

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 648**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2007 E 07733307 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2038418**

54 Título: **Moléculas de ADN y métodos**

30 Prioridad:

21.06.2006 GB 0612301

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

25.09.2015

73 Titular/es:

**MORVUS TECHNOLOGY LTD. (100.0%)
Llanvetherine Court
Abergavenny NP7 8NL, GB**

72 Inventor/es:

**MINTON, NIGEL PETER y
HEAP, JOHN TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 648 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

Moléculas de ADN y métodos

5 La presente descripción se refiere a moléculas de ADN y métodos que usan las moléculas para introducir mutaciones en el ADN de una célula bacteriana grampositiva, en particular una célula de la clase *Clostridia*.

La clase *Clostridia* incluye los órdenes *Clostridiales*, *Halanaerobiales* y *Thermoanaerobacteriales*. El orden *Clostridiales* incluye la familia *Clostridiaceae*, que incluye el género *Clostridium*.

10 El género *Clostridium* es uno de los géneros bacterianos más grandes. Está compuesto por formadores de esporas grampositivos anaerobios obligados. Ciertos miembros se pueden emplear en escala industrial para la producción de combustibles químicos, p.ej., *Clostridium thermocellum* y *Clostridium acetobutylicum*. También se ha demostrado que esta última especie de *Clostridia*, junto con otros representantes benignos, tiene potencial como vehículo de entrega de agentes terapéuticos dirigidos contra el cáncer. No obstante, el género ha logrado mayor notoriedad como consecuencia de los miembros que causan enfermedades en humanos y animales domésticos, p.ej., *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*.

20 A pesar de la destacada importancia comercial y médica del género, el progreso hacia su explotación efectiva o sobre el desarrollo de enfoques racionales contra las enfermedades que causan se ha visto gravemente obstaculizado por la falta de un conocimiento básico de la biología de los organismos a nivel molecular. En gran medida, esto es consecuencia de la ausencia de herramientas genéticas efectivas.

25 En años recientes, se han determinado las secuencias completas del genoma de al menos una cepa representativa de las especies principales, incluso de *C. acetobutylicum*, *C. difficile*, *C. botulinum* y *C. perfringens*. En otras especies bacterianas, este conocimiento puede servir como trampolín para un manejo más efectivo de las enfermedades o para la generación de cepas con propiedades de proceso mejoradas. Una herramienta fundamental para estos proyectos es la capacidad para integrar racionalmente el ADN al genoma. Dicha tecnología se puede emplear: (i) para generar mutantes específicos como medio para asignar funciones a genes individuales y conjuntos de genes, como paso inicial esencial hacia la comprensión de la fisiología y la patogenia; (ii) para inactivar genes regulatorios o estructurales por inserción, como medio para mejorar la producción de mercaderías de interés, y (iii) para introducir en forma estable información genética codificadora de factores no previstos. Sin embargo, en la actualidad no existen vectores de integración efectivos para estudios de mutación en ningún *Clostridium* sp. y la capacidad para inactivar genes por inserción en el género continúa siendo lamentablemente inadecuada.

35 Los intentos previos tendientes a preparar mutantes de *Clostridium* sp. dependieron de la recombinación homóloga entre un vector de integración y el cromosoma del huésped. En la cepa 13 de *C. perfringens*, NCIMB 8052 de *C. beijerinckii*, ATCC 824 de *C. acetobutylicum* y CD37 de *C. difficile*, se ha demostrado que los plásmidos con origen de replicación negativo portadores de regiones del cromosoma del huésped se integran al genoma por recombinación homóloga (Shimizu et al. (1994) J. Bacteriol. 176: 1616-23; Wilkinson y Young (1994) Microbiol. 140: 89-95; Green et al. (1996) Microbiol. 142: 2079-2086; Liyanage et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67: 2004-2010). En el caso de *C. beijerinckii* y *C. difficile*, se movilizaron vectores de donantes de *E. coli*. En *C. perfringens* y *C. acetobutylicum*, se introdujeron plásmidos por transformación. En *C. beijerinckii*, surgieron integrantes con frecuencias de 10^{-6} a 10^{-7} por receptor, lo cual representa unos dos órdenes de magnitud inferiores a la frecuencia de transferencia observada (10^{-4} a 10^{-5}) con plásmidos competentes para la replicación (Wilkinson y Young, 1994, *supra*). En el caso de *C. difficile*, no se informó indicación de las frecuencias obtenidas (Liyanage et al., 2001, *supra*). En *C. acetobutylicum*, surgieron integrantes con una frecuencia de 0,8 a 0,9 "colonias" por mg de ADN (Green et al., 1996, *supra*). En los integrantes mencionados, las secuencias de plásmido en el sitio objetivo estaban flanqueadas por dos copias directamente repetidas del segmento de ADN director de la integración. Como consecuencia, eran inestables en la segregación, p.ej., con pérdidas por 30 generaciones de entre $1,8$ a $3,0 \times 10^{-3}$ para *C. acetobutylicum* (Green et al., 1996, *supra*) y entre $0,37$ a $1,3 \times 10^{-3}$ para *C. beijerinckii* (Wilkinson y Young, 1994, *supra*).

55 Por lo tanto, se prefieren los integrantes obtenidos por intercambio alélico. En consecuencia, se buscaron y obtuvieron mutantes con cruzamiento doble en *C. perfringens* (Awad et al. (1995) Mol. Microbiol. 15: 191-202; Bannam et al. (1995) Mol. Microbiol. 16: 535-551. Sin embargo, el intercambio alélico solo fue posible mediante la inclusión de regiones de homología relativamente largas (3,0 kb) en cada extremo del gen de resistencia a antibióticos empleado para inactivar el gen objetivo. Además, incluso con esta precaución, el aislamiento de los mutantes demostró ser muy variable (es decir, solo se obtuvieron mutantes *plc* en 2 de 10 experimentos independientes) y los aislamientos de muchos mutantes pueden tardar hasta 6 meses, mientras que otros nunca se aíslan. Se pudieron detectar eventos de integración infrecuentes en *C. perfringens* como consecuencia de la alta frecuencia con la cual se puede transformar ADN en este microorganismo. Los intentos tendientes a generar mutantes de cruzamiento dobles en otras especies de *Clostridia* fueron infructuosos.

65 Hasta la fecha, la generación de mutantes en cierto rango de especies de *Clostridia* distintas de *C. perfringens*, mediante el uso de recombinación homóloga clásica, ha demostrado ser difícil. Así, solo se han realizado cinco mutaciones en *C. acetobutylicum*. Cuatro (*butK*, CAC3075; *pta*, CAC1742; *aad*, CACP0162 y *solR*, CACP061) fueron

preparados mediante integración por cruzamiento simple de un plásmido deficiente en replicación (Green et al., 1996, *supra*; Green y Bennett (1996) Appl. Biochem. Biotechnol. 213, 57-58; Harris et al. (2002) J. Bacteriol. 184, 3586-3597) mientras que un quinto en *spo0A* (CAC2071) fue aislado mediante una estrategia que intentó sin éxito la generación de un mutante por intercambio recíproco que usó un plásmido de replicación defectuosa (Nair et al. (1999) J. Bacteriol. 181, 319-330). De modo similar, solo se ha informado la generación de tres mutantes dirigidas en *C. difficile*. Un mutante (*gldA*, CD0274) fue generado mediante un plásmido de replicación deficiente (Liyanage et al., 2001, *supra*) si bien este evento pareció ser letal y las células mutantes no pudieron propagarse. Los otros dos genes inactivados (*rgaR*, CD3255 y *rgbR*, CD1089) surgieron después de la introducción de un plásmido de replicación defectuosa portador de fragmentos internos de los dos genes estructurales (O'Connor et al. (2006) Mol. Microbiol. 61, 1335-1351). Al parecer, estos últimos plásmidos fueron introducidos con "cierta dificultad" y si bien se aislaron integrantes, no se reportaron frecuencias de aislamiento. De hecho, es difícil hacer una evaluación de las eficacias de los procedimientos de mutagénesis usados previamente en ambos microorganismos, dado que generalmente no se presentan indicaciones de la frecuencia de generación de tales mutantes. En el caso de *C. acetobutylicum* (Thomas et al., (2005) Metabolic engineering of soventogenic clostridia. En: Dürre, P. Handbook on Clostridia, CRC Press. pp 813-830) se reconoce que hay "menos de un transformante por mg de ADN de plásmido". Además, dado que la mayoría de estos mutantes se preparan por inserción de cruzamiento simple, son inestables debido a la escisión del plásmido. Por ejemplo, la prueba Southern blotting de mutante *rgaR* de *C. difficile* reveló la presencia de "remoción por bucle", con plásmidos de replicación independiente en algunas células de la población (O'Connor et al., 2006, *supra*).

Se ha observado un aumento en la cantidad de diseños de tecnología que sacan provecho de los sistemas que incluyen elementos genéticos móviles para lograr una modificación más efectiva de los genomas bacterianos. El intrón de Grupo II L1.LtrB de *Lactococcus lactis* es un elemento que media su propia movilidad a través de la acción de una transcriptasa inversa codificada por el intrón (LtrA) y el bucle de ARN removido. Además, puede ser redirigido a virtualmente cualquier secuencia de ADN deseada a través de la modificación de del ARN del intrón (Guo et al. (2000) Science 289: 452-457; Mohr et al. (2000) Genes Dev. 14: 559-573). En consecuencia, mediante la mutación adecuada de bases individuales en la región de 15 bp del intrón involucrado en el objetivo, Karberg et al. (Nature Biotech. (2001) 19: 1162-1167) pudieron dirigir la inserción del elemento en posiciones diferenciadas definidas dentro de varios genes de *E. coli* diferentes con frecuencias de entre el 0,1 y el 22 %. La alteración de uno de estos genes, *thyA*, da origen a clones con resistencia natural a trimetoprima. En consecuencia, se pudieron seleccionar integrantes mediante el cultivo en presencia de trimetoprima. Se identificaron los integrantes en otros genes mediante el estudio de colonias individuales respecto de la presencia del intrón L1.LtrB. El plásmido usado para alterar el gen *thyA* en *E. coli* también se usó para alterar el gen *thyA* en *S. flexneri* y en *S. typhimurium*. Se obtuvieron colonias resistentes a trimetoprima con una frecuencia del 1 % y el 0,3 %, respectivamente.

Se usó el intrón de Grupo II L1.LtrB de *Lactococcus lactis* para generar *knock-outs* en el gen *plc* de *C. perfringens* (Chen et al. (2005) Appl Environ Microbiol. 71: 7542-7). Un plásmido resistente a cloranfenicol que contiene, entre otros, un intrón L1.LtrB modificado diseñado para estar dirigido al gen *plc*, fue incorporado por electroporación en *C. perfringens*. Los transformantes fueron seleccionados en cloranfenicol y analizados por PCR respecto de la presencia de la inserción en el gen *plc*. De 38 colonias estudiadas, la mayor parte eran negativas para la inserción, pero dos colonias contenían tanto el gen *plc* de tipo silvestre como el del intrón insertado. Se consideró que estas últimas colonias habían aparecido a partir de una única bacteria transformada, que dio origen a una progenie en la cual tuvo lugar la inserción y una progenie en la cual no tuvo lugar la inserción. Las bacterias provenientes de estas colonias mixtas dieron origen a clones puros, el 10 % de los cuales contenían el gen *plc* insertado con el intrón. En consecuencia, se identificaron los mutantes por inserción a través de dos rondas de estudios, sin necesidad de selección por crecimiento en un antibiótico, fuera de la selección en cloranfenicol para la transformación. De hecho, se detectó la falta de cualquier introducción de un gen de resistencia a antibióticos en el cromosoma como ventaja particular del método. En particular, los autores previeron que el método podría ser usado para construir múltiples alteraciones génicas en la misma célula bacteriana mediante el uso del mismo plásmido de lanzadera portador de diferentes intrones L1.LtrB modificados. La frecuencia de transferencia a *C. perfringens* es elevada, de unos dos órdenes de magnitud superiores a otras especies de *Clostridia*. Además, el *knockout* génico (en *plc*) da origen a un fenotipo sencillo de detectar que puede ser visualizado fácilmente sobre placas de agar.

Yao et al. (RNA (2006) 12: 1-11) usaron L1.LtrB para alterar genes sin selección en *Staphylococcus aureus*. Se usó un promotor inducido por cadmio para dirigir la expresión del intrón L1.LtrB en *S. aureus*; la inducción con cadmio fue beneficiosa para obtener mutantes de inserción en un gen. Cuando se prepararon mutantes en otro gen, todas las colonias estudiadas fueron positivas para la inserción del intrón en ausencia de cadmio.

Zhong et al. (Nucleic Acids Res. (2003) 31: 1656-64) describieron un método de selección positiva para redirigir el intrón de Grupo II, que incluye la inserción en dicho intrón de Grupo II de un "marcador seleccionable activado por retrotransposición" o RAM consistente de un casete de resistencia a trimetoprima (Tp) que contiene el intrón *td* del fago T4. El gen de resistencia Tp codifica una dihidrofolato reductasa de tipo II. El intrón *td* es un intrón de Grupo I, es decir, un elemento ARN autocatalítico que, en su orientación correcta, puede escindir-se de una transcripción de ARN en la cual está situado. La orientación en la cual se inserta *td* en Tp^R es tal que el elemento no se empalma cuando se transcribe el gen. En consecuencia, el mRNA se mantiene mutante, y no se produce la proteína requerida para la resistencia a Tp. Cuando se transcribe el elemento de Grupo II al ARN, durante el redireccionamiento, ahora está presente la cadena opuesta de RAM en forma de ARN. En estas circunstancias, el elemento *td* se orienta correctamente

y se empalma. Como consecuencia, cuando el elemento de Grupo II es redirigido hacia el cromosoma, el gen Tp^R ha perdido su inserción de *td*, y ahora es funcional. En consecuencia, las células en las cuales ha tenido lugar la redirección correcta son resistentes a *Tp*. Por lo tanto pueden ser seleccionadas directamente. Se usó el método en células de *Escherichia coli*.

5 Las especies de *Clostridia* son a menudo resistentes a trimetoprima, por lo que no es operable el uso de RAM basado en un casete de resistencia a *Tp*. Por ejemplo, en el estudio de Swenson *et al.* (1980) Antimicrob. Agents Chemother. 18: 13-19, la amplia mayoría de los aislamientos estudiados era resistente. La resistencia también es común en las cepas no patógenas de utilidad industrial. De hecho, la Resistencia intrínseca de *C. cellulolyticum* conforma la base del método de conjugación usado en experimentos de transferencia de genes en Jennert *et al.* (2000) Microbiology. 146: 3071-80.

15 Sigma-Aldrich comercializa un kit para realizar *knockout* génicos (principalmente en *E. coli*) sobre la base de un RAM que consiste de un casete de resistencia a kanamicina (Km^r), el "TargeTron™ Gene Knockout System". *Clostridium* spp. es naturalmente resistente a kanamicina, por lo que no se puede usar la resistencia a kanamicina como marcador de selección en *Clostridium*.

20 La incapacidad para preparar *knockout* génicos definidos en genomas de *Clostridia* por intercambio de marcador recíproco es un impedimento importante para la explotación comercial de miembros de la clase *Clostridia*, y particularmente el género *Clostridium*, pues afecta todas las áreas. Por lo tanto, por el momento no se puede considerar la aplicación de la ingeniería metabólica para generar cepas industriales con características de fermentación mejoradas (p.ej., *C. acetobutylicum* y el proceso de de fermentación de acetona-butanol); no se pueden generar cepas portadoras de genes terapéuticos de localización cromosómica, de utilidad en la terapéutica contra el cáncer (un prerrequisito para estudios clínicos, p.ej., *C. sporogenes* y la terapéutica de profármacos enzimáticos dirigidos a *Clostridia*); y se observa grave deterioro de información fundamental sobre los mecanismos patogénicos, un primer paso esencial en la formulación de contramedidas efectivas (p.ej., *C. difficile* e infecciones adquiridas en medios nosocomiales).

25 El listado o el análisis de un documento de publicación previa en esta especificación no necesariamente deberían tomarse como reconocimiento de que el documento es parte de la tecnología de vanguardia o de conocimiento general común.

30 Los inventores han diseñado moléculas de ADN y métodos que permiten la inserción eficaz de ADN en el genoma de *Clostridium* spp y otras bacterias de la clase *Clostridia*, lo que permite la mutación dirigida de genes en el genoma.

35 Un primer aspecto de la invención provee una molécula de ADN que comprende:

40 un intrón de Grupo II modificado que no expresa la transcriptasa inversa codificada por el intrón, pero que contiene un gen de marcador seleccionable modificado en la orientación inversa respecto del intrón de Grupo II modificado, donde el gen de marcador seleccionable comprende una región codificadora de un marcador seleccionable y un promotor ligado operativamente a dicha región, donde el promotor es capaz de generar la expresión del marcador seleccionable codificado por una única copia del gen de marcador seleccionable en una cantidad suficiente para que el marcador seleccionable altere el fenotipo de una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, de manera tal que pueda ser distinguida de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* que carece del gen de marcador seleccionable;

45 y un promotor para la transcripción del intrón de Grupo II modificado, donde dicho promotor está ligado operativamente a dicho intrón de Grupo II modificado;

50 y donde el gen de marcador seleccionable modificado contiene un intrón de Grupo I situado en la orientación hacia adelante respecto del intrón de Grupo II modificado, a fin de alterar la expresión del marcador seleccionable; donde la molécula de ADN permite la remoción del intrón de Grupo I del transcripto de ARN del intrón de Grupo II modificado, a fin de dejar una región codificadora del marcador seleccionable, y permite la inserción de dicho transcripto de ARN (o una copia correspondiente de ADN) en un sitio de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*;

55 y donde el marcador seleccionable confiere resistencia a eritromicina a la célula bacteriana de la clase *Clostridia*.

60 Los intrones de Grupo II son elementos genéticos móviles que se encuentran en eubacterias y organelas. En la naturaleza, utilizan un mecanismo de movilidad denominado *retrohoming* mediado por un complejo de ribonucleoproteína (RNP) que contiene la transcriptasa inversa codificada por el intrón (IERT) y el lazo de ARN de intrón removido. Se cree que el ARN del intrón removido se inserta directamente en una cadena de un sitio objetivo de ADN bicatenario por una reacción de empalme inverso, mientras que la IERT también escinde la cadena opuesta en forma específica de sitio, y utiliza el extremo 3' de la cadena escindida para la transcripción inversa de ADN objetivo cebado (TPRT) del ARN del intrón insertado. Como consecuencia, se inserta el intrón (y cualquier ácido nucleico transportado en un intrón modificado) en el ADN objetivo. El sistema TPRT solo requiere la IERT y el ARN del intrón removido (véase Saldanha *et al.* (1999) Biochemistry 38, 9069-9083). Se encuentran detalles sobre los intrones de Grupo II en Karberg *et al.* (2001) Nature Biotechnology 19, 1162-1167.

La IERT también es conocida en la técnica como la proteína codificada por el intrón (IEP). La IEP (IERT) tiene actividad de transcriptasa inversa, además de actividades de endonucleasa y matorasa que permiten la inserción de una copia del intrón en ADN.

5 De manera conveniente, se clona la célula seleccionada y se obtiene un único clon de células.

El proceso de escindir el sustrato de ADN e insertar las moléculas de ácido nucleico incluye el apareamiento del ARN del intrón de Grupo II del complejo de RNP a una región específica del sustrato de ADN. Se producen interacciones adicionales entre la transcriptasa inversa codificada por el intrón y regiones en el sustrato que flanquean el sitio de reconocimiento. Normalmente, el ARN del intrón de Grupo II presenta dos secuencias, EBS1 y EBS2, con capacidad para hibridarse con dos secuencias fijadoras del ARN del intrón, IBS1 e IBS2, sobre la cadena superior del sustrato de ADN. Normalmente, la transcriptasa inversa codificada por el intrón de Grupo II se fija a un primer elemento de secuencia y a un segundo elemento de secuencia en el sitio de reconocimiento del sustrato. Normalmente, el ARN del intrón de Grupo II se inserta en el sitio de escisión de la cadena superior del sustrato de ADN. El primer elemento de secuencia del sitio de reconocimiento se encuentra secuencia arriba respecto del presunto sitio de escisión, la secuencia IBS1 y la secuencia IBS2. El primer elemento de secuencia comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 pares de nucleótidos. El segundo elemento de secuencia del sitio de reconocimiento se encuentra secuencia abajo respecto del presunto sitio de escisión y comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 nucleótidos.

