas de Mg^{2+} . Se seleccionaron colonias individuales, se cultivaron en medio LB a 37 °C durante 8 h y después se sembraron en placas de agar nutriente no complementado con Mg^{2+} pero que contenía kanamicina para seleccionar las inserciones del transposón creando cepas independientes de Mg^{2+} . Se seleccionaron colonias individuales y se comprobó la delección de *mbi* (*spc*¹), integración del transposón tnYLB-1 (*neo*¹) y pérdida del plásmido (*erm*^S) por parcheado en placas que contenían el antibiótico apropiado. Se verificó la unión entre la inserción del transposón y la independencia de Mg^{2+} mediante retrocruzamiento de ADN cromosómico de colonias sencillas tres veces en un fondo mutante de *mbi*. Se seleccionaron diez supresores fuertes y se determinó el sitio de inserción del transposón mediante amplificación por PCR inversa y secuenciación como se ha descrito previamente (Le Breton *et al.*, 2006).

25

30

35

Construcción de cepas de delección y agotamiento

Los genes se suprimieron reemplazando la secuencia codificante con marcadores de resistencia a antibiótico. Por lo tanto, se amplificaron aproximadamente 2500 pb cadena arriba y abajo de los genes diana usando los cebadores *yfiE-A/yfiE-B* e *yfiE-C/yfiE-D* para la delección de *yfiE*, se ligaron al casete de resistencia deseado y después se transformó *B. subtilis* 168 con el producto de ligación, se seleccionaron transformantes en el antibiótico apropiado y se verificaron por PCR. Se derivaron casetes de resistencia mediante restricción o amplificación por PCR a partir de plásmidos [*cat* de pCotC (Veening *et al.*, 2006); *erm* de pMUTIN4 (Vagner *et al.*, 1998); *neo* de pBEST501 (Itaya *et al.*, 1989); *spc* de pLOSS* (Claessen *et al.*, 2008)].

40

45

Tabla 4. Los nucleótidos subrayados en SEC ID N°: 1 y 3 indican las secciones codificantes de proteína de cada secuencia

SEC ID N° 1	
attcctttat ttctagaag ataccttgtt ttacatttgg taatatcaaa gcgaaacgtt	60
gattcgacgg cgtttttcgc cactttctcc ctcatacgat tttcactttt ctaatctgct	120
gattcgtggt atattggata cgttcgttt ttctatcgtt tcgctcgaac tggatcgaa	180
aaaaggagtg taacaatgaa aacatttata aaagaaagag gactggcctt cttcttaatt	240
<u>gcggtcgtcc</u> <u>tgttatggat</u> <u>caaaacgtat</u> <u>gtcggttatg</u> <u>tctgaattt</u> <u>caacttagga</u>	300
<u>atagacaaca</u> <u>cgatacaaaa</u> <u>aatattgctt</u> <u>tttgtgaatc</u> <u>ctcttagctc</u> <u>aagcttgctc</u>	360
<u>ttctttggct</u> <u>ttggactcct</u> <u>gttcaagaaa</u> <u>aaattacagc</u> <u>agacagccat</u> <u>tatagtgatt</u>	420
<u>cattttttaa</u> <u>tgtctttttt</u> <u>actgtacgcc</u> <u>aacatttgtt</u> <u>actacagatt</u> <u>tttcaatgat</u>	480
<u>ttattacaa</u> <u>ttccggtcat</u> <u>tatgcaggct</u> <u>aaaacaacg</u> <u>gcgccaact</u> <u>cggtgacagc</u>	540
<u>gcattttcgc</u> <u>tgatgagacc</u> <u>gactgacgcc</u> <u>ttttacttta</u> <u>tcgatacgat</u> <u>catcctgac</u>	600
<u>atcttggcga</u> <u>tcaaagtaaa</u> <u>caagcctgcc</u> <u>gaaacgtcaa</u> <u>gcaaaaaatc</u> <u>gttccgaatt</u>	660
<u>atttttgcgt</u> <u>cttcaattct</u> <u>tgtgttcttg</u> <u>atcaacctgg</u> <u>cagttgcgga</u> <u>atcagaccgt</u>	720
<u>cctgaattgc</u> <u>tgacaagatc</u> <u>atcgcaccgg</u> <u>aactatcttg</u> <u>tgaataactt</u> <u>gggaacatac</u>	780
<u>aatttcacga</u> <u>tttatgacgc</u> <u>tgtacagaat</u> <u>atcaagtcca</u> <u>acagccagcg</u> <u>cgcgcttgcc</u>	840
<u>gattccagcg</u> <u>acgtaacgga</u> <u>agttagaaaa</u> <u>tacatgaaag</u> <u>ccaattacga</u> <u>tgtgccgaat</u>	900
<u>aacgtgtatt</u> <u>tcggcaaacg</u> <u>ggaaggaaaa</u> <u>aacgtcattt</u> <u>acgtttcact</u> <u>tgaatctttg</u>	960
<u>cagtcattta</u> <u>tcacgacta</u> <u>taaaattgac</u> <u>ggcaaaagag</u> <u>tgacaccatt</u> <u>cttaataaaa</u>	1020
<u>ctggcacatg</u> <u>ataacgaac</u> <u>gttctacttt</u> <u>gataactttt</u> <u>tcaccaaac</u> <u>gggacaaggt</u>	1080
<u>aaaacatctg</u> <u>atgctgaatt</u> <u>tatgatggaa</u> <u>aactctctgt</u> <u>accgctggc</u> <u>tcaaggttca</u>	1140
<u>gttttcgtaa</u> <u>acaaagcgca</u> <u>aaacacgctg</u> <u>caatccgttc</u> <u>cgcgattct</u> <u>gaagtctaaq</u>	1200
<u>aattacacat</u> <u>ctgctacttt</u> <u>ccacgggaac</u> <u>acgcagacgt</u> <u>tctggaaccg</u> <u>taacgaaatg</u>	1260
<u>tacaagggcg</u> <u>aaggcattga</u> <u>taaattcttt</u> <u>gattctgctt</u> <u>actatgacat</u> <u>gaacgaagaa</u>	1320
<u>aacacgaaaa</u> <u>actacggcat</u> <u>gaaagacaaa</u> <u>ccgttcttca</u> <u>agaatcaat</u> <u>gccgctgctg</u>	1380
<u>gaaagcctgc</u> <u>cgcagccgtt</u> <u>ctatacgaag</u> <u>ttcattacc</u> <u>ttccaacca</u> <u>cttcccattc</u>	1440
<u>ggaatggatg</u> <u>agggggatac</u> <u>agacttcccg</u> <u>gctggagact</u> <u>ttggtgactc</u> <u>tgctgctgat</u>	1500
<u>aactatttcc</u> <u>agtcagccca</u> <u>ttaccttgat</u> <u>cagtcatttg</u> <u>acaattctt</u> <u>caatgatctg</u>	1560
<u>aaaaaagacg</u> <u>ggttatatga</u> <u>taaactgatt</u> <u>attgtgatgt</u> <u>acggagacca</u> <u>ctacggcctc</u>	1620
<u>ctgaaaaacc</u> <u>acaataaagc</u> <u>gatggcgaaa</u> <u>gtgcttgcca</u> <u>aggatgaaat</u> <u>cactgattac</u>	1680
<u>gacaacgccc</u> <u>agcttcaacg</u> <u>ggtgcccgtc</u> <u>tttatccacg</u> <u>ctgccggcgt</u> <u>gaagggcgag</u>	1740
<u>aaagtccata</u> <u>aatatgccgg</u> <u>agacgttgat</u> <u>gtggctccta</u> <u>ccattctgca</u> <u>tctgctcgga</u>	1800
<u>gtggatacga</u> <u>aggactatct</u> <u>gatgtccggt</u> <u>tctgatattt</u> <u>tatcgaaaag</u> <u>acaccgtgaa</u>	1860
<u>gtgattccgt</u> <u>tccgaaacgg</u> <u>agactttatt</u> <u>tcaccgaagt</u> <u>acacgaaaa</u> <u>atccggtaa</u>	1920
<u>tattacgaca</u> <u>cgaaaaccgg</u> <u>aaaagaactc</u> <u>gatgaatccg</u> <u>aagtcgacaa</u> <u>gtcagaagac</u>	1980
<u>tcactcgtca</u> <u>agaaggaact</u> <u>tgaatgtcc</u> <u>gataaaatca</u> <u>taaacggaga</u> <u>cctgctgagg</u>	2040
<u>ttctacgagc</u> <u>cgaaaggttt</u> <u>taagaagggt</u> <u>aatccttctg</u> <u>attatgatta</u> <u>cacaaaacat</u>	2100
<u>gacgaagatt</u> <u>cttccgaaac</u> <u>gtcaaaggat</u> <u>aacgaagata</u> <u>aataagaaaa</u> <u>agcggagagg</u>	2160
<u>ttgccctctc</u> <u>cgctttttta</u> <u>tttgacagca</u> <u>gccctcaatt</u> <u>cctcagctgc</u> <u>aaattccaca</u>	2220
<u>ttcgggccaa</u> <u>taatgacttg</u> <u>aaccgattgc</u> <u>ccgcccattg</u> <u>tgacaacccc</u> <u>ttttgcgctt</u>	2280
<u>gctttcttta</u> <u>gcagtgcttc</u> <u>atccacaaa</u> <u>gcggatcct</u> <u>tcacagtcag</u> <u>tcgcagcctt</u>	2340
gt	
SEC ID N° 2	
MKTFIKERGLAFFLIAVLLWIKTYVGYVLNFNLDNTIQKILLFVNPLSSSLFFLGFG	
LLFKKKLQQTAIIVIHFLMSFLLYANIVYYRFNDFITIPVIMQAKTNGGQLGDSAFSLM	
RPTDAFYFIDTIIILILAIKVNKPAETSSKKSFRIFASSILVFLINLAVAESDRPELLT	
RSFDRNYLVKYLGTYNFTIYDAVQNIKSNSQRALADSSDVTEVENYMKANYDVPNNVYFG	
KAEGKNVIYVLSLESLQSFIIIDYKIDGKEVTPFLNKLADHNETFYFDNFFHQGTGQKTSDA	
EFMMENSLYPLAQGSVFNKAQNTLQSVPAILKSKNYTSATFHGNTQTFWNRNEMYKAEG	
IDKFFDSAYYDMNEENTKNYGMKDKPFKESMPLESQPFPYTKFITLSNHFPFGMDEG	
DTDFPAGDFGDSVVDNYFQSAHYLDQSIEQFFNDLKKDGLYDKSIIVYMGDHYGISENHN	
KAMAKVLGKDEITDYDNAQLQRVPLFIHAAGVKGEKVHKYAGDVDVAPTILHLLGVDTKD	
YLMGSDILSKEHREVI PFRNGDFISPKYTKISGKYDYTKGKELDESEVDKSEDSLVKK	