20 Tal como se denota en la presente, los nucleótidos situados secuencia arriba respecto del sitio de escisión tienen una posición (-) respecto del sitio de escisión, y los nucleótidos situados secuencia abajo respecto del sitio de escisión tienen una posición (+) respecto del sitio de escisión. En consecuencia, el sitio de escisión está situado entre los nucleótidos -1 y +1 de la cadena superior del sustrato de ADN bicatenario. La secuencia IBS1 y la secuencia IBS2 se encuentran en una región del sitio de reconocimiento que se extiende desde aproximadamente la posición -1 hasta aproximadamente la posición -14 respecto del sitio de escisión.

Normalmente, EBS1 está situada en el dominio I del ARN del intrón de Grupo II y comprende desde aproximadamente 5 a 7 nucleótidos capaces de hibridarse a los nucleótidos de la secuencia IBS1 del sustrato.

30 Normalmente, EBS2 está situada en el dominio I del ARN del intrón de Grupo II secuencia arriba respecto de EBS1 y comprende desde aproximadamente 5 a 7 nucleótidos capaces de hibridarse a los nucleótidos de la secuencia IBS2 del sustrato.

35 A fin de lograr una escisión eficaz del sustrato, se prefiere que el nucleótido o la secuencia que precede inmediatamente al primer nucleótido de EBS1 del ARN del intrón de Grupo II sea complementario de los nucleótidos en +1 de la cadena superior del sustrato.

40 El intrón de Grupo II modificado contenido en la molécula de ADN de la invención no expresa IERT. De preferencia, el intrón de Grupo II no contiene un marco de lectura funcional abierto para IERT. De preferencia, el dominio IV del intrón de Grupo II, que normalmente contiene IERT, está parcialmente eliminado, por lo que no contiene IERT.

45 Se conocen varios intrones de Grupo II que pueden ser útiles en la puesta en práctica de la invención. Incluyen intrones bacterianos tales como los intrones eubacterianos revisados en Dia y Zimmerly (2002) *Nucleic Acids Res.* 30: 1091-1102, y también incluyen los intrones de mitocondrias y cloroplastos a que se hace referencia en Zimmerly, Hausner y Wu (2001) *Nucleic Acids Res.* 29: 1238-1250. Se prefiere si el intrón de Grupo II es el intrón L1.LtrB de *Lactococcus lactis* (Mohr *et al.* (2000) *supra*). La IERT en este intrón de Grupo II es la proteína LtrA. También son adecuadas las nucleotidointegrasas al1 y al2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

50 Otra alternativa es el intrón de Grupo II proveniente del transposón conjugativo de *Clostridia* Tn5397 (Roberts *et al.* (2001) *J. Bacteriol.* 183: 1296-1299).

El complejo LtrA de RNP comprende un ARN de intrón de Grupo II L1.LtrB de tipo silvestre removido o modificado del gen LtrB de *Lactococcus lactis*, en adelante denominado ARN de "intrón L1.LtrB", y una transcriptasa inversa L1.LtrB de tipo silvestre o modificada codificada por el intrón, denominada proteína LtrA. La EBS1 del ARN del intrón L1.LtrB comprende 7 nucleótidos y está situada en las posiciones 457 a 463. La secuencia EBS1 del ARN del intrón L1.LtrB de tipo silvestre presenta la secuencia 5'-GUUGUGG (SEQ ID N.º 1). La EBS2 del ARN del intrón L1.LtrB comprende 6 nucleótidos y está situada en las posiciones 401 hasta 406, inclusive. La secuencia EBS2 del ARN del intrón L1.LtrB de tipo silvestre presenta la secuencia 5'AUGUGU (SEQ ID N.º 2).

60 El intrón de Grupo II en la molécula de ADN de la invención ha sido modificado para incluir un gen de marcador seleccionable modificado. Un gen de marcador seleccionable es cualquier gen que confiere un fenotipo alterado en una célula bacteriana en la cual se expresa, comparado con la célula bacteriana en la cual no se expresa. La modificación del gen de marcador seleccionable modificado (comparado con el gen de marcador seleccionable no modificado) consiste en contener un intrón de Grupo I que altera la expresión del marcador seleccionable. El término "gen de marcador seleccionable no modificado" incluye un gen que comprende un promotor y una región codificadora de un gen,

donde el promotor no es el promotor del gen que aparece en la naturaleza. El "gen de marcador seleccionable no modificado" también incluye el caso en que el promotor es el promotor del gen que aparece en la naturaleza. Más adelante se describen más detalles de la modificación del gen de marcador seleccionable, pero en esencia, la presencia del intrón de Grupo I impide la expresión del marcador seleccionable, pero después de la remoción del intrón de Grupo I, el ácido nucleico obtenido (es decir, el gen de marcador seleccionable no modificado) es capaz de expresar el marcador seleccionable. De preferencia, el gen de marcador seleccionable está situado en el dominio IV del intrón de Grupo II.

Se apreciará que el intrón de Grupo I podrá ser colocado en cualquier localización dentro del gen de marcador seleccionable, siempre que se impida la expresión del marcador seleccionable mediante la presencia del intrón de Grupo I. Se podrá apreciar que el intrón de Grupo I puede ser situado, por ejemplo, dentro del promotor, por ejemplo entre los elementos -10 y -35 del promotor, entre el promotor y la región codificadora, o en la región codificadora.

El gen de marcador seleccionable que contiene el intrón de Grupo I (es decir, el gen de marcador seleccionable modificado) puede ser considerado un marcador activado por retrotransposición (RAM).

Los intrones de Grupo I son intrones autoensamblables que pueden o no requerir factores auxiliares tales como proteínas para ser removidos. Se conocen varios intrones de Grupo I que pueden ser de utilidad en la puesta en práctica de la invención, tales como intrones bacteriófagos (Sandegren y Sjöberg (2004) J. Biol. Chem. 279:22218-22227), e intrón de Grupo I de *Tetrahymena* (Roman (1998) Biochem. 95: 2134-2139). Se prefiere que los intrones de Grupo I no requieran factores auxiliares para ser removidos. Se prefiere que el intrón de Grupo I sea el intrón de Grupo I *td* proveniente de fago T4 (EhrenMan *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5875-5879).

Se apreciará que la orientación de los diversos componentes dentro de la molécula de ADN es muy importante. En consecuencia, en la Figura 2 se verá que el gen de marcador seleccionable modificado está presente dentro del intrón de Grupo II en la orientación inversa al intrón de Grupo II. Además, el intrón de Grupo I está presente dentro del gen de marcador seleccionable modificado en una orientación inversa al gen de marcador seleccionable, pero en la misma orientación hacia adelante que el intrón de Grupo II. Si el intrón de Grupo I estuviera en la misma orientación que el gen de marcador seleccionable, el intrón podría ser removido del transcripto de mRNA del gen de marcador seleccionable y el fenotipo conferido por el marcador seleccionable estaría presente con independencia de si el intrón de Grupo II que contenía el marcador seleccionable ha sido redirigido al cromosoma. Por lo tanto, el intrón de Grupo I y el gen de marcador seleccionable deben estar en orientaciones opuestas.

Si el gen de marcador seleccionable estuviera en la misma orientación que el intrón de Grupo II, siguiendo la lógica anterior, el intrón de Grupo I debería estar en la orientación opuesta al intrón de Grupo II. Sin embargo, en esta orientación, no sería removido del transcripto de mRNA, por lo que incluso si el intrón de Grupo II no fuera redirigido al cromosoma, no habría fenotipo seleccionable.

Solo cuando los diversos componentes están orientados tal como se muestra en la Figura 2, el redireccionamiento del intrón de Grupo II será necesario y suficiente para la expresión del fenotipo de marcador seleccionable.

Cuando se usa la molécula de ADN de la invención para introducir una molécula de ácido nucleico en un sitio de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia* (tal como se describe más adelante con mayor detalle), se retira el intrón de Grupo I del transcripto de ARN producido del intrón de Grupo II modificado para dejar una región codificadora del marcador seleccionable, y el transcripto de ARN (o una de sus copias de ADN) es introducido en un sitio de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*. De esta manera, el ácido nucleico introducido en una molécula de ADN de una célula bacteriana de la clase *Clostridia* contiene un gen de marcador seleccionable capaz de expresar el marcador seleccionable en la célula bacteriana.

En una forma de realización de preferencia, el intrón de Grupo II modificado está flanqueado por exones, donde los exones permiten el ensamblado de un transcripto de ARN del intrón de Grupo II.

El promotor del gen de marcador seleccionable es capaz de generar la expresión del marcador seleccionable cuando es codificado por una única copia del gen de marcador seleccionable en una cantidad suficiente para que el marcador seleccionables altere el fenotipo de una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, de manera tal que puede ser distinguido de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* que carece del gen de marcador seleccionable. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor que, de estar presente en una única copia en el cromosoma bacteriano y estar en unión operativa con la región codificadora del marcador seleccionable, expresa el marcador seleccionable en una cantidad detectable. El promotor del gen de marcador seleccionable es un promotor que es funcional en una célula bacteriana de la clase *Clostridia* y causa la expresión adecuada cuando está presente en una única copia, tal como se describió con anterioridad. Se prefiere que el promotor sea funcional en un *Clostridium* sp. Los promotores adecuados incluyen el promotor de gen *fdx* de *C. perfringens* (Takamizawa *et al.* (2004) Protein Expression Purification 36: 70-75); los promotores *ptb*, *thl* y *adc* de *C. acetobutylicum* (Tummala *et al.* (1999) App. Environ. Microbiol. 65: 3793-3799) y el promotor *cpe* de *C. perfringens* (Melville, Labbe y Sonenshein (1994) Infection and Immunity 62: 5550-5558) y el promotor *tiolasa* de *C. acetobutylicum* (Winzer *et al.* (2000) J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2: 531-541). De preferencia, el promotor del gen de marcador seleccionable es el promotor del gen *thl* de *C. acetobutylicum*.

Para analizar la probabilidad de que un promotor sea un promotor efectivo de un marcador seleccionable, se puede colocar una variante ensamblada del RAM (es decir, que codifique el marcador seleccionable, dado que se ha retirado el intrón de Grupo I) bajo su control de transcripción e introducirlo en la *Clostridia* para ser dirigido a una baja cantidad de copias, de preferencia equivalente a la cantidad de copias del cromosoma. Esto se puede lograr mediante el uso de un plásmido de baja cantidad de copias, tal como los derivados de baja cantidad de copias de plásmido pAM β 1 descritos en Swinfield *et al.* (1990) Gene. 87:79-90, o en forma más ideal, mediante el uso de un transposón conjugativo y el método descrito en Mullany *et al.* (Plasmid (1994) 31: 320-323) y Roberts *et al.* (J Microbiol Methods (2003) 55: 617-624). Para obtener este último, se puede clonar el RAM ensamblado junto con el promotor bajo evaluación en un vector incapaz de replicarse en una bacteria grampositiva, pero que contiene un gen de resistencia a antibióticos (p.ej., *catP*) y un segmento de ADN derivado de un transposón conjugativo, tal como Tn916. Después, el plásmido es transformado en una célula de *Bacillus subtilis* que contiene el transposón conjugativo en su genoma (Tn916) y transformantes seleccionados en placas que contienen cloranfenicol. Dado que el plásmido no se puede replicar, la única forma en que pueden aparecer colonias resistentes a cloranfenicol es que el plásmido se integre en el genoma como consecuencia de recombinación homóloga entre Tn916 y la región de homología transportada por el plásmido. Esto da como resultado una cointegración transposón::plásmido portadora del RAM y el promotor ensamblados en estudio, situados en una única copia en el genoma. Ahora, se puede usar el transconjugante de *Bacillus subtilis* obtenido como donante en una conjugación con la *Clostridia* objetivo. En estos apareamientos, se puede seleccionar la transferencia del cointegrado de transposón::plásmido en el receptor de *Clostridia* sobre la base de la adquisición de resistencia a tianfenicol. Una vez obtenidos, se pueden analizar los transconjugantes respecto de la resistencia codificada por el RAM, p.ej., eritromicina.

El promotor para la regulación de la transcripción del intrón de Grupo II modificado puede ser cualquier promotor adecuado que sea funcional en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un promotor inducible puede ser desreprimido de manera tal que impulse la expresión en una forma constitutiva. En experimentos particulares descritos en los Ejemplos, los inventores hallaron que la expresión regulada del intrón de Grupo II modificado no confiere ventajas en cuanto a permitir una frecuencia elevada de inserción de intrones, comparado con la expresión constitutiva. Sin embargo, en otras situaciones, puede ser útil por la capacidad de regular la expresión del intrón de Grupo II modificado. Una persona experta en la técnica puede realizar experimentos para determinar si un promotor particular es adecuado para permitir un índice satisfactorio de inserción de intrones.

Girbal *et al.* (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69: 4985-4988 describen un promotor inducible por xilosa de preferencia en *C. acetobutylicum* que se basa en el sistema regulatorio de operón promotor-represor de xilosa en *Staphylococcus xylosus*. Los promotores inducibles adecuados son inducibles por IPTG o xilosa. De manera conveniente, por ejemplo cuando la molécula de ADN se utilizará en células de *Clostridia*, el promotor es la región promotora del gen de ferredoxina de *C. pasteurianum* bajo el control de la región operadora lac del operón *lac* de *E. coli*. De manera conveniente, la molécula de ADN también comprende el gen *lacI* de *E. coli*.

Un promotor para regular la transcripción del intrón de Grupo II modificado puede ser un promotor constitutivo. El experto apreciará que, en general, todos los promotores son regulados por una condición u otra, incluso si se desconocen tales condiciones. En consecuencia, pretendemos interpretar "promotor constitutivo" en forma amplia, para abarcar un promotor que sea activo en las células de *Clostridia* en las condiciones de cultivo normales empleadas en el protocolo redirector, sin necesidad de la adición de un agente para activar la expresión impulsada por el promotor. Los promotores de genes esenciales para el metabolismo primario pueden ser "promotores constitutivos" adecuados. Por ejemplo, el promotor tiolasa, *thl*, descrito en los Ejemplos puede ser un promotor adecuado. Otros promotores adecuados son los promotores *hbd*, *crt*, *etfA*, *etfB* y *bcd* de *C. acetobutylicum* (Alsaker y Papoutsakis (2005) J Bacteriol 187:7103-7118). También pueden ser adecuados los promotores sugeridos como adecuados para impulsar la expresión del marcador seleccionable modificado en el RAM. El uso de un promotor inducible permite la transcripción del intrón de Grupo II que contiene el gen de marcador seleccionable interrumpido por el intrón de Grupo I (que puede ser denominado un RAM) puede ser inactivado después de redirigir el RAM al cromosoma bacteriano. La expresión del marcador seleccionable es ineficaz cuando se transcribe el RAM del promotor inducible. Esto puede deberse a la formación de dobletes entre los transcritos de la cadena codificadora transcripta del cromosoma y la cadena no codificadora transcripta de las moléculas de ADN.

De preferencia, la molécula de ADN de la invención es capaz de replicarse en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*. Con mayor preferencia, es capaz de presentar replicación condicional. De manera conveniente, la molécula de ADN contiene un origen de replicación adecuado y cualesquiera genes de replicación sean necesarios para permitir la replicación en la célula bacteriana grampositiva (es decir, genes *rep* adecuados). De preferencia, el ADN es un plásmido. Como alternativa, el ADN puede ser lineal o ser un fago filamentosos tal como M13. De manera conveniente, la molécula de ADN es un vector de lanzadera que permite la replicación y la propagación en una célula bacteriana gramnegativa tal como *Escherichia coli* y la replicación en una célula grampositiva, en particular una célula de la clase *Clostridia* y más particularmente del género *Clostridium*. Además o como alternativa, la molécula de ADN de la invención contiene una región que permite la transferencia conjugativa desde una célula bacteriana a una célula bacteriana de la clase *Clostridia*. En particular, se prefiere que la molécula de ADN contenga una región que permite la transferencia conjugativa entre *E. coli* y una bacteria de la clase *Clostridia*, y más particularmente del género

Clostridium. Por ejemplo, la molécula de ADN puede contener la región *oriT* (origen de transferencia), incluso el gen *traJ*.

5 Se proveen métodos de transformación y conjugación en *Clostridia* en Davis, I, Carter, G, Young, M y Minton, NP (2005) "Gene Cloning in *Clostridia*". En: Handbook on Clostridia (Durre P, ed.) páginas 37-52, CRC Press, Boca Raton, EE.UU.

10 El marcador seleccionable puede ser cualquier marcador seleccionable adecuado que se pueda expresar en una célula de la clase *Clostridia* que contenga el marcador seleccionable, y que se pueda usar para seleccionar dicha célula. Los marcadores seleccionables adecuados incluyen las enzimas que detoxifican una toxina, tales como las enzimas convertidoras de profármacos. Los marcadores seleccionables también incluyen un gen prototrófico (para el uso en un mutante auxotrófico correspondiente). De preferencia, el marcador seleccionable es un marcador que proporciona una ventaja de crecimiento a la célula bacteriana de la clase *Clostridia* en la cual se expresa. Por lo tanto, normalmente, bajo determinada condición de crecimiento, la célula bacteriana que expresa el marcador seleccionable es capaz de crecer (o de crecer con mayor rapidez), comparado con una célula equivalente que no expresa el marcador seleccionable.

15 Los marcadores seleccionables convenientes incluyen factores de resistencia a antibióticos. En consecuencia, de manera adecuada, el gen de marcador seleccionable es un gen que confiere resistencia a antibióticos en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*.

20 No todos los genes de genes de resistencia a antibióticos se pueden usar en todas las células de la clase *Clostridia*. Por ejemplo, *Clostridium sp.* es naturalmente resistente a kanamicina y con frecuencia es resistente a trimetoprima. En consecuencia, se prefiere que el gen de marcador seleccionable no sea un gen de resistencia a kanamicina o un gen de resistencia a trimetoprima, en particular cuando la célula bacteriana es del género *Clostridium*. Los genes de resistencia a antibióticos adecuados para el uso en células de *Clostridia*, tales como *Clostridium sp.*, incluyen genes de resistencia a eritromicina (tales como *Erm*) y genes de resistencia a cloranfenicol (tales como *catP*). Otro gen de resistencia a antibióticos adecuado en *tetM*, por ejemplo *tetM* proveniente del transposón conjugativo Tn916 de *Enterococcus faecalis* (Roberts *et al.* (2001) Microbiol. 147: 1243-1251). Otro gen de resistencia a antibióticos adecuado de amplio uso en bacterias de la clase *Clostridia*, es la espectinomycinadeniltransferasa, *aad* (Charpentier *et al.* (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70, 6076-6085).

30 Los métodos y las moléculas de ADN de la invención también se pueden usar para investigar genes cuya función se desconoce. Por ejemplo, se puede adaptar la molécula de ADN de la invención para contener una secuencia de oligonucleótido singular denominada rótulo ("*tag*") que es introducida al ADN de la célula de la clase *Clostridia*. De manera conveniente, se produce una pluralidad de moléculas de ADN de la invención, donde cada una contiene una secuencia con marca diferente. Cuando el ADN se inserta en el cromosoma bacteriano, el rótulo está presente en el ADN genómico y puede ser detectado, por ejemplo, mediante amplificación por hibridación a una sonda de oligonucleótido marcada, donde una porción tiene una secuencia complementaria a una porción del rótulo. Los rótulos, las sondas y los métodos de amplificación y de hibridación se describen en Hensel *et al.* (1995) Science 269: 400-403. Se puede generar una pluralidad de mutantes por el método de la invención, donde cada uno tiene el ADN insertado en un gen diferente, y puede ser identificado mediante su rótulo exclusivo. Normalmente, cada ácido nucleico redirector diferente contiene porciones directoras que lo dirigen a un gen distinto del ADN de la célula de la clase *Clostridia*. Se puede introducir una pluralidad de mutantes en un ambiente durante cierto periodo. Luego se pueden recuperar los mutantes del ambiente. La capacidad para detectar los rótulos individuales en el pool de mutantes recuperado da una indicación de si un mutante particular ha podido crecer o sobrevivir, además de otros mutantes. De esta manera, pueden identificarse los genes requeridos para el crecimiento o la supervivencia en el ambiente. Hensel *et al.* (1995; *supra*) usaron un enfoque similar para identificar los genes de virulencia en *Salmonella*.

50 En una modificación del método anterior, se pueden generar, reunir y usar las moléculas de ADN de la invención que tienen el mismo rótulo, pero distintas porciones directoras aleatorizadas del intrón de Grupo II para preparar mutantes bacterianos. Los intrones de Grupo II con porciones directoras aleatorizadas se describen en WO 01/29059. Muchas de las moléculas de ADN pueden ser incapaces de insertarse en cualquier parte del genoma bacteriano. Sin embargo, algunas pueden ser capaces de insertarse en una localización desconocida del genoma bacteriano regido por la secuencia de las porciones directoras. Se puede usar un pool suficientemente grande de moléculas de ADN de la invención en el método, de manera tal que se obtienen una o más colonias en las cuales se ha insertado el ADN en el cromosoma. Se selecciona un único clon. Se puede repetir el proceso para un pool de moléculas de ADN de la invención que tienen un rótulo singular diferente, a fin de obtener otro clon bacteriano mutante único con un rótulo singular. De esta manera, se genera una pluralidad de mutantes bacterianos, cada uno con un rótulo singular. La pluralidad de mutantes se puede exponer a un ambiente tal como se describió antes, a fin de identificar los mutantes particulares comprometidos para el crecimiento o la supervivencia en dicho ambiente. Luego se puede caracterizar un mutante identificado de dicha disposición para determinar el gen en el cual se ha insertado el ADN.

Más adelante se proveen más detalles sobre genes que codifican marcadores seleccionables modificados que contienen un intrón de Grupo I que altera la expresión del marcador seleccionable.

65 El gen de marcador seleccionable o su región codificadora se pueden asociar con regiones de ADN, por ejemplo flanqueadas por regiones de ADN que permiten la remoción del gen de marcador seleccionable o su región

codificadora, después de su incorporación al cromosoma. En consecuencia, se selecciona y manipula un clon de una célula de *Clostridia* mutante que expresa el marcador seleccionable, a fin de permitir la remoción del gen de marcador seleccionable. Se pueden usar recombinasas para remover la región de ADN. Normalmente, las recombinasas reconocen secuencias de ADN particulares que flanquean la región removida. Se prefieren la recombinasa Cre o la recombinasa FLP. Como alternativa, se puede usar una enzima de restricción de corte extremadamente infrecuente para cortar la molécula de ADN en sitios de restricción introducidos en los flancos del gen de marcador seleccionable o su región codificadora. Una enzima de restricción preferida es I-SceI.

Una célula bacteriana mutante de la cual se ha removido el gen de marcador seleccionable retiene la inserción del intrón de Grupo II. En consecuencia, posee el mismo fenotipo debido a la inserción con el gen de marcador seleccionable o sin él. Dicha célula bacteriana mutante puede ser sometida a ulterior mutación por el método de la invención, dado que carece del gen de marcador seleccionable presente en RAM.

Aunque el intrón de Grupo II modificado en la molécula de ADN de la invención no expresa la IERT, de manera conveniente la molécula de ADN contiene en otra localización un gen capaz de expresar la IERT.

Cuando la célula de *Clostridia* en la cual se insertará el intrón de Grupo II utiliza un código genético distinto del intrón de Grupo II y su transcriptasa inversa de Grupo II asociada codificada por el intrón, se prefiere modificar la secuencia de la transcriptasa inversa de Grupo II codificada por el intrón, a fin de comprender codones que correspondan al código genético de la célula huésped.

Una forma de realización de particular interés de la invención es donde el intrón de Grupo II modificado comprende porciones directoras. Normalmente, las porciones directoras permiten la inserción del transcripto de ARN del intrón de Grupo II modificado en un sitio dentro de una molécula de ADN en la célula de *Clostridia*. Normalmente, el sitio es un sitio seleccionado y las porciones directoras del intrón de Grupo II modificado se eligen para estar dirigidas al sitio seleccionado. En una forma de realización de preferencia, el sitio seleccionado está en el ADN cromosómico de la célula de *Clostridia*. Normalmente, el sitio seleccionado se encuentra dentro de un gen particular o dentro de una porción de ADN que afecta la expresión de un gen particular. Normalmente, la inserción del intrón de Grupo II modificado en dicho sitio altera la expresión del gen y produce un cambio en el fenotipo.

Se pueden seleccionar los genes para la mutación con fines de ingeniería metabólica. Por ejemplo, en organismos tales como *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* u otros miembros de la clase *Clostridia* que tienen un metabolismo similar se puede usar la eliminación de lactatodeshidrogenasa y fosfotransacetilasa para prevenir la formación de lactato y acetato, respectivamente, para elevar las concentraciones de etanol (Desai *et al.*, (2004) Appl Microbiol Biotechnol. 65: 600-5). En clostridias solventogénicas tales como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, se pueden realizar eliminaciones específicas en los genes que codifican las enzimas responsables de la producción de solvente y ácidos, como medios para maximizar la acetona y el butanol (véase Jones y Woods (1986) Microbiol. Rev. 50: 484-524). En consecuencia, se pueden generar cepas que solo producen acetona o butanol, por eliminación de las enzimas responsables de la producción de acetato (fosfotransacetilasa y/o acetatocinasa), butirato (fosfotransbutirilasa y/o butiracocinasa), butanol (butanoldeshidrogenasa A y/o butanoldeshidrogenasa B) y/o acetona (acetoacetatodescarboxilasa y/o acetoacetil-CoA-transferasa). Además, se puede ampliar la capacidad fermentativa de tales cepas por adición del gen al cromosoma, a fin de degradar nuevos sustratos (azúcares, lignocelulosa, hemicelulosa, etc.) y/o fabricar nuevos productos finales (isopropanol, 1,3-propanodiol, etc.).

Se pueden seleccionar genes para la mutación a fin de determinar el papel de sus productos codificados en la virulencia, un prerrequisito para el desarrollo de vacunas y otras contramedidas. Por ejemplo, en *C. difficile* aún falta establecer los papeles relativos de la toxina A y la toxina B (CdtA y CdtB) (Bongaerts y Lysterly (1994) Microbial Pathogenesis 17: 1-12) debido a una incapacidad previa para generar mutantes isogénicos. Ciertas cepas (Perelle *et al.* (1994) Infect Immun. 65: 1402-1407) también producen una ADP-ribosiltransferasa CDT específica de actina (CdtA y CdtB). Otros factores contribuyen sin duda a la virulencia, en particular el proceso inicial de colonización. Se ha propuesto la participación de cierto número de productos génicos (Tasteyre *et al.* (2001) Infect Immun 69: 7937-7940; Calabi *et al.* (2002) Infect Immun 70: 5770-5778; Waligora *et al.* (2001) Infect Immun 69: 2144-2153), incluso los involucrados en la adhesión, las proteínas de la capa S (SplA) y la motilidad (FliC y FliD). Hasta ahora no ha sido posible obtener pruebas definitivas sobre la intervención de estos factores en las enfermedades, mediante la generación de mutantes.

Se conocen las secuencias de ADN de los genomas de muchas bacterias de la clase *Clostridia*. Por ejemplo, se conocen las secuencias de ADN de los genomas de *C. acetobutylicum* (ATCC 824 (N.º de acceso a GenBank AE001437), *C. difficile* (N.º de acceso a GenBank AM180355), *C. tetani* E88 (N.º de acceso a GenBank AE015927) y *C. perfringens* cepa 13 (N.º de acceso a GenBank BA000016) y *C. botulinum*. En particular se conoce la secuencia de un genoma de *C. sporogenes* y es muy similar a la secuencia del genoma de *C. botulinum*. A partir de esta información, se identifican rápidamente los sitios de inserción, por ejemplo dentro de marcos de lectura abiertos. Se prefiere que la molécula de ADN de la invención contenga un intrón de Grupo II modificado que contiene porciones directoras dirigidas al transcripto de ARN del intrón de Grupo II modificado (o una copia de su ADN) en un gen del genoma de una de estas especies bacterianas.

Tal como se describió con anterioridad, los intrones de Grupo II contienen naturalmente regiones que dirigen el intrón a una secuencia específica en el ADN objetivo. Dado que, en parte, se reconoce el sitio de reconocimiento del sustrato de ADN mediante el apareamiento de bases con el ARN del intrón de Grupo II removido del complejo de RNP, es posible controlar el sitio de inserción del ácido nucleico dentro del sustrato de ADN. Esto puede hacerse por modificación de la secuencia EBS1, la secuencia EBS2 o la secuencia δ , o sus combinaciones. Dichos intrones de Grupo II modificados producen complejos RNP capaces de escindir los sustratos de ADN e insertar moléculas de ácidos nucleicos en nuevos sitios de reconocimientos en el genoma. Por ejemplo, por referencia al intrón L1.LtrB de Grupo II de *Lactococcus lactis* ilustrado en las Figuras 1A y 1B, se modifican EBS1, EBS2 y δ para permitir el apareamiento de bases del transcrito de ARN del intrón de Grupo II modificado con un sitio objetivo. Las normas para el reconocimiento de sitio del ADN objetivo por parte del intrón L1.LtrB de Grupo II que permite redirigir el intrón a las secuencias de ADN específicas se describen en Mohr *et al.* (2000) *Genes & Development* 14, 559-573. El diseño asistido por computadora de las porciones directoras también se describen en Perutka *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 336, 421-429.

WO 01/29059 de la Fundación de Investigación de la Ohio State University describe un enfoque basado en la selección, en el cual el sitio objetivo de ADN deseado se clona en un vector receptor secuencia arriba respecto de un gen tet^R sin promotor. Los intrones que se insertan en dicho sitio se seleccionan de una biblioteca donante combinatoria que contiene porciones directoras aleatorias (EBS y δ) y secuencias de exón IBS. El intrón L1.LtrB modificado contiene un promotor heterólogo, de manera tal que cuando se inserta en el sitio objetivo del vector receptor, se transcribe el gen tet^R y se puede seleccionar la célula bacteriana que contiene los vectores. Se puede determinar la secuencia del intrón modificado por PCR. En consecuencia, se puede aislar un AND de intrón de Grupo II modificado que permite la inserción en el sitio del ADN objetivo en la célula de *Clostridia*.

En el caso del intrón L1.LtrB de Grupo II, se cree que la interacción de la región δ con una región δ' del ADN objetivo no es esencial para la *retrohoming* eficaz del intrón de Grupo II. Sin embargo, las interacciones entre EBS2 y EBS1 en el ARN del intrón y IBS2 y IBS1 en el ADN objetivo son más importantes.

Cuando el intrón de Grupo II es removido del transcrito de ARN, se cree que se aparea transitoriamente por las bases con porciones del ARN del exón flanqueador. En particular, las regiones EBS2 y EBS1 se aparean por las bases con las regiones IBS2 e IBS1 del exón 5', respectivamente. En consecuencia, se prefiere modificar las regiones IBS2 y IBS1 del exón 5', a fin de promover el apareamiento de bases con las regiones EBS2 y EBS1 modificadas del ARN del intrón. Esto facilita la remoción eficaz del intrón de Grupo II de su transcrito de ARN.

Se puede realizar convenientemente la modificación de los sitios EBS2 y EBS1 δ , y el sitio IBS2 IBS1 mediante cualquiera de los métodos de mutagénesis dirigida a sitio adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida a oligonucleótido o métodos basados en PCR.

Normalmente, la molécula de ADN de la invención es capaz de expresar un marcador de resistencia a antibióticos que es diferente del marcador seleccionable. Por ejemplo, si el gen de marcador seleccionable es un primer gen de resistencia a antibióticos, el ADN incluye un segundo gen de resistencia a antibióticos. Es de particular preferencia que ambos genes de resistencia a antibióticos sean genes que den origen a la resistencia a antibióticos en células de *Clostridia*. Por ejemplo, el gen de marcador seleccionable en la molécula de ADN puede ser un gen de Resistencia a eritromicina y la molécula de ADN también puede contener un gen de resistencia a cloranfenicol (o viceversa). Cuando la molécula de ADN se usa en un *Clostridium* sp., se prefiere en particular seleccionar cualquier gen de resistencia a antibióticos de los genes de resistencia a eritromicina (p.ej., *ermB*) o genes de resistencia a cloranfenicol (p.ej., *catP*).

Se apreciará que si bien es conveniente que la propia molécula de ADN de la invención contenga un gen capaz de expresar la IERT, esto puede ser provisto en una molécula de ADN distinta. En consecuencia, otro aspecto de la descripción provee un kit de partes que comprende una molécula de ADN del primer aspecto de la invención y una molécula de ADN distinta capaz de expresar la IERT. Normalmente, las moléculas de ADN son plásmidos, de preferencia plásmidos compatibles. Se apreciará que el kit también puede contener una molécula de ADN (normalmente un plásmido) capaz de expresar la proteína de represor *lac*. Esto es útil en la situación en que la molécula de ADN de la invención comprende un promotor inducible por IPTG que esté ligado operativamente al intrón de Grupo II, pero cuando la molécula de ADN de la invención no incluye el gen *lacI*.

Un tercer aspecto de la invención provee un método para introducir una molécula de ácido nucleico en un sitio de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, donde el método comprende las etapas de:

(i) proveer una célula bacteriana de la clase *Clostridia* con la molécula de ADN de la invención y una molécula de ADN capaz de expresar una transcriptasa inversa Grupo II codificada por el intrón; y

(ii) cultivar la célula bacteriana en condiciones que permiten la remoción del intrón de Grupo I del transcrito de ARN del intrón de Grupo II modificado y la inserción de dicho transcrito de ARN que contiene el gen de marcador seleccionable (o una copia de su ADN) en dicho sitio.

De preferencia, la célula bacteriana de la clase *Clostridia* es cultivada en condiciones que permiten la expresión del marcador seleccionable. Normalmente, se selecciona la célula bacteriana del orden *Clostridia* en la cual se ha

introducido un ácido nucleico en un sitio de una molécula de ADN dentro de la célula (es decir, una célula mutada) sobre la base de un fenotipo alterado conferido por el marcador seleccionable.

5 Convenientemente, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a antibióticos y se selecciona la célula de *Clostridia* mutada sobre la base de su capacidad para crecer en presencia del antibiótico pertinente.

10 Otro aspecto de la invención provee un método para dirigir una molécula de ácido nucleico a un sitio seleccionado de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, donde el método comprende proveer una célula bacteriana de la clase *Clostridia* con una molécula de ADN de la invención, en la cual el intrón de Grupo II modificado comprende porciones directoras y una molécula de ADN capaz de expresar una transcriptasa inversa de Grupo II codificada por el intrón; y cultivar la célula bacteriana en condiciones que permiten la remoción del intrón de Grupo I del transcripto de ARN del intrón de Grupo II modificado y la inserción de dicho transcripto de ARN (o copia de su ADN) que contiene el gen de marcador seleccionable en dicho sitio seleccionado.

15 Se apreciará que de esta manera es posible efectuar mutaciones dirigidas a sitio en el ADN (tal como el genoma) de una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, tal como *Clostridium* spp.

20 Las células bacterianas mutantes de la clase *Clostridia* obtenidas por los métodos de la invención también son parte de la invención.

25 Se apreciará que con respecto a todos los aspectos de la invención se prefiere que la célula bacteriana de la clase *Clostridia* es un *Clostridium* spp. Es de particular preferencia cuando la célula de *Clostridia* es *C. thermocellum* o *C. acetobutylicum* o *C. difficile* o *C. botulinum* o *C. perfringens* o *C. sporogenes* o *C. beijerinckii* o *C. tetani* o *C. cellulyticum* o *C. septicum*. Como alternativa, la célula de *Clostridia* puede ser *Thermoanaerobacteria saccharolyticum*, una especie importante para la producción industrial de etanol. En el término "*Clostridia*" también incluimos *Roseburia*, tal como *Roseburia intestinalis*, una bacteria probiótica. Por lo tanto, de preferencia, el gen de marcador seleccionable en la molécula de ADN de la invención es un gen que se puede usar para la selección en estas especies. También de preferencia, las moléculas de ADN de la invención contienen orígenes de replicación y cualquier gen de replicación necesario que permitirá la replicación en estas especies bacterianas.

30 Una característica particular de la invención es que el gen de marcador seleccionable modificado es un gen que contiene un intrón de Grupo I que altera la expresión del marcador seleccionable. El marcador seleccionable es un marcador que se puede expresar y usar en la selección en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, en particular una célula de *Clostridium*.

35 Es de particular preferencia que el marcador seleccionable sea un gen de resistencia a antibióticos que se pueda usar para la selección en un *Clostridium* spp.

40 Otro aspecto de la invención provee una molécula de ADN, tal como un plásmido, que comprende un gen de resistencia modificada que contiene un intrón de Grupo I situado en la orientación inversa respecto del gen de resistencia modificada que altera la expresión de la resistencia, donde cuando se transcribe el intrón de Grupo I es capaz de autoextraerse del transcripto de ARN, y donde la resistencia es resistencia a eritromicina.

45 También se describe una molécula de ADN que comprende un gen de resistencia a eritromicina modificado que contiene un intrón de Grupo I.

También se describe una molécula de ADN que comprende un gen de resistencia a cloranfenicol modificado que contiene un intrón de Grupo I.

50 También se describe una molécula de ADN que comprende un gen de resistencia a tetraciclinas modificado que contiene un intrón de Grupo I.

También se describe una molécula de ADN que comprende un gen de resistencia a espectinomicina modificado que contiene un intrón de Grupo I.

55 La descripción también incluye estas moléculas de ADN presentes en una célula huésped, por ejemplo una célula de *E. coli* o una célula de la clase *Clostridia*.

60 El intrón de Grupo I puede estar presente en cualquier parte dentro del gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo dentro de la región codificadora, para así alterar la traducción, o secuencia arriba de la región codificadora para así alterar la transcripción o la traducción.

65 El intrón de Grupo I está presente en el gen de resistencia a antibióticos en una forma por la cual el intrón que se transcribe es capaz de autoextraerse (ensamblado) del transcripto de ARN.

Cualquier ARN autocatalítico que pueda autoensamblarse de un ARN más grande en una forma dependiente de la orientación podría sustituir un intrón de Grupo I en la presente invención. De manera adecuada, se puede usar un "IStrón", que según se cree es una fusión de un intrón de Grupo I y un elemento IS (Haselmayer et al. (2004) *Anaerobe* 10: 85-92; Braun et al. (2000) *Mol. Microbiol.* 36: 1447-1459).

5 Para evitar dudas, a los fines de todos los aspectos de la invención, cualquier ARN autocatalítico que pueda autoempalmarse para salir de un ARN más grande en forma dependiente de la orientación es considerado un intrón de Grupo I, ya sea que requiera o no factores auxiliares. De preferencia, el intrón de Grupo I no requiere factores auxiliares.

10 Se prefiere que el intrón de Grupo I no codifique una proteína codificada por el intrón, tal como una transcriptasa inversa codificada por el intrón. Esta característica previene la reinserción del ARN removido del intrón de Grupo I en otro sitio dentro del genoma bacteriano.

15 Se observa que, normalmente, el empalme del intrones de Grupo I (tales como el intrón *td* del fago T4) depende de secuencias de exones que flanquean el punto de inserción. En consecuencia, los genes de marcadores seleccionables modificados (y en particular los genes de resistencia a antibióticos modificados que codifican la resistencia a eritromicina y la resistencia a cloranfenicol y la resistencia a tetraciclinas y la resistencia a espectinomomicina) contienen el intrón de Grupo I insertado en una posición donde está flanqueado por secuencias de exones adecuadas que permiten que el intrón de Grupo I salga por ensamblado del transcripto de ARN y donde el transcripto ensamblado resultante (o su copia de ADN) codifique un marcador seleccionable funcional (tal como la resistencia funcional a eritromicina o la resistencia funcional a cloranfenicol). Se conocen secuencias flanqueadoras adecuadas para los intrones de Grupo I. Por ejemplo, para el intrón de Grupo I *td* de fago T4, normalmente el intrón está precedido por un residuo G (es decir, presente en 5' del intrón) y normalmente el intrón es seguido por la secuencia 5'-ACCCAAGAGA-3' (SEQ ID N.º 3)(es decir, presente en 3' del intrón). Como alternativa, el intrón puede estar seguido por la secuencia 5'-ACCCAAGAA-3' (SEQ ID N.º 4).

25 En una forma de realización de preferencia de la invención, la región codificadora del marcador seleccionable (tal como lo genes de Resistencia a eritromicina o cloranfenicol o tetraciclinas o espectinomomicina) contiene secuencias adecuadas que flanquean e intrón. En relación con el intrón *td*, y la secuencia flanqueadora combinada 5' y 3' 5'-GACCCAAGAGA-3' (SEQ ID N.º 5) es capaz de codificar varias secuencias de aminoácidos según el marco de lectura (tal como se explica con mayor detalle en los ejemplos).