SEC ID Nº 3	
aaattctcga aggagagcct gttcagcaat cgtaatcacc tggcattgcc ttcttgaat	60
cgttcataaa acatccgcaa aaatttghtaa agaacttatt gtgcttccaa cttttttct	120
atattttatg ataatatata taattagggc acaatgtgga tatttactgt gaaacagatt	180
ttcaaggagg atataaatag atgtttgcaa gggatattgg tattgacctc ggtactgcaa	240
atgtactgat ccatgttaaa ggtaaaggaa ttgttctgaa tgaaccttcc gttgttgac	300
ttgataaaaa cagcggcaaa gtgctggcgg ttggcgaaga ggcaagacga atggttggac	360
gtacacctgg gaatattgtt gcgattcgcc cgctgaaaga cggagttatt gctgactttg	420
aagtaacaga agcaatgctg aacatttta ttaacaagct gaatgtaaaa ggcctgttct	480
caagcccgcg catgctcatt tgctgcccga cgaatattac atccgttgag caaaaagcaa	540
ttaaagaagc tgcagaaaaa agcggcggga aacatgtgta ccttgaagaa gaacctaaag	600
ttgccgctat cggcggcgggt atggaaatat tccagccaag cggtaacatg gttgtagaca	660
tcggagggcg gacgacggat atcgcggtta tttcaatggg cgatattgtc acctcctctt	720
ctatataaat ggctggggac aagtttgaca tggaaatctt aaattatc aaacggaggt	780
acaagctgct gatcggcga cgtactcggc aggatattaa gattaaagtc gcaactgttt	840
tcccagacgc acgtcacgag gaaatttcca ttcgcgacg ggacatggtt tccggtcttc	900
caagaacaat tacagtaaac agtaaagaag ttgaagaagc ccttcgtgaa tctgtcgtg	960
ttattgttca ggctgcaaaa caagtgtcgc aaagaacacc gcttgaactt tctgtctgata	1020
ttattgaccg cggcgttatt attaccggcg gagcgcgctt cttaaacggc cttgaccagc	1080
tgcttctga agagctgaag gtaccggctc tegtgtctga aaatcctatg gattgctgag	1140
ccatcggcac agtgtcatg cttgataata tggacaagct tctaaacgc aaactaagct	1200
gatttcacaa acctcattct gaaaaagaat gaggtttttt tatgaaaaag cttcacgaa	1260
aagatgttaa atgacgataa taggataaaa tactgagttt ttattataga acgaacgttc	1320
ctatatgaca actggaaaaa atgccatttt tagaggtggg aaatttghta aaaggattat	1380
atacagcaac atccgcaat	
SEC ID Nº 4	
MFARDIGIDLGTANVLIHVKGKGIVLNPSVVALDKNSGKVLAVGEEARRMVGRTPGNIV	
AIRPLKDGVIADFEVTEAMLKHFINKLVKGLFSKPRMLICCPNITSVEQKAIKEAAEK	
SGGKHVYLEEPEPKVAAIGAGMEIFQPSGNMVDIGGGTTDIAVISMGDIVTSSSIKMGAD	
KFDMEILNYIKREYKLLIGERTAEDIKIKVATVFPDARHEEISIRGRDMVSGLPRTITVN	
SKEVEEALRESVAVIVQAAKQVLERTPPELSADIDRGVIITGGGALLNGLDQLLAEELK	
VPVLAENPMDCVAIGTGVMLDNMDKLPKRKLS	

Referencias

5 Abhayawardhane, Y., y G.C. Stewart. 1995. Bacillus subtilis possesses a second determinant with extensive sequence similarity to the Escherichia coli mreB morphogene. Journal of Bacteriology 177: 765-773.