30 En el Marco 1, codifica secuencia de aminoácidos DPRD/E (SEQ ID N.º 6); en el Marco 2, codifica la secuencia de aminoácidos R/GPKR (SEQ ID N.º 7) y en el Marco 3 codifica la secuencia de aminoácidos "X"TQE"Z" (SEQ ID N.º 8) donde X puede ser cualquiera de G, E, A, V, L, S, W, P, Q, R, M, T o K, y "Z" puede ser cualquiera de K, S, R, I, M, T o N.

En consecuencia, en una forma de realización de preferencia, la región codificadora del gen de marcador seleccionable codifica una porción de péptido con la secuencia de aminoácidos anterior.

40 En otra forma de realización de preferencia, la secuencia de exón 3' del intrón está presente en un marco de lectura apropiado en el extremo 5' de la secuencia codificadora del marcador seleccionable de manera tal que, en ausencia del intrón, la secuencia codificadora codifica un marcador seleccionable funcional que contiene un péptido ligador en la terminal N del polipéptido del marcador seleccionable.

45 El péptido ligador es normalmente un péptido de 4 a 20, de preferencia 4 a 15, normalmente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos, una porción de los cuales puede ser codificado por las secuencias codificadoras de exones que flanquean el intrón. La presencia del péptido ligador no interfiere sustancialmente con la actividad de resistencia a antibióticos. En otras palabras, el polipéptido producido de la expresión de la molécula de ácido nucleico producido cuando se ha removido el intrón de Grupo I tiene actividad de resistencia a antibióticos.

50 Como alternativa, la secuencia flanqueadora del intrón de Grupo I se puede disponer de manera tal que la inserción del intrón de Grupo I altera la transcripción del gen de marcador seleccionable. Por ejemplo, puede estar situado entre los elementos -35 y -10 del promotor.

55 En otra alternativa, la secuencia flanqueadora del intrón de Grupo I se puede disponer de manera tal que la inserción del intrón de Grupo I altera la transcripción del gen de marcador seleccionable. Por ejemplo, puede estar situado entre el sitio de fijación del ribosoma y el codón de inicio.

60 Se puede apreciar que se pueden preparar las moléculas de ADN de la invención mediante técnicas estándar de biología molecular tal como se describe en Sambrook et al., "Molecular cloning: A laboratory manual", 2001, 3° edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

A continuación, se describirá la invención con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes.

65 **Figura 1. A: Modelo de estructura secundaria del intrón de Grupo II L1.LtrB.** La estructura secundaria predicha consiste de seis dominios (I-VI). Las interacciones EBS2/IBS2, EBS1/IBS1 y δ - δ' entre el intrón y los exones

flanqueadores en el ARN precursor no ensamblado están indicadas con líneas interrumpidas. En el intrón L1.LtrB no modificado, el marco de lectura abierto que codifica la proteína LtrA está presente en el bucle no estructural indicado como dominio IV. **B: Mecanismo de reconocimiento del sitio objetivo de ADN del intrón de Grupo II L1.LtrB.** La proteína LtrA se fija al ARN del intrón de Grupo II L1.LtrB para formar un complejo de ribonucleoproteína. El intrón se extrae por ensamblado del pre-mARN y libera la ribonucleoproteína como una partícula. La partícula de ribonucleoproteína sitúa secuencias de ADN objetivo dentro de la célula. La secuencia de AND objetivo de la ribonucleoproteína no modificada es una copia sin intrón del gen *ltrB*, cuya secuencia se presenta (SEQ ID N.º 9). El ARN del intrón se inserta dentro del sitio de inserción en la cadena superior (IS). Luego se escinde la cadena inferior en el sitio de escisión (CS) y LtrA se ceba en el ADN cortado y transcribe en reversa el ARN del intrón. Las actividades de reparación del huésped completan el proceso de integración. El reconocimiento del objetivo es mediado por una combinación de interacciones entre LtrA y nucleótidos de la secuencia objetivo, y entre EBS2 y EBS1 en el ARN del intrón y las secuencias complementarias IBS2 e IBS1 en la secuencia objetivo. Los nucleótidos más importantes reconocidos por la proteína LtrA se indican con sombreado gris.

15 **Figura 2. Selección positiva de mutantes redirectores derivados de ácidos nucleicos. A.** La transcripción del gen de marcador seleccionable proveniente del ácido nucleico redirector situado en un plásmido no da por resultado una resistencia, dado que el mARN producido retiene la inserción del intrón de Grupo I *td* y por lo tanto se altera la expresión del gen de marcador seleccionable. El elemento *td* no se extrae por empalme del mARN, dado que ha sido transcript en la orientación equivocada. **B.** La producción de ARN del intrón de Grupo II L1.LtrA es inducida por la adición de IPTG, que causa la transcripción del promotor *fac* de *Clostridia*. El intrón de Grupo I *td* dentro del gen de marcador seleccionable se transcribe en la orientación correcta y el ARN *td* se extrae por empalme del ARN producido. **C.** El ARN L1.LtrA y el gen de marcador seleccionable se insertan en el sitio objetivo del cromosoma. El gen de marcador seleccionable no contiene el intrón de Grupo I *td* y en consecuencia no se altera la expresión del gen de marcador seleccionable. En consecuencia, las células exhiben el fenotipo asociado con la expresión del marcador seleccionable, y puede ser seleccionado en consecuencia.

20 **Figura 3. Expresión inducible de pMTL5401Fcat en *C. sporogenes* y *C. acetobutylicum*.** (a) El plásmido de lanzadera de *E. coli/Clostridium* pMTL5401Fcat. (b) Se cultivó un clon de *C. sporogenes* o (c) *C. acetobutylicum* que contiene pMTL5401Fcat hasta la fase de crecimiento exponencial temprana y la actividad de CAT en lisados celulares monitoreados después de la inducción con IPTG 1 mM (■) o sin inducción (▲).

30 **Figura 4. Secuencias adecuadas para un gen de marcador seleccionable por empalme exitoso del intrón de Grupo I *td*.** Las secuencias de aminoácidos requeridas (SEQ ID N.º 6-8, en cualquiera de los tres marcos de lectura de traducción se muestran por encima de las secuencias de nucleótidos (SEQ ID N.º 132-134). Los aminoácidos en la posición 'X', podrían ser G, E, A, V, L, S, W, P, Q, R, M, T o K. En la posición 'Z', podrían ser K, S, R, I, M, T o N.

35 **Figura 5. Funcionalidad de RAM agregada al gen *ermB* mediante el uso de un ligador.** (a) Se inserta un ligador que contiene el intrón *td* y sus exones entre el ORF *ermB* y su promotor (SEQ ID N.º 10), que impide la expresión de resistencia a eritromicina. La extracción por empalme del intrón *td* de la cadena inversa produce un gen *ermB* modificado (SEQ ID N.º 11) que codifica una proteína funcional con 12 aminoácidos adicionales en su terminal N (SEQ ID N.º 12). El promotor *ermB* de ErmBtdRAM1 es reemplazado por el promotor *thl* en ErmBtdRAM2. (b) PCR utilizando diversas moldes y cebadores ErmB-Pro-F3 y ErmB-R1, que flanquean el intrón *td* en ErmBtdRAM1. Carril 1: ADN de ErmBtdRAM1; Carril 2: ADN de ErmBtdRAM1 SE; Carril 3: cDNA sintetizado de ARN aislado de células que contienen pMTL20lacZTTErmBtdRAM1 después de la inducción de IPTG; Carril 4: la misma preparación de ARN antes de la síntesis de cADN. (c) PCR utilizando diversas moldes y cebadores Thio-F1 y ErmB-R1, que flanquean el intrón *td* en ErmBtdRAM2. Carril 1: ADN genómico mutante *spo0A* de *C. sporogenes*; Carril 2: AND de plásmido pMTL007::Csp-*spo0A*-249s; Carril 3: ADN genómico de *C. sporogenes* de tipo silvestre; Carril 4: agua.

45 **Figura 6. Características y secuencia de ErmBtdRAM1**
50 Secuencia ErmBtdRAM1 (SEQ ID N.º 13)

Figura 7. Evidencia directa del empalme de ErmBtd RAM1 en *E. coli*. Para analizar si el intrón de Grupo II *td* había sido empalmado de ErmBtdRAM1 tras la inducción de la expresión del ARN del intrón de Grupo II, se preparó ARN a partir de células que expresan pMTL20lacZTTErmBtdRAM1. Se realizó RT-PCR usando cebadores que flanquean el sitio de inserción de *td*. En reacciones de control, se usaron los mismos cebadores para amplificar ErmBtdRAM1 y los equivalentes ensamblados SE ADN por PCR. Carril 1: marcadores de ADN; Carril 2, PCR de ErmBtd RAM1; Carril 3, PCR de ErmBtd RAM1 SE; Carril 4, RT-PCR sobre el ARN total proveniente de células que contienen pMTL20lacZTTErmBtdRAM1, y; Carril 5 control negativo de RT-PCR.

60 **Figura 8. Construcción de un sitio de multiclonación en pBRR3**
Secuencias de los sitios de clonación de pBRR3-LtrB (SEQ ID N.º 14) y plásmidos pCR2.1-TOPO (SEQ ID N.º 15). El fragmento de sitio de multiclonación presentado (SEQ ID N.º 16) se insertó dentro de un pBRR3-LtrB escindido para preparar el pBRR3-MCS1 mostrado (SEQ ID N.º 17), que contiene los sitios de restricción hallados en el plásmido pCR2.1-TOPO.

65 **Figura 9. Secuencias de los promotores *thl* y *thl2***

Las secuencias de los promotores *thl* (SEQ ID N.º 18) y *thl2* (SEQ ID N.º 19) se muestran en comparación con un promotor de consenso (SEQ ID N.º 20). "x" indica una sustitución de nucleótido comparada con la secuencia de consenso. Para cada secuencia se indica el espaciado entre los elementos -10 y -35.

5 **Figura 10. Características y secuencia de ErmBtdRAM2**

Secuencia ErmBtdRAM2 (SEQ ID N.º 21)

Figura 11. Características y secuencia de pMTL007

10 Mapa de plásmido del sistema de redirección final de *Clostridia* (el ejemplo ilustrado es un derivado modificado para redirigir *lacZ*) y secuencia (SEQ ID N.º 22)

Figura 12. Construcción de pMTL5401F

15 Se indican los sitios de restricción en cada etapa. Se realizó el recorte de extremos de ADN mediante el uso de ADNpolimerasa de T4.

Figura 13. Construcción de pMTL5402F y pMTL5402F-lacZTTErmBtdRAM1 Se indican los sitios de restricción en cada etapa. Se realizó el recorte de extremos de ADN mediante el uso de ADNpolimerasa de T4.

Figura 14. Construcción de pMTL007

20 Se indican los sitios de restricción en cada etapa.

Figura 15. Ejemplos de estudio y caracterización de mutantes. (a) Plásmido pMTL007. (b, c) Se usó PCR para estudiar inicialmente la presencia de la inserción del intrón en el gen *spo0A* de *C. difficile* mediante el uso del cebador EBS Universal específico de intrón y el cebador Cd-*spo0A*-R2 específico de gen (flechas pequeñas). Carril 1: agua; Carril 2: AND genómico de cepa parental de *C. difficile*; Carril 3: ADN de plásmido pMTL007::Cdi-*spo0A*178a; Carriles 4-6: ADN de tres clones de Em^R de *C. difficile* seleccionados al azar, generados mediante el uso de pMTL007::Cdi-*spo0A*-178a. (d) Estudios de Southern blot de los mutantes *spo0A* y *pyF* de *C. difficile* mediante el uso de una sonda para *ermB*. La hibridación de esta sonda de ORF *ermB* cromosómico preexistente (no funcional) produce una segunda banda, visible también en los carriles parentales. En el digesto de *EcoRV* del mutante *spo0A*, ambas bandas tienen tamaño similar. (e) Estudio de Southern blot equivalentes para *C. acetobutylicum* y (f) *C. sporogenes*.

Figura 16. Los mutantes *spo0A* no forman esporas. Micrografías de contraste de fase de los mutantes *spo0A* y cepas parentales de *C. difficile*, *C. acetobutylicum* y *C. sporogenes* cultivadas en medio sólido durante 14 días, 4 días o 3 días, respectivamente. Las frecuencias medias de esporulación de tres experimentos distintos se muestran en porcentajes.

Ejemplo 1: Desarrollo de un promotor 'fac' inducible por IPTG

40 Previamente se describió el uso de un vector de lanzadera de *E. coli/Clostridium* (pMTL540F) portador del promotor artificial '*fac*'. Se derivó por inserción del operador del operón *lacZ* de *E. coli* inmediatamente secuencia abajo del promotor del gen de ferredoxina de *C. pasteurianum* (Fox et al. (1996) Gene Ther. 3: 173-178). Si bien se usó este elemento promotor para dirigir el elevado nivel de expresión de genes heterólogos en clostridias, no se ha demostrado la transcripción regulada. En consecuencia, se construyó un nuevo vector de lanzadera pMTL5401F de *E. coli/Clostridium* con el promotor *fac*, un gen represor *lacI* bajo el control de transcripción del promotor del gen de fosfotransbutirilasa (*ptb*) de *C. acetobutylicum* y la región *oriT* del plásmido RK2, a fin de facilitar la transferencia conjugativa a *C. sporogenes*, *C. botulinum* y *C. difficile*. Para estudiar pMTL5401F, se insertó una copia sin promotor del gen *pC194 cat*, de manera tal que su transcripción estaba bajo el control del promotor *fac* en el plásmido resultante, pMTL5401Fcat (Figura 3). Luego analizamos la actividad de enzima del producto del gen *cat* en los lisados de células de *C. sporogenes* o *C. acetobutylicum* portadores de pMTL5401Fcat, cultivadas en presencia o ausencia del IPTG exógeno. Se observó inducción en ambos microorganismos, pero mientras era evidente la fuerte represión de la transcripción en *C. sporogenes* en ausencia de de IPTG (Figura 3), se observó un significativo nivel basal de expresión en *C. acetobutylicum* (Figura 3). Si bien se podía introducir pMTL5401F en *C. difficile*, el replicón pCB102 funciona con relativa ineficacia en este huésped de *Clostridia* (Purdy et al. (2002) Mol. Microbiol. 46: 439-452) y no puede sostener el crecimiento de sus transconjugantes en cultivo líquido suplementado con antibióticos. Por lo tanto, no se podía realizar un experimento de inducción equivalente.

Ejemplo 2: Desarrollo de ErmBtd como marcador seleccionable para Clostridia

60 El empalme del intrón de grupo I *td* depende de las secuencias de exones que flanquean el unto de inserción. El sitio objetivo reconocido por el intrón de grupo *td* de fago T4 es 5'-GACCCAAGAA-3' (SEQ ID N.º 23) y el intrón se inserta después del 'G' inicial. Sin embargo, el intrón de grupo I *td* también se inserta en el sitio 5'-GACCCAAGAGA-3' (SEQ ID N.º 5) (Sistema de *Knockout* génico TargeTron™ de Sigma Aldrich). Se evaluaron las secuencias de genes de antibióticos de uso actual respecto de la presencia de estas secuencias, pero no se identificaron genes que incorporaran cualquiera de estas secuencias. Si estaba presente el sitio de empalme 5'-GACCCAAGAGA-3' (SEQ ID N.º 5) en una región codificadora de proteína, la secuencia de aminoácidos que codificaría dependería de su marco de lectura. En la Figura 4 se muestran las secuencias de aminoácidos (correspondientes a los tres marcos posibles) que pueden ser

codificadas por el sitio de empalme. El análisis de las secuencias de proteína de todas las proteínas conocidas por conferir resistencia en *Clostridia* no pudieron identificar una proteína candidata que contiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos de interés.

5 En consecuencia, se obtuvo por ingeniería un gen que codifica un marcador seleccionable, de manera tal que contenía un sitio de inserción para el intrón de grupo I *td*. Esto se hizo para formar la base de un RAM de *Clostridia*. Se eligió el gen nativo *ermB* del plásmido pAMβ1 de *Enterococcus faecalis*, que confiere resistencia a eritromicina, como el gen de marcador seleccionable, dado que este gen ha tenido amplio uso en la construcción de vectores de lanzadera de *E. coli*/*Clostridium* (Dürre, P. Handbook on Clostridia. 2005. Taylor y Francis, CRC Press.)

10 Se diseñó una secuencia ligadora que contenía el sitio de empalme requerido, y se fusionó con el extremo 5' de la región codificadora del gen *ermB*, lo que prolongó efectivamente el terminal N de la proteína en 12 aminoácidos (Figura 5). En el diseño de esta secuencia, se eligió el marco de lectura que tenía aminoácidos codificados tan inertes como fuera posible y solubles, a fin de minimizar el riesgo de afectar la función de la proteína ErmB. El marco 1 (DPRD; SEQ ID N.º 6) fue la mejor opción, dado que incluye tres residuos cargados (Asp -ve, Arg +ve) que debería favorecer la solubilidad. Se esperaba que la mezcla de cargas podría contribuir a prevenir una fuerte interacción con el resto de la proteína. El resto del ligador se componía de los pequeños residuos inertes Gly y Ala, con un único Ser para evitar una larga porción de residuos hidrofóbicos que podrían reducir la solubilidad de la proteína. Además, la secuencia de nucleótidos elegida incorpora el uso de codón de *Clostridia*, a fin de minimizar cualquier posible problema de expresión.

20 Se ensamblaron dos constructos mediante el uso de SOEing PCR tal como se describe más adelante, mediante el uso de los cebadores de oligonucleótido indicados en la Tabla 1 siguiente. El *ErmBtd* RAM1 (el gen *ermB* modificado que contiene el intrón *td* insertado en el sitio indicado en la Fig. 6 (SEQ ID N.º 13), y el equivalente empalmado (SE), donde el intrón *td* está ausente. Se clonaron *ErmBtd*RAM1 y *ErmBtd*RAM1 SE en el plásmido de alto nivel de copias pMTL5402F en la orientación opuesta al promotor *fac* (por lo que cualquier resistencia conferida se debe al promotor RAM o al propio promotor de SE).

Tabla 1: Cebadores de oligonucleótidos

Cebador	Secuencia (5' -3')	SEQ ID N.º
ErmB-Pro-F3	CTACGCGTGGAAATAAGACTTAGAAGCAA ACTTAAGAGTGTG	24
ErmB-Pro-RA	CAGAAGCACCAGCATCTCTTGGGTCCATGT AATCACTCCTTCTTAATTACAAATTTTAGC ATC	25
linker1-ErmB-F1	ACCCAAGAGATGCTGGTGCTTCTGGTGCTG GTATGAACAAAAATATAAAATATTCTCAA AACTTTTAAACGAGTG	26
ErmB-R1	GAACGCGTGCGACTCATAGAATTATTCCT CCCG	27
ErmB-Pro-RB	GGGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACAT AATGCCATGTAATCACTCCTTCTTAATTAC AAATTTTATGCATC	28
tdGpl-F1	GCATTATGTTTCAGATAAGGTCGTTAATCTT ACCCC	29
tdCrpl-R1	CCAGAAGCACCAGCATCTCTTGGGTTAATT GAGGCCTGAGTATAAG	30
Thio-F1	CTACTAGTACGCGTTATATTGATAAAAATA ATAATAGTGGG	31
Thio-R-RAM	CCTTATCTGAACATAATGCCATATGAATCC CTCCTAATTTATACGTTTCTC	32

30 Se preparó *ErmBtd*RAM1 SE como sigue. El promotor *ermB* se amplificó por PCR a partir de pMTL5402F mediante el uso de los cebadores ErmB-Pro-F3 y ErmB-Pro-RA. Se amplificó ORF *ermB* por PCR a partir de pMTL5402F mediante el uso de los cebadores linker1-ErmB- F1 y ErmB-R1. Los productos de PCR fueron purificados mediante gel y usados como moldes en un SOEing PCR mediante el uso de los cebadores externos ErmB-Pro-F3 y ErmB-R1. El producto de PCR que codifica *ErmBtd*RAM1 SE se clonó en pCR2.1-TOPO. Se removió *ErmBtd*RAM1 SE de pCR2.1::*ErmBtd*RAM1SE como un fragmento *HindIII/XhoI* y se ligó en pMTL5402F linearizado con las mismas enzimas. Esto colocó *ErmBtd*RAM1 SE en la orientación opuesta al promotor *fac* sobre el plásmido resultante pMTL5402F::*ErmBtd*RAM1SE.

40 Se preparó el constructo *ErmBtd*RAM1 como sigue. Se amplificó el promotor *ermB* por PCR a partir de pMTL5402F mediante el uso de los cebadores ErmB-Pro-F3 y ErmB-Pro-RB. Se amplificó el ORF *ermB* por PCR a partir de

pMTL5402F mediante el uso de los cebadores linker1-ErmB-F1 y ErmB-R1. Se amplificaron por PCR el intrón de Grupo I *td* atenuado y sus exones a partir de pACD4K-C, mediante el uso de los cebadores tdGpl-F1 y tdGpl-R1. Los productos de PCR fueron purificados por gel y usados como moldes en un SOEing PCR de tres vías que utiliza los cebadores externos ErmB-Pro-F3 y ErmB-R1. El producto de PCR que codifica ErmBtdRAM1 fue incorporado por clonación en pCR2.1-TOPO. Se removió ErmBtdRAM1 de pCR2.1::ErmBtdRAM1 como un fragmento *HindIII/XhoI* y se ligó en pMTL5402F linearizado con las mismas enzimas.

E. coli portador de pMTL5402F::ErmBtdRAM1 era sensible a eritromicina de 500 y 125 mg/ml (sin crecimiento durante la noche a 37°C). *E. coli* portador de pMTL5402F::ErmBtdRAM1SE era resistente a eritromicina de 500 y 125 mg/ml (creció durante la noche a 37°C). Estos experimentos demostraron que el gen *ermB* modificado confirió resistencia a eritromicina en *E. coli*, e igualmente importante, que la inserción de *td* inactiva el gen.

Ejemplo 3: Validación del marcador seleccionable ErmBtd en *E. coli*

El componente de ácido nucleico redirector de pACD4K-C fue subclonado como un fragmento *NaeI* (recortado) en pMTL20 (Chambers *et al.* (1988) Gene 68: 139-149) entre los sitios *HindIII* y *SmaI*, y la región redirectora *lacZ* nuevamente mostró capacidad para *knock-out* el gen *lacZ* en el huésped *E. coli* HMS174(DE3). A continuación, se reemplazó KanRAM en pMTL20lacZTT por ErmBtd RAM1 como fragmento *MluI*. Para analizar si el intrón de Grupo I *td* era empalmado de ErmBtd RAM1 después de inducir la expresión del ARN del intrón de Grupo II, se recolectaron las células de *E. coli* portadoras de pMTL20lacZTTErmBtdRAM1 y se preparó el ARN. Luego se realizaron reacciones RT-PCR mediante el uso de cebadores que flanquean el sitio de inserción de *td*. Como control, se realizó PCR estándar en ErmBtd RAM1 y ErmBtd RAM1 SE (el equivalente empalmado de ErmBtd RAM1). Tal como se observa en la Figura 7, el producto predominante obtenido de las muestras de ARN inducidas por IPTG era del menor tamaño correspondiente al gen SE. Esto demuestra con claridad que *td* se empalma a partir del ARN del gen de *ermB* modificado en ErmBtd RAM1.

A pesar del hecho de que se demostró que ocurría empalme de ErmBtd RAM1, no se obtuvieron colonias resistentes a eritromicina después de sembrar las células inducidas por IPTG en medio de agar suplementado con 500, 250 o 125 mg/mL de eritromicina. No fue posible reducir aún más la concentración de antibiótico, dado que *E. coli* es naturalmente resistente a concentraciones inferiores del antibiótico.

La imposibilidad de obtener colonias resistentes a eritromicina puede haberse debido a un efecto de cantidad de copias. En consecuencia, una única copia insertada en el genoma puede haber sido insuficiente para generar resistencia al antibiótico por encima del bajo nivel habitual de resistencia inherente a *E. coli* de tipo silvestre. Para analizar esta posibilidad, se ligó un fragmento de AND portador de ErmBtdRAM1 SE al pACYC184 escindido, y la mezcla de ligadura fue transformada en *E. coli* y se sembró en 2YT que contiene tetraciclina o eritromicina en tres concentraciones diferentes, 500, 250 y 125 mg/mL. Crecieron cantidades de colonias similares en Erm125 y Tet, pero crecieron varias veces menos en Erm250, y solo unas pocas crecieron en Erm500. Este experimento de control fijó los límites prácticos para el análisis de la herencia de ErmBtdRAM1 SE cuando está presente en pACYC184 como 125 mg/mL.

Una vez establecida la concentración de eritromicina necesaria para analizar ErmBtdRAM1 SE en *E. coli*, se amplificó por PCR una región de *lacZ* que abarca la región directora con los cebadores *lacZ* dirigido a F (ACGAATTCCGGATAATGCGAACAGC-GCACGG; SEQ ID N.º 33) y *lacZ* dirigido a R (TGCGATCGCACCGCCGACGGCAGCTGATTG; SEQ ID N.º 34), clonado en pCR2.1TOPO, y luego se subclonó en pACYC184, que está presente en varias copias de la célula de *E. coli*. Luego se repitió el experimento de redireccionamiento mediante la introducción de pMTL20lacZTTErmBtdRAM1 en células de *E. coli* portadoras de pACYC184::lacZ. Después de la inducción con IPTG, se sembraron las células en medio que contenía eritromicina. En contraste con el experimento previo, se obtuvieron cantidades apreciables de colonias resistentes. El uso de cebadores apropiados en un PCR diagnóstico confirmó que había tenido lugar el redireccionamiento del intrón de Grupo II hacia el gen *lacZ* en pACYC184. Por lo tanto, cuando ErmBtdRAM1 SE está presente como única copia, la expresión de ErmB es insuficiente para conferir resistencia a eritromicina, pero cuando está presente en múltiples copias, se expresa ErmB en cantidad suficiente para conferir el fenotipo resistente.

Ejemplo 4: Construcción de un sistema de redireccionamiento a *Clostridia* mediante el uso del marcador seleccionable ErmBtd

Una vez establecido que ErmBtdRAM1 podría sustituir el KanRAM en el intrón de Grupo II de Sigma-Aldrich, se subclonó todo el elemento, junto con la región redirigida para *lacZ*, a partir de pMTL20lacZTTErmBtdRAM1 (como fragmentos *HindIII/SacI* y *SacI/NheI*) en el vector de expresión de *Clostridia* pMTL5402F (escindido con *HindIII-NheI*) para obtener pMTL5402FlacZTTErmBtdRAM1. En consecuencia, la expresión del intrón de Grupo II estaba bajo el control del promotor *fac*. La expresión del intrón de Grupo II será regulada por IPTG.

Se estudió la capacidad de este vector para redirigir el gen *lacZ* en pACYC184::lacZ en *E. coli*. Después de la inducción por IPTG y el sembrado sobre eritromicina, se demostró el éxito del redireccionamiento.

Ejemplo 5: Determinación de la eficacia de ErmBtdRAM1 en redireccionamiento de intrón de Grupo II

Para evaluar si ErmBtdRAM1 afecta la frecuencia con la cual se puede redirigir el intrón de Grupo II, comparado con KanRAM, realizamos algunos ensayos de movilidad mediante el uso de un sistema de dos plásmidos desarrollado por Karberg *et al.* (2001, *supra*). El redireccionamiento del intrón de Grupo II a partir de pACD2, después de la inducción por IPTG, hacia pBRR3-LtrB (que porta su objetivo natural, LtrB) da por resultado la activación del gen *Tet* en este último plásmido. En consecuencia, se pueden detectar eventos de redireccionamiento individuales sobre la base de la adquisición de resistencia a tetraciclinas.

En consecuencia, se modificó el plásmido pACD2 por la inserción de ErmBtdRAM1 o de KanRAM en el sitio *MluI* singular del vector. Después, estos dos fueron transformados en células HMS174(DE3) que contienen pBRR3-LtrB, es decir, el plásmido receptor con la secuencia objetivo de tipo silvestre. Después de la selección del plásmido donante, se indujeron las células con IPTG 500 mM durante 1 h, se resuspendieron en LB, se dejaron recuperar durante 1 h, y luego se sembraron varias diluciones en diversas placas selectoras. Para estos constructos que contienen un RAM, primero se resembraron colonias Tet^R en placas Tet y después nuevamente en placas que contienen el antibiótico apropiado para analizar el empalme de RAM. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

El presente experimento demostró que KanRAM y ErmBtdRAM1 tienen un efecto similar sobre la eficacia del intrón, posiblemente debido al mayor tamaño del intrón. Es importante destacar que los datos indicaron que ambos RAM se empalman con eficacias similares.

Tabla 2: Resultados de ensayos de movilidad

Plásmido donante	Resultados	
	Eficacia de movilidad del intrón*	Eficacia de empalme de RAM†
pACD2 (ninguno)	~10 ⁰	N/D
pACD2::KanRAM	~10 ⁻³	18/20
pACD2::ErmBtdRAM	~10 ⁻³	18/20

*Eficacia de movilidad de intrón = colonias Tet^R/colonias Amp^R Cm^R
 †Eficacia de empalme de RAM = colonias Tet^R resembradas en Kan^R o Erm^R/todas las colonias Tet^R resembradas

El empalme de ninguno de los RAM pudo ser detectado por resistencia a antibióticos inicial, sino solo por resiembra de colonias Tet^R.

Ejemplo 6: Identificación de secuencias de redireccionamiento efectivo de clostridias

Se eligieron ocho genes de prueba diferentes de 3 especies de *Clostridia* distintas para evaluar el redireccionamiento de ErmBtdRAM1. Estas eran: *Clostridium sporogenes pyrF*, *spo0A*, *codY*, y *SONO*, *Clostridium difficile pyrF* (Anotación de Genoma N.º CD3592) y *spo0A* (Anotación de Genoma N.º CD1214), *Clostridium acetobutylicum pyrF* (Anotación de Genoma N.º CAC2652) y *spo0A*.

Cada gen fue analizado en <http://www.sigma-genosys.com/targetron/>, y se identificaron los cambios adecuados para permitir el redireccionamiento detectado. Mediante el uso de cebadores adecuados, se efectuó la generación de intrones de Grupo II modificados apropiadamente mediante la realización de PCR según las directivas de la Guía del Usuario del Sistema de *Knockout* génico TargeTron™ de Sigma-Aldrich. Cada PCR requirió singulares cebadores IBS, EBS2 y EBS1d diseñados para modificar las porciones directoras del intrón de Grupo II o su exón 5', y el cebador EBS Universal. Las secuencias de los sitios de inserción de objetivo para cada gen y los cebadores se muestran en las siguientes Tablas 3 y 4.

Tabla 3: Sitios de inserción de objetivo previstos para ácido nucleicos redirectores

Objetivo ^a	Secuencia 5'-3' de sitio de inserción de objetivo	SEQ ID N.º
<i>C. sporogenes codY</i> 417s	GCTAGATTTTGATAAAGAATTTACTGATGAA -intrón - GATTTAGTGTTAGCA	35
<i>C. difficile pyrF</i> 97a	CAACGTATTGCTCTAGCCCTACCTTAAATA -intrón - TGTCTACACTATCTT	36
<i>C. difficile spo0A</i> 178a	ATCCATCTAGATGTGGCATTATTACATCTA - intrón - GTATTAATAAGTCCG	37
<i>C. sporogenes spo0A</i> 249s	AATAGTATAGATATTACTCCTATGCCAAGG - intrón - GTAATTGTTTTGTCT	38
<i>C. sporogenes pyrF</i> 595s	GTAATTGTGGATATAGCTCTATAGGAGCAG - intrón - TAGTTGGATGTACAG	39
<i>C. acetobutylicum pyrF</i> 345s	GAAATGTATGCTAAAGCTCACTTTGAAGGT - intrón - GATTTTGAAGCGGAT	40
<i>C. acetobutylicum spo0A</i> 242a	CCAACAGCGGATAAAAAGCTATTATTCTTGGA - intrón - AGGTTTTCTGCATCT	41
<i>C. sporogenes SONO</i> 492s	ATCAAAGTAGATGAAATAGAAAGAAAAGAT - intrón - GATTTTTTAAAAGCTT	42

^aObjetivo indicado como microorganismo, ORF y punto de inserción. Se seleccionaron los sitios de inserción de objetivo de manera tal que los intrones fueran insertados después de la cantidad de bases indicadas a partir del inicio del ORF, ya fuera la orientación con sentido (s) o antisentido (a).

Tabla 4: Cebadores de oligonucleótidos usados para generar productos de PCR para el redireccionamiento

Cebador	Secuencia 5'-3' de cebador	SEQ ID N.º
EBS Universal	CGAAATTAGAACTTGCCTTCAGTAAAC	43
Csp-codY-417s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTTACC GATGAAGTGC GCCCAGATAGGGTG	44
Csp-codY-417s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCGATGAAGATAACTTACCTTTCTT TGT	45
Csp-codY-417s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGTAA ATCGATAGAGGAAAGTGTCT	46
Cdi-pyrF-97a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTACCC TAAATAGTGC GCCCAGATAGGGTG	47
Cdi-pyrF-97a-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCTAAATATGTAACCTTACCTTTCTT TGT	48
Cdi-pyrF-97a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGGTA GTCGATAGAGGAAAGTGTCT	49
Cdi-spo0A-178a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTATTATTC CATCTAGTGC GCCCAGATAGGGTG	50
Cdi-spo0A-178a-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCCATCTAGTTAACTTACCTTTCTT TGT	51
Cdi-spo0A-178a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAATA ATCGATAGAGGAAAGTGTCT	52
Csp-spo0A-249s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACCTATC CCAAGGGTGC GCCCAGATAGGGTG	53
Csp-spo0A-249s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCCCAAGGGTTAACTTACCTTTCTT TGT	54
Csp-spo0A-249s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATAG GTCGATAGAGGAAAGTGTCT	55
Csp-pyrF-595s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTATAC GAGCAGGTGC GCCCAGATAGGGTG	56
Csp-pyrF-595s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCGAGCAGTATAACTTACCTTTCTT TGT	57
Csp-pyrF-595s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTATA GTCGATAGAGGAAAGTGTCT	58
Cac-pyrF-345s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACACTTC GAAGGTGTGC GCCCAGATAGGGTG	59
Cac-pyrF-345s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCGAAGGTGATAACTTACCTTTCTT TG	60
Cac-pyrF-345s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAAGT GTCGATAGAGGAAAGTGTCT	61
Cac-spo0A-242a-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATTATC CTTGGAGTGC GCCCAGATAGGGTG	62
Cac-spo0A-242a-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCCCTTGAAGTAACTTACCTTTCTT TGT	63
Cac-spo0A-242a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATAA TCCGATAGAGGAAAGTGTCT	64
Csp-SONO-492s-IBS	AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGAAAG CAAAGATGTGC GCCCAGATAGGGTG	65

Csp-SONO-492s-EBS1d	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGA TAAGTCAAAGATGATAACTTACCTTTCTT TGT	66
Csp-SONO-492s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCTTT CTCGATAGAGGAAAGTGTCT	67

Para asegurar que los intrones de Grupo II modificados eran capaces de redirigir hacia los genes de *Clostridia* seleccionados, primero se realizaron experimentos en *E. coli* usando sistemas de plásmidos conocidos por su efectiva función. El sistema utilizado es un sistema de dos plásmidos desarrollado por Karberg *et al.* (2001) tal como se describe en el Ejemplo 5. Usando este sistema, se coloca el intrón de Grupo II obtenido por ingeniería en un plásmido (pACD2) y su objetivo (en este caso, el gen de *Clostridia* clonado) en un segundo plásmido (pBRR3). El redireccionamiento del intrón de Grupo II proveniente de pACD2 hacia pBRR3 da por resultado la activación del gen *Tet* en el último plásmido. En consecuencia, se pueden detectar eventos de redireccionamiento sobre la base de la adquisición de resistencia a tetraciclinas. Una porción de las bacterias se siembra sobre placas de agar no selectivo para dar una indicación del total de bacterias viables, y una porción se siembra sobre placas de agar que contiene tetraciclinas (placas *Tet*). La eficacia de la redirección se estima sobre la base de la proporción del total de bacterias viables que son resistentes a tetraciclinas.

Para facilitar la subclonación de los genes objetivo provenientes de los plásmidos pCR2.1/pCRII TOPO en pBRR3, se introdujo un sitio de clonación múltiple en pBRR3-LtrB para obtener pBRR3-MCS1. Esto se efectuó por inserción de un fragmento de sitio de multiclonación entre los sitios AatII y EcoRI de pBRR3-LtrB, que contiene sitios de restricción hallados en el plásmido pCR2.1-TOPO. Las secuencias de los sitios de clonación se muestran en la Figura 8. Se preparó el fragmento de sitio de multiclonación mostrado en la Figura 8 a partir del oligonucleótido de MCS1a CTCGAGGTACCATGCATAGGCCTGAGCTCA-CTAGTGC GGCCGCG (SEQ ID N.º 68) y el oligonucleótido de MCS1b AATTC-GCGCCGCACTAGTGAGCTCAGGCCTATGCATGGTACCTCGAGACGT (SEQ ID N.º 69).

Se evaluaron cuatro ácido nucleicos redirigidos (cada uno pretendido para la inserción en uno de los genes de *C. sporogenes pyrF*, *spo0A*, *codY* y *SONO*) mediante el uso del ensayo de movilidad de intrón de dos plásmidos. Los cuatro permitieron un redireccionamiento mucho más eficaz que el previsto. En consecuencia, las diluciones elegidas para la siembra en placas *Tet* no era el ideal y solo estaba justo en el rango del recuento de colonias, y en consecuencia las efectividades dadas pueden ser menos exactas que si se hubieran sembrado menos bacterias. Se evaluaron los siguientes cuatro ácido nucleicos redirigidos (cada uno pretendido para la inserción en uno de los genes de *C. difficile pyrF* y *spo0A* o los genes de *C. acetobutylicum pyrF* y *spo0A*) para el redireccionamiento. Se estimaron los eventos de redirección mediante la siembra de las bacteria en placas *Tet*. En este experimento inicial, SONO no produjo colonias Em^R. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados del ensayo de movilidad del intrón

Plásmido donante	Plásmido receptor	Eficacia de movilidad del intrón*
pACD2::Cs-spo0A-249s TR	Fragmento pBRR3::Cs-spo0A AS2	~15 %
pACD2::Cs-codY-417s TR	Fragmento pBRR3::Cs-codY AS2	~20 %
pACD2::Cd-pyrF-97a TR	Objetivo pBRR3::Cd-pyrF-97	~100 %
pACD2::Cd-spo0A-178a TR	Objetivo pBRR3::Cd-spo0A-178	~20 %
pACD2::Cs-pyrF-595s TR	pBRR3::Cs-pyrF	~2 %
pACD2::Ca-pyrF-345s TR	pBRR3::Ca-pyrF	~0.2 %
pACD2::Ca-spo0A-242a TR	pBRR3::Cs-spo0A	~20 %
pACD2::Cs-SONO-492s TR	pBRR3::Cs-SONO"	ND

*Eficacia e movilidad del intrón = colonias Tet^R/colonias Amp^R Cm^R, Cs - *C. sporogenes*, Ca - *C. acetobutylicum*, Cd - *C. difficile*. Los números se refieren al sitio de inserción del intrón respecto del inicio del gen, en orientación con sentido (s) o antisentido (a). TR= ácido nucleico redirigido

Ejemplo 7: Evaluación de ácido nucleicos redirigidos en clostridias

Se subclonaron los primeros cuatro ácido nucleicos redirigidos nuevos (cada uno pretendido para la inserción en uno de los genes de *C. sporogenes pyrF*, *spo0A*, *codY* y *SONO*) en el vector prototipo pMTL5402FTTErmBtdRAM1 y los plásmidos resultantes se introdujeron el donante de *E. coli* CA434, y luego se usaron en experimentos de conjugación con *C. sporogenes* o *C. difficile* como receptor. En el caso de este último, no se obtuvieron transconjugantes. Se obtuvieron transconjugantes con ambos plásmidos en el caso de *C. sporogenes*. Se inocularon transconjugantes únicos en 1,5 mL de un medio de crecimiento apropiado suplementados con 250 mg/mL de cicloserina y 7,5 mg/mL de tianfenicol (el último de los cuales asegura el mantenimiento del plásmido) y se permitió que el cultivo creciera hasta la fase estacionaria por incubación anaerobia a 37°C durante la noche. Se usaron 150 mL de este cultivo para inocular 1,5 mL de caldo nuevo del mismo tipo que contiene los mismos suplementos, y luego se incubó en anaerobiosis a 37°C. En cuanto fue visible el crecimiento en el cultivo, normalmente después de 1 h, se indujo el cultivo con IPTG 1 mM y se incubó durante 1 h.