Anagnostopoulos, C. y J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81: 741-746.

10 Asai, K., T. Ootsuji, K. Obata, T. Matsumoto, Y. Fujita y Y. Sadaie. 2007. Regulatory role of RsgI in sigI expression in Bacillus subtilis. Microbiology 153: 92-101.

Carballido-López, R., A. Formstone, Y. Li, S.D. Ehrlich, P. Noirot y J. Errington. 2006. Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. Developmental Cell 11: 399-409.

Chary, V.K., E.I. Amaya y P.J. Piggot. 1997. Neomycin- and spectinomycin-resistance replacement vectors for Bacillus subtilis. FEMS Microbiology Letters 153: 135-139.

15 Claessen, D., R. Emmins, L.W. Hamoen, R.A. Daniel, J. Errington y D.D. Edwards. 2008. Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in Bacillus subtilis. Molecular Microbiology 68: 1029-1046.

Defeu Soufo, H.J. y P.L. Graumann. 2006. Dynamic localization and interaction with other Bacillus subtilis actin-like proteins are important for the function of MreB. Molecular Microbiology 62: 1340-1356.

Formstone, A. y J. Errington. 2005. A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in Bacillus subtilis. Molecular Microbiology 55: 1646-1657.

20 Glaser, P., M.E. Sharpe, B. Raether, M. Prego, K. Ohlsen y J. Errington. 1997. Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. Genes Dev. 11: 1160-1168.

Gründling, A. y O. Schneewind. 2007. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in Staphylococcus aureus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 8478-8483.

25 Hoper, D., U. Volker y M. Hecker. 2005. Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology 187: 2810-2826.

Hosoya, S., K. Asai, N. Ogasawara, M. Takeuchi y T. Sato. 2002. Mutation in yaaT leads to significant inhibition of phosphorelay during sporulation in Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology 184: 5545-5553.

30 Itaya, M., K. Kondo y T. Tanaka. 1989. A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the Bacillus subtilis chromosome. Nucleic Acids Research 17: 4410.

Jenkinson, H.F. 1983 Altered arrangement of proteins in the spore coat of a germination mutant of Bacillus subtilis. Journal of General Microbiology 129: 1945-1958.

Jones, L.J., R. Carballido-López y J. Errington. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments

- in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104: 913-922.
- Le Breton, Y., N.P. Mohapatra y W.G. Haldenwang. 2006. In Vivo Random Mutagenesis of *Bacillus subtilis* by Use of TnYLB-1, a mariner-Based Transposon. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 327-333.
- 5 Luttinger, A., J. Hahn y D. Dubnau. 1996. Polynucleotide phosphorylase is necessary for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 19: 343-356.
- Mitra, S., K. Hue y D.H. Bechhofer. 1996. In vitro processing activity of *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase. *Molecular Microbiology* 19: 329-342.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 10 Slotboom, D.J., W.N. Konings y J.S. Lolkema. 2001. Cysteine-scanning mutagenesis reveals a highly amphipathic, pore-lining membrane-spanning helix in the glutamate transporter GltT. *Journal of Biological Chemistry* 276: 10775-10781.
- Tolner, B., B. Poolman y W.N. Konings. 1992. Characterization and functional expression in *Escherichia coli* of the sodium/proton/glutamate symport proteins of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*. *Molecular Microbiology* 6: 2845-2856.
- 15 Vagner, V., E. Dervyn y S.D. Ehrlich. 1998. A vector for systematic gene Inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 144: 3097-3104.
- Veening, J.-W., O.P. Kulpers, S. Brui, K.J. Hellngwerf y R. Kort. 2006. Effects of Phosphorelay Perturbations on Architecture, Sporulation, and Spore Resistance in Biofilms of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188: 3099-3109.
- 20 Wang, W. y D.H. Bechhofer. 1996 Properties of a *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase deletion strain. *Journal of Bacteriology* 178: 2375-2382.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE
- <120> MÉTODO
- <130> N105675A SER
- 30 <150> GB 0822276.2
- <151> 05-12-2008
- <160> 21
- 35 <170> Patent In versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2342
- 40 <212> ADN
- <213> *Bacillus subtilis*
- <220>
- <221> CDS
- 45 <222> (196)..(2192)
- <400> 1

ES 2 396 159 T3

attcctttat ttctagaaag ataccttggt ttacatttgg taatatcaaa gcgaaacggt	60
gattcgacgg cgtttttgcg cactttctcc ctcatacgat tttcactttt ctaatctget	120
gattcgtggt atattggata cgttcgtttt ttctatcgtt tcgctcgaac tggatcggaa	180
aaaaggagtg taaca atg aaa aca ttt ata aaa gaa aga gga ctg gcc ttc	231
Met Lys Thr Phe Ile Lys Glu Arg Gly Leu Ala Phe	
1 5 10	
ttc tta att gcg gtc gtc ctg tta tgg atc aaa acg tat gtc ggt tat	279
Phe Leu Ile Ala Val Val Leu Leu Trp Ile Lys Thr Tyr Val Gly Tyr	
15 20 25	
gtc ctg aat ttc aac tta gga ata gac aac acg ata caa aaa ata ttg	327
Val Leu Asn Phe Asn Leu Gly Ile Asp Asn Thr Ile Gln Lys Ile Leu	
30 35 40	
ctt ttt gtg aat cct ctt agc tca agc ttg ttc ttt ctt ggc ttt gga	375
Leu Phe Val Asn Pro Leu Ser Ser Ser Leu Phe Phe Leu Gly Phe Gly	
45 50 55 60	
ctc ttg ttc aag aaa aaa tta cag cag aca gcc att ata gtg att cat	423
Leu Leu Phe Lys Lys Lys Leu Gln Gln Thr Ala Ile Ile Val Ile His	
65 70 75	
ttt tta atg tct ttt tta ctg tac gcc aac att gtg tac tac aga ttt	471
Phe Leu Met Ser Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Ile Val Tyr Tyr Arg Phe	
80 85 90	
ttc aat gat ttt att aca att ccg gtc att atg cag gct aaa aca aac	519
Phe Asn Asp Phe Ile Thr Ile Pro Val Ile Met Gln Ala Lys Thr Asn	
95 100 105	
ggc ggc caa ctc ggt gac agc gca ttt tcg ctg atg aga ccg act gac	567

ES 2 396 159 T3

Gly	Gly	Gln	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Phe	Ser	Leu	Met	Arg	Pro	Thr	Asp		
	110					115					120						
gcc	ttt	tac	ttt	atc	gat	acg	atc	atc	ctg	atc	atc	ttg	gcg	atc	aaa		615
Ala	Phe	Tyr	Phe	Ile	Asp	Thr	Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Ile	Lys		
	125				130				135						140		
gta	aac	aag	cct	gcc	gaa	acg	tca	agc	aaa	aaa	tcg	ttc	cga	att	att		663
Val	Asn	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Lys	Ser	Phe	Arg	Ile	Ile		
				145					150					155			
ttt	gcg	tct	tca	att	ctt	gtg	ttc	ttg	atc	aac	ctg	gca	gtt	gcg	gaa		711
Phe	Ala	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Phe	Leu	Ile	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Glu		
			160					165					170				
tca	gac	cgt	cct	gaa	ttg	ctg	aca	aga	tca	ttc	gac	cgg	aac	tat	ctt		759
Ser	Asp	Arg	Pro	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn	Tyr	Leu		
		175					180					185					
gtg	aaa	tac	ttg	gga	aca	tac	aat	ttc	acg	att	tat	gac	gct	gta	cag		807
Val	Lys	Tyr	Leu	Gly	Thr	Tyr	Asn	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asp	Ala	Val	Gln		
	190					195					200						
aat	atc	aag	tcc	aac	agc	cag	cgc	gcg	ctt	gcc	gat	tcc	agc	gac	gta		855
Asn	Ile	Lys	Ser	Asn	Ser	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ser	Ser	Asp	Val		
	205				210					215					220		
acg	gaa	gta	gaa	aac	tac	atg	aaa	gcc	aat	tac	gat	gtg	ccg	aat	aac		903
Thr	Glu	Val	Glu	Asn	Tyr	Met	Lys	Ala	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Asn	Asn		
				225					230					235			
gtg	tat	ttc	ggc	aaa	gcg	gaa	gga	aaa	aac	gtc	att	tac	gtt	tca	ctt		951
Val	Tyr	Phe	Gly	Lys	Ala	Glu	Gly	Lys	Asn	Val	Ile	Tyr	Val	Ser	Leu		
			240					245					250				
gaa	tct	ttg	cag	tca	ttt	atc	atc	gac	tat	aaa	att	gac	ggc	aaa	gaa		999
Glu	Ser	Leu	Gln	Ser	Phe	Ile	Ile	Asp	Tyr	Lys	Ile	Asp	Gly	Lys	Glu		
		255				260						265					
gtg	aca	cca	ttc	tta	aat	aaa	ctg	gca	cat	gat	aac	gaa	acg	ttc	tac		1047
Val	Thr	Pro	Phe	Leu	Asn	Lys	Leu	Ala	His	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Tyr		
	270					275					280						
ttt	gat	aac	ttt	ttc	cac	caa	acg	gga	caa	ggt	aaa	aca	tct	gat	gct		1095
Phe	Asp	Asn	Phe	Phe	His	Gln	Thr	Gly	Gln	Gly	Lys	Thr	Ser	Asp	Ala		
	285				290					295					300		
gaa	ttt	atg	atg	gaa	aac	tct	ctg	tac	ccg	ctg	gct	caa	ggt	tca	gtt		1143
Glu	Phe	Met	Met	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Pro	Leu	Ala	Gln	Gly	Ser	Val		
				305					310					315			
ttc	gta	aac	aaa	gcg	caa	aac	acg	ctg	caa	tcc	gtt	ccg	gcg	att	ctg		1191
Phe	Val	Asn	Lys	Ala	Gln	Asn	Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Pro	Ala	Ile	Leu		
			320					325					330				
aag	tct	aag	aat	tac	aca	tct	gct	act	ttc	cac	ggg	aac	acg	cag	acg		1239
Lys	Ser	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Phe	His	Gly	Asn	Thr	Gln	Thr		
		335					340					345					
ttc	tgg	aac	cgt	aac	gaa	atg	tac	aag	gcg	gaa	ggc	att	gat	aaa	ttc		1287

ES 2 396 159 T3

Phe Trp Asn Arg Asn Glu Met Tyr Lys Ala Glu Gly Ile Asp Lys Phe 350 355 360	
ttt gat tct gct tac tat gac atg aac gaa gaa aac acg aaa aac tac Phe Asp Ser Ala Tyr Tyr Asp Met Asn Glu Glu Asn Thr Lys Asn Tyr 365 370 375 380	1335
ggc atg aaa gac aaa ccg ttc ttc aaa gaa tca atg ccg ctg ctg gaa Gly Met Lys Asp Lys Pro Phe Phe Lys Glu Ser Met Pro Leu Leu Glu 385 390 395	1383
agc ctg ccg cag ccg ttc tat acg aag ttc att acc ctt tcc aac cac Ser Leu Pro Gln Pro Phe Tyr Thr Lys Phe Ile Thr Leu Ser Asn His 400 405 410	1431
ttc cca ttc gga atg gat gag ggg gat aca gac ttc ccg gct gga gac Phe Pro Phe Gly Met Asp Glu Gly Asp Thr Asp Phe Pro Ala Gly Asp 415 420 425	1479
ttt ggt gac tct gtc gtc gat aac tat ttc cag tca gcc cat tac ctt Phe Gly Asp Ser Val Val Asp Asn Tyr Phe Gln Ser Ala His Tyr Leu 430 435 440	1527
gat cag tcc att gaa caa ttc ttc aat gat ctg aaa aaa gac ggg tta Asp Gln Ser Ile Glu Gln Phe Phe Asn Asp Leu Lys Lys Asp Gly Leu 445 450 455 460	1575
tat gat aaa tcg att att gtg atg tac gga gac cac tac ggc atc tct Tyr Asp Lys Ser Ile Ile Val Met Tyr Gly Asp His Tyr Gly Ile Ser 465 470 475	1623
gaa aac cac aat aaa gcg atg gcg aaa gtg ctt ggc aag gat gaa atc Glu Asn His Asn Lys Ala Met Ala Lys Val Leu Gly Lys Asp Glu Ile 480 485 490	1671
act gat tac gac aac gcc cag ctt caa cgg gtg ccg ctc ttt atc cac Thr Asp Tyr Asp Asn Ala Gln Leu Gln Arg Val Pro Leu Phe Ile His 495 500 505	1719
gct gcc ggc gtg aag ggc gag aaa gtt cat aaa tat gcc gga gac gtt Ala Ala Gly Val Lys Gly Glu Lys Val His Lys Tyr Ala Gly Asp Val 510 515 520	1767
gat gtg gct cct acc att ctg cat ctg ctc gga gtg gat acg aag gac Asp Val Ala Pro Thr Ile Leu His Leu Leu Gly Val Asp Thr Lys Asp 525 530 535 540	1815
tat ctg atg tcc ggt tct gat att tta tcg aaa gaa cac cgt gaa gtg Tyr Leu Met Ser Gly Ser Asp Ile Leu Ser Lys Glu His Arg Glu Val 545 550 555	1863
att ccg ttc cga aac gga gac ttt att tca ccg aag tac acg aaa ata Ile Pro Phe Arg Asn Gly Asp Phe Ile Ser Pro Lys Tyr Thr Lys Ile 560 565 570	1911
tcc ggt aag tat tac gac acg aaa acc gga aaa gaa ctc gat gaa tcc Ser Gly Lys Tyr Tyr Asp Thr Lys Thr Gly Lys Glu Leu Asp Glu Ser 575 580 585	1959
gaa gtc gac aag tca gaa gac tca ctc gtc aag aag gaa ctt gaa atg	2007