Se recolectaron 2 mL de las células inducidas por centrifugación durante 1 minuto a 7000 rpm, se lavaron por resuspensión en PBS y se recolectaron como antes. El sedimento se resuspendió en un volumen igual (2 mL) de un medio de cultivo adecuado sin suplementos y se incubó en anaerobiosis a 37°C durante 1 hora. Luego se sembraron diluciones seriadas del cultivo en un medio de cultivo solido apropiado, suplementado con 1-10 mg/mL de eritromicina, después de 1 h, 24 y 48 h, y se incubó en anaerobiosis a 37°C.

No se obtuvieron colonias de eritromicina después de dos intentos independientes.

Ejemplo 8: Evidencia de que el promotor natural *ermB* es demasiado débil para impulsar una expresión de ErmB suficiente para que actúe como marcador seleccionable

Una explicación de la incapacidad para detectar el redireccionamiento de los ácidos nucleicos redirectores, tal como se describe en el Ejemplo 7 es que el promotor *ermB* es demasiado débil para permitir que una única copia del gen en el cromosoma de una célula confiera resistencia a eritromicina. El análisis de la secuencia de promotor *ermB* del plásmido pAMβ1 de *Enterococcus faecalis* demostró que el espaciado entre las regiones -35 y -10 del promotor es 21 bp. El óptimo para promotores grampositivos es 1761 bp.

Se clonó ErmBtdRAM1 SE en dos orientaciones diferentes en pMT5402F respecto de *fac*. Solo cuando el gen estuvo bajo el control de *fac*, el plásmido portador de ErmBtdRAM1 SE fue capaz de conferir resistencia a eritromicina al huésped *C. sporogenes*. En la orientación opuesta, la transcripción de la región codificadora *ermB* depende de su propio promotor y la expresión fue insuficiente para la resistencia, a pesar de la presencia de *ermB* en un plásmido de copias múltiples.

Ejemplo 9: Desarrollo de un ErmBtdRAM de *Clostridia* con un promotor fuerte

Es reconocido que el promotor del gen *thl* de *C. acetobutylicum* es un promotor fuerte y constitutivo. Se diseñaron cebadores para reemplazar el promotor ErmBtdRAM1 por el promotor *thl*. Estos eliminan las secuencias innecesarias entre el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de fijación del ribosoma, e insertar un sitio *NdeI* en el codón de inicio para permitir que el promotor pueda volver a ser cambiado, de ser necesario. Para defender la posibilidad de que el promotor *thl* podría ser demasiado fuerte, también se diseñó un promotor mutante *thl* '*thl2*', al cambiar el espaciado entre -35 y -10 a 16 nt, y efectuar cambios menores a los elementos -35 y -10. En la Figura 9 se muestran las secuencias de los promotores *thl* y *thl2* que cubren los elementos -35 y -10, comparado con un promotor de consenso vegetativo grampositivo. La secuencia del promotor *thl* completo se presenta en las posiciones 15-84 de la secuencia ErmBtdRAM2 en la Figura 10. La secuencia del promotor *thl2* completo solo difiere del *thl* en la región mostrada en la Figura 9.

Los promotores *thl* y *thl2* se fusionaron a los codones de inicio ErmBtdRAM1 y ErmBtdRAM1 SE mediante el uso de SOEing PCR y etapas de clonación, para producir ErmBtdRAM2 y ErmBtdRAM2 SE, donde cada uno contiene el promotor *thl* y cada uno de ErmBtdRAM3 y ErmBtdRAM3 SE contiene el promotor *thl2*. Se obtuvieron clones de secuencia correcta de RAM2 y RAM3, y se subclonaron en pACD2 y pMTL20lacZTT para su evaluación. En la Figura 10 se muestran las características y la secuencia de ErmBtdRAM2.

Se determinó la capacidad de las porciones RAM2 y RAM3 para conferir resistencia a eritromicina en células TOP10 de *E. coli* para plásmidos que contienen estas porciones tal como se indica en la Tabla 6 siguiente.

Tabla 6: Sensibilidad a eritromicina de clones TOP10 portadores de nuevos constructos

RAM	TOPO	SE TOPO	pACD2::RAM	pMTL20-lacZTTRAM	pMTL5402F-TTRAM
ErmBtdRAM2	R	R	S	S	S
ErmBtdRAM3	S	R	S	S	S

En todos los plásmidos salvo SE TOPO, el gen *ermB* es alterado por el intrón de grupo I y por lo tanto no se espera resistencia. En el plásmido SE TOPO no se altera el gen *ermB*, y si el promotor de *ermB* es suficientemente fuerte, se debería obtener un fenotipo de resistencia. Inesperadamente, el clon RAM2 TOPO confirió resistencia a eritromicina en *E. coli*. Parecería que el muy fuerte promotor *thl* y muy elevado número de copias supera la presencia del intrón de grupo I en este contexto, supuestamente por infrecuente inicio de la traducción en el ATG nativo. Este efecto solo se observa cuando el gen está presente en TOPO. Cuando se inserta en un plásmido pertinente para el redireccionamiento, tal como pACD2 y pMTL20lacZTTRAM, las células de *E. coli* no son resistentes a eritromicina. El perfil de resistencia de RAM3 era el esperado. En consecuencia, cualquiera de los promotores pareció ser de utilidad para impulsar la expresión del marcador seleccionable en el ácido nucleico redirector de clostridias.

Ejemplo 10: Evaluación de ErmBtdRAM2 y 3 en sistemas pACD2/pBRR3

Se evaluó la eficacia redirectora de ErmBtdRAM2 y 3 mediante el uso del ensayo de redireccionamiento descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se indican en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7: Resultados del ensayo de movilidad del intrón

Plásmido donante	Resultados	
	Eficacia de movilidad del intrón*	Eficacia de ensamblado de RAM†
Mostrados previamente:		
pACD2	$\sim 10^0$	n/d
pACD2KanRAM	$\sim 10^{-3}$	18/20
pACD2ErmBtdRAM1	$\sim 10^{-3}$	18/20
Este experimento:		
pACD2ErmBtdRAM2	$\sim 5 \times 10^{-3}$	9/10
pACD2ErmBtdRAM3	$\sim 7 \times 10^{-2}$	9/10
*Eficacia y movilidad del intrón = colonias Tet ^R /colonias Amp ^R Cm ^R		
†Eficacia de ensamblado de RAM = colonias Tet ^R resembradas para Kan ^R o Erm ^R /todas las colonias Tet ^R		

El empalme de RAM2 y RAM3 fue eficaz (90 %) y equivalente al RAM original (RAM1).

5 Ejemplo 11: Evaluación de ErmBtdRAM2 y 3 en sistema pMTL20lacZTT en *E. coli*

Como antes, no se pudo usar ningún RAM para detectar el redireccionamiento del intrón de Grupo II en *lacZ* en el cromosoma HMS174(DE3) de *E. coli* mediante el uso de Ery₅₀₀ o Ery₁₂₅. A diferencia de RAM3, RAM2 dio numerosas colonias Ery^R, pero se demostró por PCR que no contenían un intrón de Grupo II redirigido al gen *lacZ*. Se supone que estas colonias surgieron debido a la débil resistencia conferida por el plásmido.

Ejemplo 12:

La Figura 11 ilustra los componentes esenciales del vector pMTL007, también denominado pMTL5402FlacZTTErmBtdRAM2. Este intrón de Grupo II está modificado para redirigir el gen *lacZ*. Puede ser modificado para redirigir un gen de una célula bacteriana de la clase *Clostridia*.

Los elementos esenciales del plásmido son:

Un promotor de *Clostridia* para generar la expresión del elemento de ácido nucleico redirector, que en el ejemplo ilustrado es el promotor *fac* inducible. De manera similar, se pueden emplear otros promotores que se han tornado inducibles mediante la provisión de un operador *lac*, p.ej., *fac2*. Para mediar la inducción, el plásmido también porta el gen *lacI* de *E. coli* bajo el control de un promotor de *Clostridia*, en este caso el promotor del gen *ptb* (que codifica fosfotransbutirilasa) de *Clostridium acetobutylicum*. Se puede usar un promotor constitutivo en lugar de un promotor inducible. El plásmido también contiene el replicón ColE1 del plásmido pMTL20E, a fin de permitir el mantenimiento del plásmido en *E. coli* y la región de replicación del plásmido pCB102de *Clostridium butyricum*, a fin de permitir el mantenimiento en especies de *Clostridium*. También se provee el mantenimiento del plásmido mediante la inclusión del gen *catP* para permitir la selección del plásmido en *E. coli* (por suplementación del medio con cloranfenicol) y *Clostridia* (por suplementación del medio con tianfenicol). A fin de proporcionar la facilidad de conjugar el plásmido en los receptores de *Clostridia* además de la transformación, el vector también contiene la región *oriT* del plásmido RP4.

Todos estos elementos son intercambiables con otros factores equivalentes provenientes de otras fuentes. En consecuencia, se puede intercambiar ColE1 con otros replicones capaces de replicarse en *E. coli*, tales como p15a, pVW01 u orígenes de fagos tales como M13. El gen *catP* puede ser sustituido por otros genes de resistencia a antibióticos adecuados, tales *tetM* o *aad*. De modo similar, se puede emplear cualquier replicón capaz de replicarse en el huésped bacteriano objetivo de *Clostridia* o grampositivo, tal como pIM13, pIP404, pAMβ1, pCD6, pC194, pE194, pT181, pCB101, pBP1. También se pueden emplear los replicones defectuosos para la replicación, incluso replicones que pueden ser condicionales para la replicación, p.ej., sensibles a temperatura o dependientes de un factor exógeno para la replicación. También se pueden emplear plásmidos que carecen de cualquier disposición para la replicación en un plásmido grampositivo, es decir, un vector suicida que solo contiene un replicón ColE1.

Se pueden emplear otras combinaciones de genes operadores y represores. Otro candidato es un promotor identificado en el transposón conjugativo Tn5397 regulado por tetraciclina (Tet) (Roberts, tesis de doctorado, UCL). Como alternativa, recientemente se demostró un promotor inducible por xilosa derivado de *S. xylosus* que funciona en *C. acetobutylicum* (Girbal et al. (2003) Appl Environ Microbiol. 69: 4985-8). Otro candidato es un promotor regulado por *tet*, desarrollado en *B. subtilis* (Geissendorfer e Hillen (1990) Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 657-63). Se construyó por agregado de una secuencia de operador *tet* (*tetO*) entre -35 y -10 de un promotor *xyl* fuerte (Geissendorfer e Hillen, 1990, *supra*). En presencia de un gen *tetR* (que codifica el represor), el promotor derivado es inducible 100 veces por concentraciones subletales de Tet. Las concentraciones basales de expresión obtenidas podrían ser abolidas completamente por la adición de un segundo operador *tet*, si bien esta adición causó una reducción general de los niveles de expresión. Con posterioridad, este promotor ha tenido amplia aplicación en *S. aureus* (Bateman et al. (2001) Infect Immun. 69: 7851-7; Ji et al. (2001) Science 293: 2266-2269), donde solo fue necesario un único operador.

Un promotor regulado por *tet* es una alternativa ideal para nuestros sistemas *fac/lacI* desarrollados. En consecuencia, podremos expresar *tetR* usando el mismo promotor usado para expresar *lacI* (el promotor *ptb* de *C. acetobutylicum*). En *B. subtilis*, el grado de inducción fue dependiente de la dosis para el rango estudiado. Sin embargo, dado que *B. subtilis* fue sensible al antibiótico, no se pudieron agregar concentraciones elevadas de Tet. No se aplicará una restricción similar a clostridias tales como *C. difficile*, que son resistentes a este antibiótico. A fin de analizar la factibilidad del sistema, resintetizaremos *fac* y reemplazaremos la región entre -35 y -10 por *tetO*. Si se observaran concentraciones basales elevadas en ausencia de Tet, se puede agregar un segundo operador. También se puede usar la adición de otras secuencias sintéticas *lacO* para mejorar la represión de promotores mediante LacI (Muller *et al.* (1996) J Mol Biol. 257: 21-9).

Construcción de pMTL007

Los cebadores de oligonucleótidos usados en la construcción se indican en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8: Cebadores de oligonucleótidos

Cebador	Secuencia (5' -3')	SEQ ID N.º
lacI-P1	GTGGTGCATATGAAACCAGTAACG	70
lacI-P2	GAATTCCTAACTCACATTAATTGCG TTGCG	71
ptb-P1	GAATTCAGGGAATTAAAAGAATGT TTACCTG	72
ptb-P2	ACTCATATGTTGCACCTCTACTTTA ATAATTTTAAAC	73
tdGpl-F1	GCATTATGTTTCAGATAAGGTCGTTAATCTT ACCC	29
CatPFwd	CAGCTGACCGGTCTAAAGAGGTCCCTAGC GCC	74
CatPSOER	CGGTCATGCTGTAGGTACAAGGTAC	75
CatPRev	CAGCTGACCGGTCTCTGAAAATATAAAAA CCACAGATTGATAC	76
CatPSOEF	GTACCTGTACCTACAGCATGACCG	77
Thio-F1	CTACTAGTACGCGTTATATTGATAAAAATA ATAATAGTGGG	78
Thio-R-RAM	CCTTATCTGAACATAATGCCATATGAATCC CTCCTAATTTATACGTTTTCTC	79

Se aisló un fragmento *Lspl-HindIII* de 1,627 kb del plásmido pCB102 de *Clostridium butyricum* (Minton y Morris (1981) J Gen Microbiol 127: 325-33) y recortado en el extremo por polimerasa de Klenow. El vector de clonación del replicón pMTL21E (Swinfield *et al.* (1990) Gene 87:79-89) fue escindido con *NheI*, recortado en el extremo con polimerasa de Klenow y ligado con el fragmento de replicón pCB102 aislado. El plásmido resultante se denominó pMTL540E (T Davis, Tesis doctoral, The Open University, 1989), tal como se muestra en la Figura 12.

El elemento promotor inducible se derivó del promotor del gen de ferredoxina de *Clostridium pasteurianum*. Ahora denominado *fac*, fue creado por adición de un operador *lac* de *E. coli* inmediatamente después del +1 del promotor del gen de ferredoxina, y alteración de la secuencia que precede inmediatamente el codón de inicio de ATG del gen estructural de ferredoxina de CAT, y así crear un sitio de restricción *NdeI* (CATATG) (Minton *et al.* (1990) Vector systems for the genetic analysis of *Clostridium acetobutylicum* En: Anaerobes in Human Medicine and Industry (eds. P Boriello & J Hardie), Wrightson Publishing, Petersfield, RU pp. 187-206). En este caso particular, se insertó el operador *lac* en la orientación opuesta respecto de la transcripción, comparado con el promotor *lac*. No obstante, esto no afecta la funcionalidad, y la proteína LacI continuará con su capacidad de ligar y reprimir la transcripción desde el promotor.

Luego se subclonó el promotor *fac* como fragmento de restricción de *NdeI* y *EcoRI* entre los sitios equivalentes de plásmido pMTL1003 (Brehm *et al.* (1991) Appl. Biotechnol. 36, 358-363) que generan el plásmido pMTL1006. Esta etapa de subclonación removió eficazmente el promotor *trp* de pMTL1003 y colocó la expresión de *lacZ'* bajo el control del promotor *fd* modificado. Luego se sometió el plásmido pMTL1006 a una digestión con *BglI* y se aisló el mayor de los dos fragmentos obtenidos. De modo similar, se escindió el plásmido pMTL500E (Oultram *et al.* (1988) FEMS Microbiol Letts 56: 83-88) con *BglI* y el mayor de los dos fragmentos aislados y ligados con el mayor fragmento aislado de pMTL1006. El plásmido obtenido se designó pMTL500F (Fox *et al.*, 1996, *supra*).

Si bien pMTL500F es excelente en la replicación en *Clostridia*, hallamos que la frecuencia de transferencia de vectores de lanzadera basados en pAMβ1 en *Clostridia* es relativamente ineficaz. Por lo tanto, elegimos cambiar el replicón por el de pCB102. En consecuencia, se escindieron pMTL540E y pMTL500F con *BglI*, y el mayor fragmento de pMTL540E se ligó al fragmento menor de pMTL500F. El plásmido obtenido fue denominado pMTL540F (Fox *et al.*, 1996, *supra*). Por

simplicidad, la ligadura de los fragmentos pMTL500E y pMTL1006, y la ligadura de los fragmentos pMTL540E y pMTL500F se representa como ligadura única pMTL540E y pMTL1006 en la Figura 12.

5 A fin de permitir la transferencia conjugativa de los plásmidos para los casos en los cuales aún falta demostrar la transformación, elegimos conferir al plásmido el *oriT* (origen de transferencia) del plásmido RP4. Como tal, se removió la región *oriT* de RP4 de pEoriT (Purdy *et al.*, 2002) mediante el uso de *EcoRV* y *SmaI*, y se subclonó en el sitio de restricción *EcoRV* de pMTL540F para generar pMTL5400F (véase Figura 12).

10 Para lograr la producción de la proteína represora LacI, se amplificó una copia sin promotor del gen *lacI* de *E. coli* proveniente de pNM52 (Gilbert *et al.* (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 151-160) como fragmento de aprox. 1,0 kb *NdeI-EcoRI* que utiliza los cebadores de PCR *lacI*-P1 y *lacI*-P2 en paralelo, donde la región promotora del gen *ptb* de *Clostridium acetobutylicum* (fosfotransbutirilasa) se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores *ptb*-P1 y *ptb*-P2. Esto ubicó el gen en un fragmento *EcoRI-NdeI* de 578 bp. Los dos fragmentos se aislaron y ligaron con pMTL20E escindido por *EcoRI*, por lo que se colocó el gen *lacI* bajo el control de transcripción del promotor *ptb*, y se ubicó el gen modificado en un fragmento *EcoRI* portable. Este fragmento se removió del plásmido generado, recortado en el extremo por polimerasa de Klenow, y ligado con pMTL5400F escindido por *EcoRV*. El plásmido obtenido se designó pMTL5401F, tal como se muestra en la Figura 12.

20 El plásmido pMTL5401F porta un gen *erm* como marcador seleccionable. En consecuencia, no es compatible con ErmRAM. En consecuencia, el gen *erm* fue reemplazado por el gen *catP* de pJIR418 (Sloan *et al.* (1992) Plasmid 27: 207-219). Esto se logró al escindir pMTL5401F con *AhdI/TthIII1*, se recortó el extremo del ADN con polimerasa de Klenow, y luego se ligó a un fragmento *PvuII* de 1,1 kb portador del gen *catP* de pJIR418 al mayor de los dos fragmentos pMTL5401F generados por escisión con *AhdI* y *TthIII1*. Esta manipulación dio por resultado la eliminación completa de *ermB* y la remoción de la mayor parte del gen *bla*. El plásmido obtenido fue denominado pMTL5402F, tal como se muestra en la Figura 13.

30 Antes de esta sustitución, se removió un sitio *BsrGI* en el fragmento *catP* por mutación de una secuencia para destruir el palíndromo *BsrGI* sin cambiar la secuencia codificadora de *catP*. Esto se realizó mediante el uso de PCR de Extensión de superposición de costura (SOE) (Horton *et al.*, 1990), mediante el uso de los cebadores CatPSOEF y CatPSOER. Además, se designaron los cebadores flanqueadores CatPFwd y CatPRev para abarcar un sitio *PvuII* y los sitios internos *Agel*. El primero fue incorporado para la posterior inserción del plásmido en pMTL5401F, mientras que el último fue introducido para facilitar la posterior sustitución de *catP* en el plásmido final pMTL007, con marcadores alternativos en una fecha futura.

35 Se construyó pMLT007 como sigue:

El plásmido pACD4K-C de Targetron™ fue adquirido de Sigma y redirigido al gen *lacZ* de *E. coli* mediante el uso de los cebadores control provistos en el kit de conformidad con el protocolo, proporcionado, excepto en cuanto a que primero se clonó el producto de PCR y se verificó su secuencia antes de subclonar el fragmento *HindIII/BsrGI* en pACD4K-C.

40 Se removió la región de ácido nucleico redirigida a *lacZ* como un fragmento *NaeI* de 5099bp, y se ligó en un fragmento de pMTL20 de 2412 bp que se había generado previamente por digestión con *HindIII* y *SmaI*, con recorte de por polimerasa T4 del extremo *HindIII*, tal como se muestra en la Figura 13. Se eligió un constructo en la orientación en la cual los sitios flanqueaban la región de ácido nucleico redirectora.