ES 2 396 159 T3

Glu Val Asp Lys Ser Glu Asp Ser Leu Val Lys Lys Glu Leu Glu Met
 590 595 600

tcc gat aaa atc ata aac gga gac ctg ctg cgg ttc tac gag ccg aaa 2055
 Ser Asp Lys Ile Ile Asn Gly Asp Leu Leu Arg Phe Tyr Glu Pro Lys
 605 610 615 620

ggt ttt aag aag gtg aat cct tct gat tat gat tac aca aaa cat gac 2103
 Gly Phe Lys Lys Val Asn Pro Ser Asp Tyr Asp Tyr Thr Lys His Asp
 625 630 635

gaa gat tct tcc gaa acg tca aag gat aac gaa gat aaa taagaaaaag 2152
 Glu Asp Ser Ser Glu Thr Ser Lys Asp Asn Glu Asp Lys
 640 645

cggagagggtt gccctctccg cttttttatt tgacagcagc cctcaattcc tcagctgcaa 2212

attccacatt cgggccaata atgacttgaa cagattgccg gcccgatttg acaaccctt 2272

ttgcgcctgc tttcttttagc agtgcttcat ccaccaaaagc ggtatccttc acagtcagtc 2332

gcagccttgt 2342

<210> 2
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 2

Met Lys Thr Phe Ile Lys Glu Arg Gly Leu Ala Phe Phe Leu Ile Ala
 1 5 10 15

Val Val Leu Leu Trp Ile Lys Thr Tyr Val Gly Tyr Val Leu Asn Phe
 20 25 30

Asn Leu Gly Ile Asp Asn Thr Ile Gln Lys Ile Leu Leu Phe Val Asn
 35 40 45

Pro Leu Ser Ser Ser Leu Phe Phe Leu Gly Phe Gly Leu Leu Phe Lys
 50 55 60

Lys Lys Leu Gln Gln Thr Ala Ile Ile Val Ile His Phe Leu Met Ser
 65 70 75 80

Phe Leu Leu Tyr Ala Asn Ile Val Tyr Tyr Arg Phe Phe Asn Asp Phe
 85 90 95

Ile Thr Ile Pro Val Ile Met Gln Ala Lys Thr Asn Gly Gly Gln Leu
 100 105 110

Gly Asp Ser Ala Phe Ser Leu Met Arg Pro Thr Asp Ala Phe Tyr Phe
 115 120 125

Ile Asp Thr Ile Ile Leu Ile Ile Leu Ala Ile Lys Val Asn Lys Pro
 130 135 140

Ala Glu Thr Ser Ser Lys Lys Ser Phe Arg Ile Ile Phe Ala Ser Ser
 145 150 155 160

10

ES 2 396 159 T3

Ile Leu Val Phe Leu Ile Asn Leu Ala Val Ala Glu Ser Asp Arg Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Thr Arg Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Leu Val Lys Tyr Leu
180 185 190

Gly Thr Tyr Asn Phe Thr Ile Tyr Asp Ala Val Gln Asn Ile Lys Ser
195 200 205

Asn Ser Gln Arg Ala Leu Ala Asp Ser Ser Asp Val Thr Glu Val Glu
210 215 220

Asn Tyr Met Lys Ala Asn Tyr Asp Val Pro Asn Asn Val Tyr Phe Gly
225 230 235 240

Lys Ala Glu Gly Lys Asn Val Ile Tyr Val Ser Leu Glu Ser Leu Gln
245 250 255

Ser Phe Ile Ile Asp Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Glu Val Thr Pro Phe
260 265 270

Leu Asn Lys Leu Ala His Asp Asn Glu Thr Phe Tyr Phe Asp Asn Phe
275 280 285

Phe His Gln Thr Gly Gln Gly Lys Thr Ser Asp Ala Glu Phe Met Met
290 295 300

Glu Asn Ser Leu Tyr Pro Leu Ala Gln Gly Ser Val Phe Val Asn Lys
305 310 315 320

Ala Gln Asn Thr Leu Gln Ser Val Pro Ala Ile Leu Lys Ser Lys Asn
325 330 335

Tyr Thr Ser Ala Thr Phe His Gly Asn Thr Gln Thr Phe Trp Asn Arg
340 345 350

Asn Glu Met Tyr Lys Ala Glu Gly Ile Asp Lys Phe Phe Asp Ser Ala
355 360 365

Tyr Tyr Asp Met Asn Glu Glu Asn Thr Lys Asn Tyr Gly Met Lys Asp
370 375 380

Lys Pro Phe Phe Lys Glu Ser Met Pro Leu Leu Glu Ser Leu Pro Gln
385 390 395 400

Pro Phe Tyr Thr Lys Phe Ile Thr Leu Ser Asn His Phe Pro Phe Gly
405 410 415

Met Asp Glu Gly Asp Thr Asp Phe Pro Ala Gly Asp Phe Gly Asp Ser
420 425 430

Val Val Asp Asn Tyr Phe Gln Ser Ala His Tyr Leu Asp Gln Ser Ile
435 440 445

Glu Gln Phe Phe Asn Asp Leu Lys Lys Asp Gly Leu Tyr Asp Lys Ser
450 455 460

Ile Ile Val Met Tyr Gly Asp His Tyr Gly Ile Ser Glu Asn His Asn
465 470 475 480

ES 2 396 159 T3

Lys Ala Met Ala Lys Val Leu Gly Lys Asp Glu Ile Thr Asp Tyr Asp
 485 490 495

Asn Ala Gln Leu Gln Arg Val Pro Leu Phe Ile His Ala Ala Gly Val
 500 505 510

Lys Gly Glu Lys Val His Lys Tyr Ala Gly Asp Val Asp Val Ala Pro
 515 520 525

Thr Ile Leu His Leu Leu Gly Val Asp Thr Lys Asp Tyr Leu Met Ser
 530 535 540

Gly Ser Asp Ile Leu Ser Lys Glu His Arg Glu Val Ile Pro Phe Arg
 545 550 555 560

Asn Gly Asp Phe Ile Ser Pro Lys Tyr Thr Lys Ile Ser Gly Lys Tyr
 565 570 575

Tyr Asp Thr Lys Thr Gly Lys Glu Leu Asp Glu Ser Glu Val Asp Lys
 580 585 590

Ser Glu Asp Ser Leu Val Lys Lys Glu Leu Glu Met Ser Asp Lys Ile
 595 600 605

Ile Asn Gly Asp Leu Leu Arg Phe Tyr Glu Pro Lys Gly Phe Lys Lys
 610 615 620

Val Asn Pro Ser Asp Tyr Asp Tyr Thr Lys His Asp Glu Asp Ser Ser
 625 630 635 640

Glu Thr Ser Lys Asp Asn Glu Asp Lys
 645

<210> 3
 <211> 1399
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (201)..(1199)

10

<400> 3

aaattctcga aggagagcct gttcagcaat cgtaatoacc tggcattgcc ttcttgaat 60

cgttcataaa acatocgcaa aaatttgtaa agaacttatt gtgcttccaa ctttttttct 120

atattttatg ataatatata taattagggc acaatgtgga tatttactgt gaaacagatt 180

ttcaaggagg atataaatag atg ttt gca agg gat att ggt att gac ctc ggt 233
 Met Phe Ala Arg Asp Ile Gly Ile Asp Leu Gly
 1 5 10

act gca aat gta ctg atc cat gtt aaa ggt aaa gga att gtt ctg aat 281
 Thr Ala Asn Val Leu Ile His Val Lys Gly Lys Gly Ile Val Leu Asn
 15 20 25

gaa cct tcc gtt gtt gca ctt gat aaa aac agc ggc aaa gtg ctg gcg 329

ES 2 396 159 T3

Glu	Pro	Ser	Val	Val	Ala	Leu	Asp	Lys	Asn	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala		
		30					35					40					
ggt	ggc	gaa	gag	gca	aga	cga	atg	ggt	gga	cgt	aca	cct	ggg	aat	att		377
Val	Gly	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Met	Val	Gly	Arg	Thr	Pro	Gly	Asn	Ile		
	45					50					55						
ggt	gcg	att	cgc	ccg	ctg	aaa	gac	gga	ggt	att	gct	gac	ttt	gaa	gta		425
Val	Ala	Ile	Arg	Pro	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Phe	Glu	Val		
60					65					70				75			
aca	gaa	gca	atg	ctg	aaa	cat	ttt	att	aac	aag	ctg	aat	gta	aaa	ggc		473
Thr	Glu	Ala	Met	Leu	Lys	His	Phe	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Val	Lys	Gly		
				80					85					90			
ctg	ttc	tca	aag	ccg	cgc	atg	ctc	att	tgc	tgc	ccg	acg	aat	att	aca		521
Leu	Phe	Ser	Lys	Pro	Arg	Met	Leu	Ile	Cys	Cys	Pro	Thr	Asn	Ile	Thr		
			95					100					105				
tcc	ggt	gag	caa	aaa	gca	att	aaa	gaa	gct	gca	gaa	aaa	agc	ggc	ggg		569
Ser	Val	Glu	Gln	Lys	Ala	Ile	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Gly		
		110					115					120					
aaa	cat	gtg	tac	ctt	gaa	gaa	gaa	cct	aaa	gtt	gcc	gct	atc	ggc	gcg		617
Lys	His	Val	Tyr	Leu	Glu	Glu	Glu	Pro	Lys	Val	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala		
	125					130						135					
ggt	atg	gaa	ata	ttc	cag	cca	agc	ggt	aac	atg	ggt	gta	gac	atc	gga		665
Gly	Met	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Ser	Gly	Asn	Met	Val	Val	Asp	Ile	Gly		
140					145					150					155		
ggc	ggg	acg	acg	gat	atc	gcg	ggt	att	tca	atg	ggc	gat	att	gtc	acc		713
Gly	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Ala	Val	Ile	Ser	Met	Gly	Asp	Ile	Val	Thr		
				160						165				170			
tcc	tct	tct	att	aaa	atg	gct	ggg	gac	aag	ttt	gac	atg	gaa	atc	tta		761
Ser	Ser	Ser	Ile	Lys	Met	Ala	Gly	Asp	Lys	Phe	Asp	Met	Glu	Ile	Leu		
			175					180					185				
aat	tat	atc	aaa	cgc	gag	tac	aag	ctg	ctg	atc	ggc	gaa	cgt	act	gcg		809
Asn	Tyr	Ile	Lys	Arg	Glu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Ile	Gly	Glu	Arg	Thr	Ala		
		190					195					200					
gag	gat	att	aag	att	aaa	gtc	gca	act	ggt	ttc	cca	gac	gca	cgt	cac		857
Glu	Asp	Ile	Lys	Ile	Lys	Val	Ala	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Ala	Arg	His		
	205					210					215						
gag	gaa	att	tcc	att	cgc	gga	cgg	gac	atg	ggt	tcc	ggt	ctt	cca	aga		905
Glu	Glu	Ile	Ser	Ile	Arg	Gly	Arg	Asp	Met	Val	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg		
220					225					230					235		
aca	att	aca	gta	aac	agt	aaa	gaa	ggt	gaa	gaa	gcc	ctt	cgt	gaa	tct		953
Thr	Ile	Thr	Val	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Glu	Ser		
				240					245					250			
gtc	gct	ggt	att	ggt	cag	gct	gca	aaa	caa	gtg	ctc	gaa	aga	aca	ccg		1001
Val	Ala	Val	Ile	Val	Gln	Ala	Ala	Lys	Gln	Val	Leu	Glu	Arg	Thr	Pro		
			255					260					265				
cct	gaa	ctt	tct	gct	gat	att	att	gac	cgc	ggc	ggt	att	att	acc	ggc		1049