45 Se removió KanRAM mediante el uso de *MluI* y se reemplazó por un fragmento de *MluI* de 1259 bp que contiene ErmBtdRAM2, tal como se muestra en la Figura 13.

50 Luego se removió toda la región de ácido nucleico redirectora de *lacZ*, incluso ErmRAM, como un fragmento *HindIII/SacI* de ~3,3 kbp y un fragmento *SacI/NheI* de ~1,8 kbp, que se ligaron en pMTL5402F digerido con *HindIII* y *NheI*. El plásmido obtenido se denominó pMTL5402FLacZTTErmBtdRAM1.

55 Se amplificó el promotor *thl* de *C. acetobutylicum* ATCC 824 por PCR a partir de pSOS95 (Tummala *et al.* (2003) J. Bacteriol. 185: 1923-1934) mediante el uso de los cebadores Thio-F1 y Thio-R-RAM. El producto de PCR se purificó por gel y se usó, junto con el producto de PCR del intrón de Grupo I *td* proveniente de la construcción de ErmBtdRAM1, como molde en un SOEing PCR que utilizó los cebadores externos Thio-F1 y *tdGpl*-R1. Se removieron el promotor *thl* y parte del intrón *td* proveniente de este producto de PCR como un fragmento *SpeI/NspI* de 143 bp. Se removió el resto del intrón *td* y el ORF *ermB* proveniente de pCR2.1::ErmBtdRAM1 juntos como un fragmento *NspI/NotI*. Estos fragmentos se ligaron en una ligadura de tres vías en pCR2.1::ErmBtdRAM1SE linearizado con *SpeI* y *NotI*, para dar el plásmido pCR2.1::ErmBtdRAM2.

Se ligó el fragmento *MluI/MluI* de pCR2.1::ErmBtdRAM2 que contiene el RAM con el fragmento mayor de *MluI/MluI* de pMTL201acZTT, para formar pMTL201acZTTErmBtdRAM2 tal como se muestra en la Figura 14.

65 Se subclonó un fragmento *BsrGI/BstBI* de pMTL201acZTTErmBtdRAM2 que contiene el RAM en *BsrGI/BstBI* escindido de pMTL5402F1acZTTErmBtdRAM1 para generar pMTL007 tal como se muestra en la Figura 14.

Inicialmente se denominó pMTL5402F1acZTTErmBtdRAM2 a pMTL007, y en ocasiones se denomina pMTL5402FlacZTTErmRAM2 o pMTL5402F1acZTTRAM2 o pMTL5402FlacZTTR2.

5 Una vez redirigido, el plásmido fue denominado pMTL007 (o pMTL5402FTTErmBtdRAM2 o pMTL5402FTTErmBRAM2 o pMTL5402FTTRAM2 o pMTL5402FTTR2) con el sufijo de un identificador para la 'Región objetivo' (TR). La TR es toda la región entre los sitios HindIII y BsrGI de la secuencia generada por el PCR redirector. Por ejemplo, una vez que el plásmido fue redirigido al gen *spo0A* de *C. difficile* 630 en la posición 178 de *spo0A* ORF, al clonar el fragmento TR apropiado como un fragmento HindIII/BsrGI, donde el plásmido fue denominado pMTL5402FTTErmBtdRAM2::Cd-
10 *spo0A*-178aTR.

Ejemplo 13: Evaluación de ErmBtdRAM2 y 3 en el sistema pMTL5402FlacZTT en *C. sporogenes* contra *codY*

15 Una vez generados nuevos RAM capaces de proporcionar resistencia a eritromicina en *Clostridia*, se construyeron ácidos nucleicos redirigidos a *Clostridia* que comprenden un intrón de Grupo II modificado que contiene porciones directoras dirigidas al intrón para *C. sporogenes* contra *codY*. Se construyeron dos plásmidos portadores de RAM2 o RAM3 y denominados pMTL5402FCs-*codY*-417sTT::RAM2 y RAM3 respectivamente. La versión RAM2 es idéntica a la mostrada en la Figura 10, excepto en que las porciones redirectoras del intrón de Grupo II y la secuencia IBS están diseñadas para permitir el redireccionamiento de *C. sporogenes* contra *codY* en lugar de *lacZ* de *E. coli*. Cada plásmido
20 fue conjugado con *Clostridium sporogenes*. Se verificaron los transconjugantes por PCR y se demostró que eran completamente sensibles a Ery_{1.25}. Después de indujo un transconjugante seleccionado de cada RAM con IPTG, y tras la remoción del inductor por centrifugación y lavado, se lo dejó recuperar durante 3 horas antes de sembrarlo en placas de agar que contenían un rango de concentraciones de eritromicina.

25 La cantidad de colonias obtenidas se muestra en la Tabla 9 siguiente.

Tabla 9: Resultados de ensayo de redireccionamiento

Expt.	RAM	Condiciones		Colonias por 10 ⁰ en placas de 100 µL							
		Induc. (IPTG 1mM)	Recup. (tras lavado con PBS)	Ery 10		Ery 5		Ery2.5		Ery1.25	
				24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
A	RAM2	1h	3h	0	0	0	1	0	0	0	1
B	RAM2	3h	3h	0,2	1	1	~10	2	~20	3	~40
C	RAM3	3h	3h	0	0,2	0	0,2	0	0,6	0	0,6

30 Estos datos demuestran la importancia de un periodo de inducción suficiente y las eficacias superiores obtenidas mediante el uso de RAM2, comparado con RAM3.

Ejemplo 14: Generación de ulteriores mutantes

35 Elegimos dirigir dos genes cuya inactivación conduciría a fenotipos de fácil detección; *pyrF* y *spo0A*. La inactivación del primero debería conducir a auxotrofia de uracilo, mientras que la alteración del último debería conducir a asporogenia.

40 Se redirigió pMTL007 al gen *spo0A* de *C. sporogenes* y se obtuvieron rápidamente cientos de colonias Em^R de *C. sporogenes* después de la inducción por IPTG. Se extrajo ADN de cuatro colonias al azar y se usó como molde en PCR. En todos los casos, los cebadores específicos del RAM generaron un fragmento de ADN de un tamaño concordante con la pérdida del intrón *td* (Figura 15).

45 Una vez demostrada la funcionalidad aparente del RAM con pMTL007::Csp-*spo0A*-249s, procedimos a generar mutantes en los dos genes (*pyrF* y *spo0A*) en las tres especies de *Clostridia* mediante el uso de los protocolos reseñados en la sección de métodos. El análisis de PCR de los clones Em^R (Figura 15b, c) reveló muy elevadas frecuencias de inserción en el sitio cromosómico pretendido (Tabla 10), lo cual demuestra la facilidad con que se pueden obtener integrantes mediante el uso de este método. Después del aislamiento, se analizaron colonias aisladas de los integrantes respecto de la pérdida de plásmidos por fenotipo sensible a tianfenicol, y se halló que predominaban las colonias curadas del plásmido en todos estos microorganismos sin pasos adicionales. Se verificaron los sitios de
50 inserción por determinación de las secuencias a través de las uniones de exones (Tabla 10) y el análisis por Southern blotting con una sonda para RAM confirmó la presencia de una única copia de elemento de inserción (Figura 15d, e y f).

55 La inducción por IPTG de la expresión del intrón proveniente de pMTL007::Csp-*spo0A*-249s en *C. sporogenes* incrementó la frecuencia de inserción en más de 100 veces (Tabla 10), en concordancia con los datos informados para pMTL5401Fcat.

Tabla 10: Efecto de la expresión regulada del intrón sobre las frecuencias de inserción en *C. sporogenes*.

Plásmido	IPTG ^a	Frecuencia de inserción ^b	Frecuencia de inserción relativa ^c
pMTL007::Csp-spo0A-249s	-	$\leq 1,31 \pm 0,34 \times 10^{-9}$	1
pMTL007::Csp-spo0A-249s	+	$1,63 \pm 0,72 \times 10^{-7}$	124
pMTL007::Csp-spo0A-249s.lacI	-	$1,95 \pm 0,54 \times 10^{-6}$	1489

^aSe indujo la expresión del intrón con IPTG 1 mM (+) o con agua en lugar de IPTG (-). ^bDespués del periodo de recuperación, se dispersaron las células en placas de cicloserina TYG con suplemento de eritromicina o sin él. Las frecuencias de inserción se expresan como Em^R ufc/mL / ufc/mL total. ^cSe normalizaron las frecuencias relativas de inserción respecto del experimento con pMTL007::Csp-spo0A-249s y agua en lugar de IPTG.

A fin de establecer si la expresión regulada del intrón confería alguna ventaja sobre la expresión constitutiva, desreprimimos el promotor *fac* mediante la introducción de una mutación de cambio de marco en el gen *lacI* de pMTL007::Csp-spo0A-249s. Se observó un ulterior incremento de frecuencia de inserción superior a 10 veces (Tabla 10), lo cual indica que la expresión regulada del intrón no confiere ventaja alguna sobre la expresión constitutiva. Realizamos un experimento equivalente en *C. acetobutylicum* con pMTL007::Cac-spo0A-242a, y no observamos cambios en las frecuencias de integración con la adición de IPTG (datos no mostrados). En concordancia con los datos informados para pMTL5401Fcat, en apariencia la expresión basal del intrón respecto del promotor *fac* en este microorganismo es suficiente para obtener frecuencias de integración fácilmente detectables. Al igual que pMTL5401F, pMTL007 es demasiado inestable en *C. difficile* para sostener el crecimiento de sus transconjugantes en medio de cultivo líquido suplementado con antibiótico (Purdy et al. (2002) Mol. Microbiol. 46: 439-452). En consecuencia, no se pudo realizar ningún experimento de inducción por IPTG comparable a los realizados en *C. sporogenes*. No obstante, se pudieron obtener fácilmente integrantes Em^R en *C. difficile* y *C. acetobutylicum*, simplemente al resembrar colonias transconjugantes en medio de cultivo que contiene eritromicina, sin adición de IPTG.

Tal como se previó, todos los mutantes *spo0A* eran incapaces de formar endosporos (Figura 16). Se demostró que todos los mutantes *pyrF* eran incapaces de crecer en medios mínimos, a menos que se suplementen con 50 mg/L de uracilo. Intentamos seleccionar reversiones a la prototrofia de uracilo al cultivar los tres mutantes de *Clostridia* en medio líquido rico carente de selección de eritromicina y luego sembrarlos en medio de agar mínimo con uracilo o sin él. Nunca se detectaron reversiones en medio carente de uracilo en al menos tres experimentos. Por comparación con los recuentos celulares en medios suplementados con uracilo, se estimaron las frecuencias de reversión por célula en menos de $9,36 \times 10^{-9}$ en *C. difficile*, menos de $9,60 \times 10^{-7}$ en *C. acetobutylicum* y menos de $5,50 \times 10^{-9}$ en *C. sporogenes*. Estos hallazgos son coherentes con los datos en la bibliografía (Frazier et al. (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69: 1121-1128) que demuestran que los integrantes del intrón son extremadamente estables; una característica mutante de gran interés.

Ejemplo 15: Evaluación del sistema ErmBtdRAM2 contra otros objetivos

- Se ha desarrollado un protocolo estándar para el redireccionamiento en *Clostridia*, tal como sigue.
- Esencialmente, se generan secuencias redirigidas al intrón para el gen de interés, de conformidad con el método provisto por Sigma con el kit Targetron™: se utiliza el algoritmo computarizado provisto en el sitio de red de Sigma [<http://www.sigma-senosys.com/targetron/>] para identificar posibles objetivos del intrón dentro de la secuencia del gen de interés, y para diseñar cebadores de PCR. Después, estos cebadores se usan de conformidad con el protocolo Targetron™ de Sigma, y se usan los reactivos de PCR provistos en el kit de Targetron™ de Sigma para generar un producto de PCR de 353 bp que corresponde a parte del intrón e incluye secuencias de IBS, EBS1d y EBS2 modificadas, de manera tal que se pueda redirigir el intrón al gen de interés. Este producto de PCR se clona en un vector de clonación apropiado tal como pCR2.1 y se verifica su secuencia. Como alternativa, puede ser subclonado directamente en pMTL007.
 - Esencialmente, el prototipo de plásmido redirector de *Clostridia* pMTL5402F1acZTTR2 es redirigido de conformidad con el método provisto por Sigma con el equipo de Targetron™: si se clonó el producto PCR de la etapa 1 en un vector de clonación, se remueve la secuencia de redirección de interés de su plásmido por digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *BsrGI*, y se clona en pMTL5402F1acZTTR2 digerido con las mismas enzimas. En cada caso, se verifican los constructos resultantes por análisis y/o determinación de las secuencias de restricción.
 - El plásmido redirector de *Clostridia* redirigido con éxito es transferido al microorganismo objetivo: se pueden introducir plásmidos recombinantes en huéspedes de *Clostridia* por métodos estándar de transferencia de ADN basados en electrotransformación o conjugación. Estos métodos están dados en Davis I, Carter G, Young M y Minton NP (2005) "Gene Cloning in Clostridia", En: Handbook on Clostridia (Durre P, ed.) pp. 37-52, CRC Press, Boca Raton, EE.UU. En nuestros experimentos, se introdujeron plásmidos en esperógenos de *Clostridium difficile* y *Clostridium sporogenes* por conjugación a partir de donantes de *E. coli*. En contraste, se introdujeron plásmidos en *Clostridium acetobutylicum* por transformación.
 - Se logra el redireccionamiento de la expresión de ácido nucleico y la posterior integración por inducción del transformante con IPTG: se usa una colonia de transformante individual para inocular 1,5 mL de un medio de cultivo

5 apropiado suplementado con 250 mg/mL de cicloserina y 7,5 mg/mL de tianfenicol (el último de los cuales asegura el mantenimiento del plásmido) y se deja crecer el cultivo hasta la fase estacionaria por incubación anaerobia a 37°C durante la noche. Se usan 150 mL de este cultivo para inocular 1,5 mL de caldo nuevo del mismo tipo que contiene los mismos suplementos, que luego es incubado en anaerobiosis a 37°C. En cuanto se visualiza el crecimiento del cultivo, normalmente después de 1 h, se induce el cultivo con IPTG 1 mM y se incuba durante 3 h.

10 5. Se detectan y aíslan los integrantes de ácido nucleico mediante una etapa de recuperación seguida de la siembra de las células en medios sólidos selectivos e incubación: Se recolectaron 2 mL de las células inducidas por centrifugación durante 1 minuto a 7000 rpm, se lavaron por resuspensión en PBS y se recolectaron como antes. El sedimento se resuspendió en un volume igual (2 mL) de un medio de cultivo apropiado sin suplementos, y se incubó en anaerobiosis a 37°C durante 3 h. Luego se sembraron diluciones seriadas del cultivo en un medio de cultivo sólido apropiado suplementado con 1-10 mg/mL de eritromicina, y se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Se pueden captar colonias resistentes a eritromicina correspondientes a clones integrantes de ácido nucleico redirectores después de 18-48 h, según el microorganismo y la concentración de eritromicina usada.

15 Opcionalmente, se pueden sembrar diluciones seriadas del cultivo en medios de cultivo sólidos sin suplementos o medios de crecimiento sólidos suplementados con 15 mg/mL de tianfenicol en lugar de eritromicina, a fin de determinar la frecuencia del proceso de integración.

20 Se usó el protocolo estándar para preparar mutantes de *Clostridia* tal como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11: Mutantes de clostridias

Microorganismo	Objetivo	Redirigido ^a	Porcentaje de gen objetivo ^b
<i>C. sporogenes</i>	<i>codY</i>	SÍ	Aún no determinado
<i>C. sporogenes</i>	<i>spo0A</i>	SÍ	100 % (3 de 3)
<i>C. sporogenes</i>	<i>pyrF</i>	SÍ	100 % (2 de 2)
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>pyrF</i>	SÍ	Aún no determinado
<i>C. difficile</i>	<i>spo0A</i>	SÍ	100 % (3 de 3)

Los cebadores de PCR diagnóstico dan un producto del tamaño esperado si el ácido nucleico redirector está insertado en el gen objetivo.
^a Presencia del mutante de interés demostrado en un pool de varios clones.
^b Varios clones individuales analizados para la mutación de interés.

25 En ocasiones, el redireccionamiento es ineficaz. En consecuencia, se recomienda intentar más de una porción directora para alterar cualquier gen dado. Además, se pueden reunir las colonias antes de analizar por PCR los lotes combinados. Si se combinan porciones de 10 o 100 colonias y se generara un producto de PCR del tamaño previsto para un mutante redirigido, se podrían analizar individualmente las colonias.

30 **Ejemplo 16: Ulterior generación de mutantes**

35 Para establecer la ulterior utilidad del método, seleccionamos otros genes provenientes de las tres especies, y repetimos el procedimiento de mutagénesis. Los genes dirigidos están incluidos en la lista de la Tabla 12 y los cebadores de oligonucleótidos usados para generar productos de PCR de conformidad con el protocolo estándar para la modificación del intrón de Grupo II de pMTL007 se muestran en la Tabla 4 o la Tabla 13. En cualquier caso se obtuvo el integrante deseado. Cada inserción fue confirmado por análisis de PCR y se verificó el punto de inserción por determinación de la secuencia de nucleótidos.

Tabla 12: Frecuencias de inserción de intrón con selección por eritromicina

Objetivo (microorganismo, ORF y punto de inserción ^a)	Clones Em ^R analizados ^b	Mutantes deseados obtenidos ^b	Frecuencia de mutantes deseadas entre clones Em ^{Rb}	Sitio de inserción verificado por determinación de secuencia ^b	SEQ ID N.º
<i>C. sporogenes spo0A</i> 249s	4	4	100 %	TATGCCAAGG-intrón-GTAATTGTTT	80
<i>C. difficile spo0A</i> 178a	3	3	100 %	ATTACATCTA-intrón-GTATTAATAA	81
<i>C. acetobutylicum spo0A</i> 242a	8	4	50 %	TATTCTTGGA-intrón-AGGTTTTGTG	82
<i>C. sporogenes pyrF</i> 595s	2	2	100 %	ATAGGAGCAG-intrón-TAGTTGGATG	83
<i>C. difficile pyrF</i> 97a	96 ^c	7-19 ^c	7-20 ^c	ACCTTAAATA-	84

ES 2 546 648 T3

				intrón- TGTCTACACT	
<i>C. acetobutylicum pyrF</i> 345s	8	2	25 %	CTTTGAAGGT- intrón- GATTTTGAAG	85
<i>C. acetobutylicum</i> CAC0081 141a	6	6	100 %	TTTTAATGAC- intrón- ATAGTTTATA	86
<i>C. acetobutylicum</i> CAC0080 121s	6	6	100 %	CTGAAATTAT- intrón- TTCGTTAATA	87
<i>C. acetobutylicum</i> CAC0078 385a	3	3	100 %	GTATCTCCAG- intrón- GCGCATATCT	88
<i>C. acetobutylicum</i> CAC2208 201s	4	3	75 %	TGTGGAGTAT- intrón- TCGGTACACA	ipt
<i>C. difficile</i> CD0153 784a	5	5	100 %	CCAATAAGCC- intrón- CATCTCCAGA	90
<i>C. difficile</i> CD0552 75a	10	9	90 %	CTCTACAATA- intrón- TCTATCTTTA	91
<i>C. difficile</i> CD3563 226s	8	8	100 %	GAGGGACAGG- intrón- TTGCTGTAGC	92
<i>C. botulinum</i> CB00780 671a	44		100 %	TTTATTATTT- intrón- TCTTTTTTAA ^d	93
<i>C. botulinum</i> CBO1120 670s	4	4	100 %	GAATTTTATG- intrón- CTAATATATC ^d	94
<i>C. botulinum</i> CBO2762 1014s	4	4	100 %	TTTAACATAT- intrón- AGATTAGTTA ^d	95
<i>C. botulinum spo0A</i> 249s	4	4	100 %	TATGCCAAGG- intrón- GTAATTGTTT ^d	96

^aLos intrones se insertaron detrás de la cantidad de bases indicada desde el inicio del ORF, en orientación con sentido (s) o antisentido (a). ^bSe extrajo el ADN genómico de clones Em^R tomados al azar y usados como moldes en PCR que utilizó cebadores para amplificar a través de una unión intrón-exón. Se seleccionó un clon de cada mutante deseado y se verificó el sitio de inserción del intrón por determinación de secuencia. ^cSe analizaron 96 clones candidatos mutantes de *C. difficile pyrF* Em^R en pools. No se requirió análisis exhaustivo para aislar el mutante, por lo que se da un rango de frecuencias posibles. ^dSitio de inserción previsto, no verificado por determinación de secuencias de nucleótidos.