ES 2 396 159 T3

```

Pro Glu Leu Ser Ala Asp Ile Ile Asp Arg Gly Val Ile Ile Thr Gly
      270                               275                               280

gga ggc gcg ctc tta aac ggc ctt gac cag ctg ctt gct gaa gag ctg      1097
Gly Gly Ala Leu Leu Asn Gly Leu Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu Leu
      285                               290                               295

aag gta ccg gtc ctc gtt gct gaa aat cct atg gat tgc gta gcc atc      1145
Lys Val Pro Val Leu Val Ala Glu Asn Pro Met Asp Cys Val Ala Ile
      300                               305                               310                               315

ggc aca ggt gtc atg ctt gat aat atg gac aag ctt cct aaa cgc aaa      1193
Gly Thr Gly Val Met Leu Asp Asn Met Asp Lys Leu Pro Lys Arg Lys
      320                               325                               330

cta agc tgatttcaca aacctcattc tgaaaaagaa tgagggtttt ttatgaaaaa      1249
Leu Ser

gccttcacga aaagatgta aatgaogata ataggataaa atactgagtt tttattatag      1309

aacgaacggtt cctatatgac aactggaaaa aatgccattt ttagagggtgg gaaatttgtt      1369

aaaaggatta tatacagcaa catccgcaat      1399

```

<210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

 <400> 4

```

Met Phe Ala Arg Asp Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Ala Asn Val Leu
  i      5                               10                               15

Ile His Val Lys Gly Lys Gly Ile Val Leu Asn Glu Pro Ser Val Val
      20                               25                               30

Ala Leu Asp Lys Asn Ser Gly Lys Val Leu Ala Val Gly Glu Glu Ala
      35                               40                               45

Arg Arg Met Val Gly Arg Thr Pro Gly Asn Ile Val Ala Ile Arg Pro
      50                               55                               60

Leu Lys Asp Gly Val Ile Ala Asp Phe Glu Val Thr Glu Ala Met Leu
      65                               70                               75                               80

Lys His Phe Ile Asn Lys Leu Asn Val Lys Gly Leu Phe Ser Lys Pro
      85                               90                               95

Arg Met Leu Ile Cys Cys Pro Thr Asn Ile Thr Ser Val Glu Gln Lys
      100                              105                              110

Ala Ile Lys Glu Ala Ala Glu Lys Ser Gly Gly Lys His Val Tyr Leu
      115                              120                              125

Glu Glu Glu Pro Lys Val Ala Ala Ile Gly Ala Gly Met Glu Ile Phe
      130                              135                              140

```

5

10

ES 2 396 159 T3

Gln Pro Ser Gly Asn Met Val Val Asp Ile Gly Gly Gly Thr Thr Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Ile Ser Met Gly Asp Ile Val Thr Ser Ser Ser Ile Lys
 165 170 175
 Met Ala Gly Asp Lys Phe Asp Met Glu Ile Leu Asn Tyr Ile Lys Arg
 180 185 190
 Glu Tyr Lys Leu Leu Ile Gly Glu Arg Thr Ala Glu Asp Ile Lys Ile
 195 200 205
 Lys Val Ala Thr Val Phe Pro Asp Ala Arg His Glu Glu Ile Ser Ile
 210 215 220
 Arg Gly Arg Asp Met Val Ser Gly Leu Pro Arg Thr Ile Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Ser Lys Glu Val Glu Glu Ala Leu Arg Glu Ser Val Ala Val Ile Val
 245 250 255
 Gln Ala Ala Lys Gln Val Leu Glu Arg Thr Pro Pro Glu Leu Ser Ala
 260 265 270
 Asp Ile Ile Asp Arg Gly Val Ile Ile Thr Gly Gly Gly Ala Leu Leu
 275 280 285
 Asn Gly Leu Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu Leu Lys Val Pro Val Leu
 290 295 300
 Val Ala Glu Asn Pro Met Asp Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Val Met
 305 310 315 320
 Leu Asp Asn Met Asp Lys Leu Pro Lys Arg Lys Leu Ser
 325 330

- 5 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Oligonucleótido IPCR1
 <400> 5
 gcttgtaaattctatcataa ttg 23
- 15 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Oligonucleótido IPCR2
 <400> 6
 agggaaatcat tgaaggttg g 21
- 25 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido IPCR3

5 <400> 7
 gcatttaata cttagcgacgc c 21

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-A

15 <400> 8
 gctcactctagaccgaggtc aataccaata tcc 33

<210> 9
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-B

25 <400> 9
 gtgatgaagc gtcctatg 18

<210> 10
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-C

35 <400> 10
 ctgagcgaat tccgcaaact aagctgattt cac 33

<210> 11
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-D

<400> 11
 50 cctatatggc ctggaagac 19

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-fw

<400> 12
 60 ctgaggatc cacctggcat tgccttctg 30

<210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido mbl-rev

 <400> 13
 5 cactactgaat tccatgacac ctgtgcccga tg 32

 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido yflE-A1

 <400> 14
 15 ctacgagcat gcgttcgagc gaaacgatag 30

 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido yflE_A2

 <400> 15
 25 gtacggtcta gagttcgagc gaaacgatag 30

 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido yflE-B

 <400> 16
 35 catcgtgatt ccggcactc 19

 <210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido yflE-C1

 <400> 17
 45 catctagta ccgagagggt gccctctcc 29

 <210> 18
 <211> 29
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido yflE_C2

 <400> 18
 55 ctagctgaat tcgagagggt gccctctcc 29

 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 396 159 T3

<220>
<223> Oligonucleótido yflE-D

5 <400> 19
ctgccgtaat gcatgtcag 19

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido yflEfw

15 <400> 20
gacagtggat cccacttct ccctcatag 30

<210> 21
<211> 30
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido yflErev

25 <400> 21
catccagaat tcgagctga ggaattgagg 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un inhibidor de LtaS que comprende:
 - 5 (a) proporcionar bacterias gram positivas en las que las bacterias comprenden una mutación en el gen *mbI* u homólogo del mismo que altera la función del gen *mbI* u homólogo del mismo;
 - (b) cultivar las bacterias de (a) en presencia de una sustancia de ensayo en condiciones de magnesio menor de 3 mM;
 - 10 (c) supervisar el crecimiento de las bacterias;

en el que el crecimiento o crecimiento más rápido de las bacterias en comparación con crecimiento en ausencia de la sustancia de ensayo es indicativo de que la sustancia de ensayo es un inhibidor de LtaS.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mutación en el gen *mbI* comprende delección de parte de o todo el gen *mbI*.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se suprime el gen *mbI* completo.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las condiciones de magnesio bajo comprenden una
 20 cantidad de magnesio tal que la bacteria crezca a menos del 10% de la velocidad de las bacterias que tienen la misma delección de *mbI* cuando crecen en condiciones de Mg^{2+} 20 mM.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las condiciones de magnesio bajo comprenden Mg^{2+}
 25 menor de 1 mM.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las bacterias se cultivan en medio no complementado
 con Mg^{2+} adicional.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende supervisar la densidad óptica del
 30 cultivo para supervisar con respecto al crecimiento.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el método comprende cultivar una cepa de bacterias
 35 mutantes de *mbI* en presencia de Mg^{2+} alto, diluirla en medio de Mg^{2+} bajo y transferirla a un tubo de muestra, añadir una sustancia de ensayo y supervisar con respecto al crecimiento bacteriano supervisando la densidad óptica en el pocillo de muestra.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las bacterias se cultivan en una placa de agar que
 40 contiene medio Mg^{2+} bajo, se aplica puntualmente sustancia de ensayo en la placa y se detecta crecimiento bacteriano mediante inspección visual de la placa.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que se cultivan bacterias que comprenden el mutante de
 mbI en Mg^{2+} alto antes de dilución y proliferación en las placas de agar.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bacteria gram positiva es un bacilo.
 45
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el bacilo es *B. subtilis*.

Fig. 1

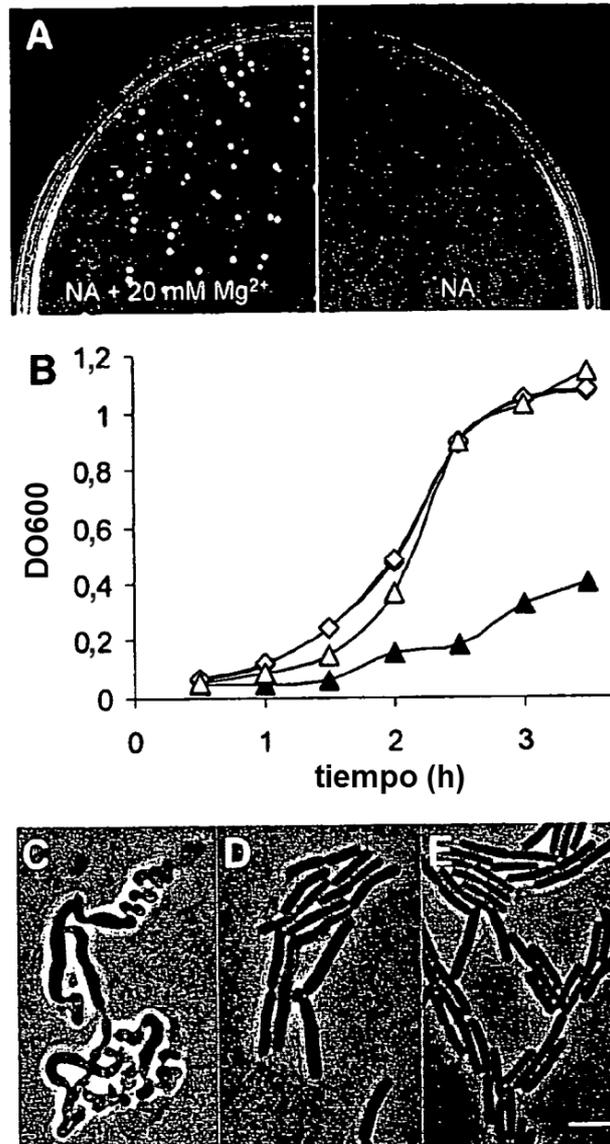


Fig. 2

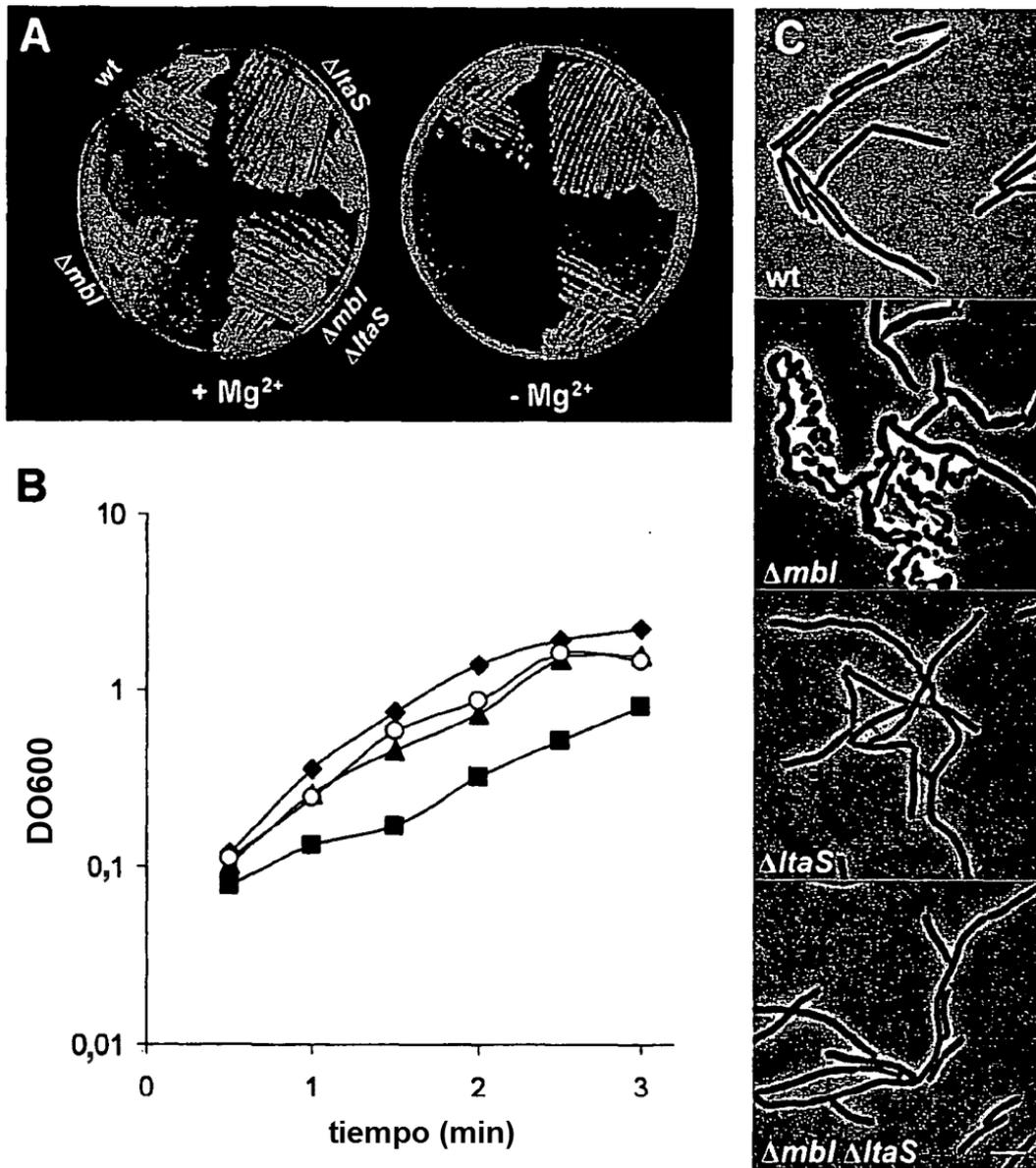


Fig. 3