Tabla 13: Cebadores de oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	SEQ ID N.º
Cdi-CD0552-75a-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTATTCCTCCACAATAGTGGCCCAAGATAGGGTG	97
Cdi-CD0552-75a-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCACAAATATCTAACTTACCTTTCTTTGT	98
Cdi-CD0552-75a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTGAGAATCGATAGAGGAAAAGTGCT	99
Cdi-CD3563-226s-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTAAATGAGCGACAGGGTGGCCCAAGATAGGGTG	100
Cdi-CD3563-226s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCGACAGGTTAACTTACCTTTCTTTGT	101
Cdi-CD3563-226s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTTCACTCCGATAAGGAAAAGTGCT	102
Cac-CAC0081-14 1a-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTAAATTTTCAATGACGTGGCCCAAGATAGGGTG	103
Cac-CAC0081-14 1a-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCAA TGACATTAACCTTACCTTTCTTTGT	104
Cac-CAC0081-14 1a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTAAAATCCGATAGAGGAAAAGTGCT	105
Cac-CAC0078-385a-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTACTGTACCTCCAGGTGGCCCAAGATAGGGTG	106
Cac-CAC0078-385a-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCCCTCCAGGTAACTTACCTTTCTTTGT	107
Cac-CAC0078-385a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGATTTACAGTCCGATAAGGAAAAGTGCT	108
Cac-CAC0080-121s-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTAACTGCAATATGTCGCGCCCAAGATAGGGTG	109
Cac-CAC0080-12 1s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCAA TTAATTTAACTTACCTTTCTTTGT	110
Cac-CAC0080-12 1s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTCCAGTCCGATAGAGGAAAAGTGCT	111
Cac-CAC2208-20 1s-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTACATGTGAGTATGTCGCGCCCAAGATAGGGTG	112
Cac-CAC2208-20 1s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCGAGTATCTAACTTACCTTTCTTTGT	113
Cac-CAC2208-20 1s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTACATGTCGATAAGGAAAAGTGCT	114
Cdi-CD0153-784a-IBS	AAAAAGCTTATAAATTCCTTATAOCCAATAAGCCGTGGCCCAAGATAGGGTG	115
Cdi-CD0153-784a-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCAA TGACCCATAACTTACCTTTCTTTGT	116
Cdi-CD0153-784a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTTGGTATCGATAAGGAAAAGTGCT	117
Cbo-CBO0780-671a-IBS1	AAAAAGCTTATAAATTCCTTAGCTTCTTATTTGTGGCCCAAGATAGGGTG	118
Cbo-CBO0780-671a-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCTTATTTCTAACTTACCTTTCTTTGT	119
Cbo-CBO0780-671a-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGATTTAAAGCTCGATAGAGGAAAAGTGCT	120
Cbo-CBO1120-670s-IBS1	AAAAAGCTTATAAATTCCTTACTGAACCTTTATGGTGGCCCAAGATAGGGTG	121
Cbo-CBO1120-670s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCT TTTATGCTTAACTTACCTTTCTTTGT	122
Cbo-CBO1120-670s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTTTCAGTCGATAGAGGAAAAGTGCT	123
Cbo-CBO2762-1014s-IBS1	AAAAAGCTTATAAATTCCTTAGATTTACACATATGTCGCGCCCAAGATAGGGTG	124
Cbo-CBO2762-1014s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCACATATAGTAACTTACCTTTCTTTGT	125
Cbo-CBO2762-1014s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGATTTAAATCTGGATAGAGGAAAAGTGCT	126
Cbo-spo0A-249s-EBS1	AAAAAGCTTATAAATTCCTTACCTATCCCAAGGGTGGCCCAAGATAGGGTG	127
Cbo-spo0A-249s-EBS1d	CAGATTGTACAAAATGGGTGATAACAGATAAGTCCCAAGGGTTAACTTACCTTTCTTTGT	128
Cbo-spo0A-249s-EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTCGGTTTATAGGTCGATAGAGGAAAAGTGCT	129

Ejemplo 17: Construcción de un RAM basado en catP

5 Se construyó un RAM que contenía un gen de marcador seleccionable modificado alternativo, a saber *catP*, que confiere resistencia a cloranfenicol o tianfenicol.

10 Se amplificó el ORF *catP* por PCR a partir del molde de ADN de plásmido pMTL5402F mediante el uso de cebadores ligadores-*catP*-F 5'ATACTCAGGCCTCAATTAAC-CCAAGAGATGCTGGTGGTCTTCTGGTGGTATGGTATTTGAAAAAATTGATAAAAAATAGTTGGAACAG-3' (SEQ ID N.º 130) y *catP*-MluI-R1 5'-ATACGC-GTTTAACTATTTATCAATTCCTGCAATTCGTTTACAAAAACGGC-3' (SEQ ID N.º 131), el cual agregó una pequeña parte del intrón *td* y el ligador al 5' del ORF *catP* mediante el uso de una prolongación de cebador.

Se digirió el producto de PCR con *StuI* y *MluI*. Se removió una porción de ErmBtdRAM2 que contenía el promotor *thl*, ligador y la mayor parte del intrón de Grupo I *td* como un fragmento *SpeI/StuI* proveniente de pCR2.1::ErmBtdRAM2. Estos dos fragmentos de restricción se ligaron juntos en pCR2.1::ErmBtdRAM2 linealizado con *SpeI* y *MluI*, para dar el plásmido pCR2.1::RAM-C1 que contiene el nuevo elemento RAM RAM-C1.

La secuencia inmediatamente precedente al ORF *catP* en RAM-C1 es idéntica a la secuencia inmediatamente precedente al ORF *ermB* en ErmBtdRAM2 que contiene el promotor *thl*, ligador y el intrón de Grupo I *td*. La totalidad del elemento RAM-C1 es flanqueado por sitios *MluI* para facilitar su subclonación en el sitio *MluI* del intrón L1.LtrB para ser usado como RAM.

Se puede usar el RAM-C1 o uno de sus derivados como el elemento RAM en un plásmido análogo a pMTL007 para seleccionar eventos redirectores en *Clostridia* sobre la base de la adquisición de resistencia a tianfenicol o cloranfenicol. Se apreciará que el marcador seleccionable requerido para mantener el plásmido en el huésped debe conferir resistencia a un agente diferente de la resistencia conferida por RAM. Por lo tanto, pMTL007 será modificado por reemplazo de su marcador seleccionable *catP* con un marcador seleccionable diferente, tal como *ermB*, que es eficaz en *Clostridia*. Se puede usar un plásmido así modificado para redirigir hacia *Clostridia*.

Tal como se describe en la presente, el promotor ligado operativamente a la región codificadora del marcador seleccionable debe ser capaz de generar la expresión del marcador seleccionable codificado por una única copia del gen de marcador seleccionable en una cantidad suficiente para que el marcador seleccionable altere el fenotipo de la célula de *Clostridia* de manera tal que pueda ser distinguida de la célula de *Clostridia* carente del gen de marcador seleccionable. Si el promotor *thl* en el elemento RAM-C1 no cumple con este criterio, puede ser reemplazado o modificado mediante el uso de los métodos descritos en la presente. De modo similar, si la localización del intrón de Grupo I *td* es inadecuado para impedir la expresión del marcador seleccionable cuando está presente en RAM, o para permitir la expresión del marcador seleccionable cuando ha sido removido por empalme de RAM, se puede modificar su posición. La función de los elementos de RAM puede ser estudiada mediante el uso del sistema de dos plásmidos desarrollado por Karberg *et al.* (2001) (véase Ejemplo 5). En última instancia, se usará RAM-C1 o uno de sus derivados para generar mutantes redirectores en *Clostridia*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ADN que comprende: un intrón de Grupo II modificado que no expresa la transcriptasa inversa
 respecto del intrón de Grupo II modificado, donde el gen de marcador seleccionable comprende una región codificadora
 de marcador seleccionable y un promotor ligado operativamente a dicha región, siendo dicho promotor capaz de
 generar la expresión del marcador seleccionable codificado por una única copia del gen de marcador seleccionable en
 una cantidad suficiente para que el marcador seleccionable altere el fenotipo de una célula bacteriana de la clase
 10 *Clostridia*, de manera tal que pueda ser distinguida de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* carente del gen de
 marcador seleccionable; y un promotor para la transcripción del intrón de Grupo II modificado, estando dicho promotor
 ligado operativamente a dicho intrón de Grupo II modificado; donde el gen de marcador seleccionable modificado
 contiene un intrón de Grupo I situado en orientación hacia adelante respecto del intrón de Grupo II modificado, a fin de
 15 alterar la expresión del marcador seleccionable; donde la molécula de ADN permite la remoción del intrón de Grupo I del
 transcrita de ARN del intrón de Grupo II modificado, a fin de dejar una región codificadora del marcador seleccionable,
 y permite la inserción de dicho transcrita de ARN o una de sus copias de ADN en un sitio de una molécula de ADN en
 una célula bacteriana de la clase *Clostridia*; y donde el marcador seleccionable confiere resistencia a eritromicina a la
 célula bacteriana de la clase *Clostridia*.
- 20 2. La molécula de ADN de la Reivindicación 1, donde el intrón de Grupo II modificado está flanqueado por exones,
 donde los exones permiten el ensamblado de un transcrita de ARN del intrón de Grupo II.
3. La molécula de ADN de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, donde el intrón de Grupo II modificado
 comprende porciones directoras.
- 25 4. La molécula de ADN de la Reivindicación 3, donde las porciones directoras permiten la inserción del transcrita de
 ARN del intrón de Grupo II modificado en un sitio dentro de una molécula de ADN en la célula bacteriana de la clase
Clostridia.
- 30 5. La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula de ADN es un plásmido,
 por ejemplo un plásmido que es un vector de lanzadera de *Escherichia coli* - *Clostridia*.
6. La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un gen codificador
 de una proteína que permite la transferencia conjugativa desde *Escherichia coli* a una célula bacteriana de la clase
 35 *Clostridia*.
7. La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el promotor ligado operativamente a
 la región codificadora del marcador seleccionable es el promotor de los genes *thi* o *ptb* o *adc* de *C. acetobutylicum*, o los
 genes *fdx* o *cpe* de *C. perfringens*.
- 40 8. La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el intrón de Grupo I está situado
 dentro o secuencia arriba de la región codificadora del marcador seleccionable.
9. La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el promotor ligado operativamente al
 45 intrón de Grupo II modificado es un promotor inducible, tal como un promotor inducible por IPTG o xilosa.
10. Un método para introducir una molécula de ácido nucleico en un sitio de una molécula de ADN en una célula
 bacteriana de la clase *Clostridia*, donde el método comprende las etapas de:
 50 (i) proporcionar una célula bacteriana de la clase *Clostridia* con la molécula de ADN de una cualquiera de las
 Reivindicaciones 1 a 9 y una molécula de ADN capaz de expresar una transcriptasa inversa de Grupo II codificada por
 el intrón; y
 (ii) cultivar la célula bacteriana en condiciones que permitan la remoción del intrón de Grupo I del transcrita de ARN del
 intrón de Grupo II modificado y la inserción de dicho transcrita de ARN que contiene el gen de marcador seleccionable
 o una de sus copias de ADN en dicho sitio;
 55 donde el sitio está de preferencia situado dentro de un gen o dentro de una porción de ADN que afecte la expresión de
 un gen y/o está situado dentro del genoma bacteriano; y donde, en la etapa (i), la molécula de ADN capaz de expresar
 una transcriptasa inversa de Grupo II codificada por el intrón es opcionalmente la misma que la molécula de ADN de
 una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9.
- 60 11. El método de la Reivindicación 10 que además comprende cultivar la célula bacteriana de la clase *Clostridia* en
 condiciones que permiten la expresión del marcador seleccionable; y que además, de preferencia también comprende
 seleccionar la célula bacteriana de la clase *Clostridia* basada sobre un fenotipo alterado, conferido por el marcador
 seleccionable; y que además, de preferencia también comprende la etapa de aislar un único clon de células derivado de
 la célula obtenida en la Reivindicación 10.
- 65

12. La molécula de ADN de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o el método de las Reivindicaciones 10 u 11, donde la célula bacteriana de la clase *Clostridia* es del género *Clostridium*, tal como *C. thermocellum* o *C. acetobutylicum* o *C. difficile* o *C. botulinum* o *C. perfringens* o *C. beijerinckii* o *C. tetani* o *C. cellulyticum* o *C. septicum*.
- 5 13. Un método para dirigir una molécula de ácido nucleico a un sitio seleccionado de una molécula de ADN en una célula bacteriana de la clase *Clostridia*, donde el método comprende:
 (i) proporcionar una célula bacteriana de la clase *Clostridia* con la molécula de ADN de la Reivindicación 3 y una molécula de ADN capaz de expresar una transcriptasa inversa de Grupo II codificada por el intrón; y
 10 (ii) cultivar la célula bacteriana en condiciones que permiten remover el intrón de Grupo I del transcripto de ARN del intrón de Grupo II modificado e insertar dicho transcripto de ARN, que contiene el gen de marcador seleccionable o una de sus copias de ADN en dicho sitio seleccionado; donde el sitio seleccionado es de preferencia un gen o una porción de ADN que afecta la expresión de un gen.
14. Una célula bacteriana mutante de la clase *Clostridia* que comprende una molécula de ADN que comprende un sitio que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico comprende:
 15 un intrón de Grupo II modificado que no expresa la transcriptasa inversa codificada por el intrón, pero que contiene un gen de marcador seleccionable en la orientación inversa respecto del intrón de Grupo II modificado, donde el gen de marcador seleccionable comprende una región codificadora de un marcador seleccionable y un promotor ligado operativamente a dicha región, donde el promotor es capaz de generar la expresión del marcador seleccionable
 20 codificado por una única copia del gen del marcador seleccionable en una cantidad suficiente para que el marcador seleccionable altere el fenotipo de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* de manera tal que pueda ser distinguida de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* carente del gen de marcador seleccionable, donde el marcador seleccionable confiere resistencia a eritromicina a la célula bacteriana de la clase *Clostridia*;
 25 donde el sitio está situado de preferencia dentro de un gen o dentro de una porción de ADN que afecte la expresión de un gen y/o está situado dentro del genoma bacteriano.
15. Una molécula de ADN, tal como un plásmido, que comprende un gen de resistencia modificado que contiene un intrón de Grupo I situado en orientación inversa respecto del gen de resistencia modificado que altera la expresión de la resistencia, donde cuando se transcribe el intrón de Grupo I, es capaz de autoextraerse del transcripto de ARN, y donde
 30 la resistencia es resistencia a eritromicina.
16. La molécula de ADN de la Reivindicación 15, donde el gen de resistencia modificado comprende un promotor que es capaz de provocar la expresión de resistencia codificado por una única copia del gen de resistencia modificado en una cantidad suficiente para que la resistencia altere el fenotipo de una célula bacteriana de la clase *Clostridia* de manera tal
 35 que pueda ser distinguida de la célula bacteriana de la clase *Clostridia* carente del gen de resistencia modificado.
17. Uso de una molécula de ADN de conformidad con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 o 15 o 16 en la preparación de una célula bacteriana mutante de la clase *Clostridia*.

Modelo de estructura secundaria de intrón L1.LtrB

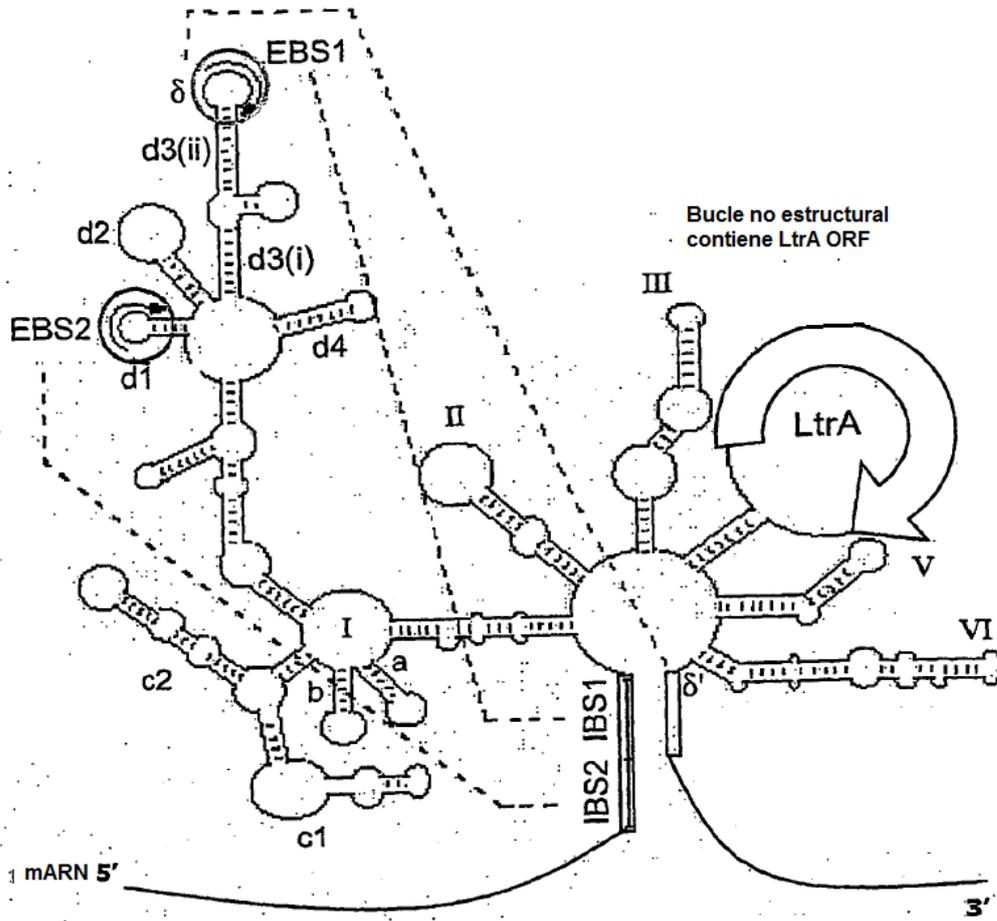


Figura 1A

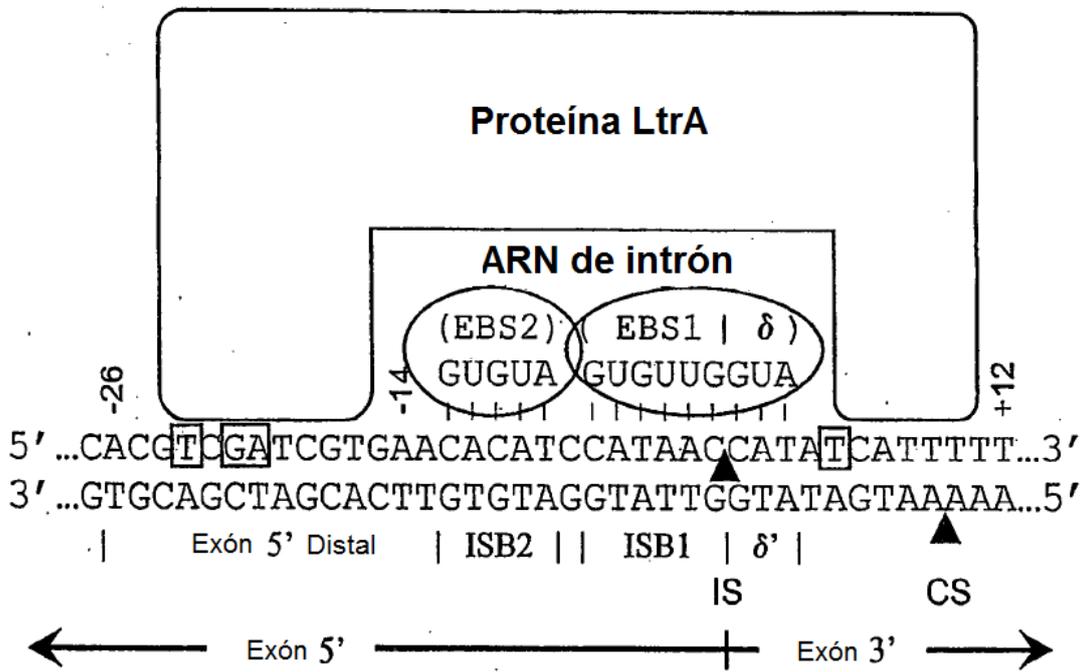


Figura 1B

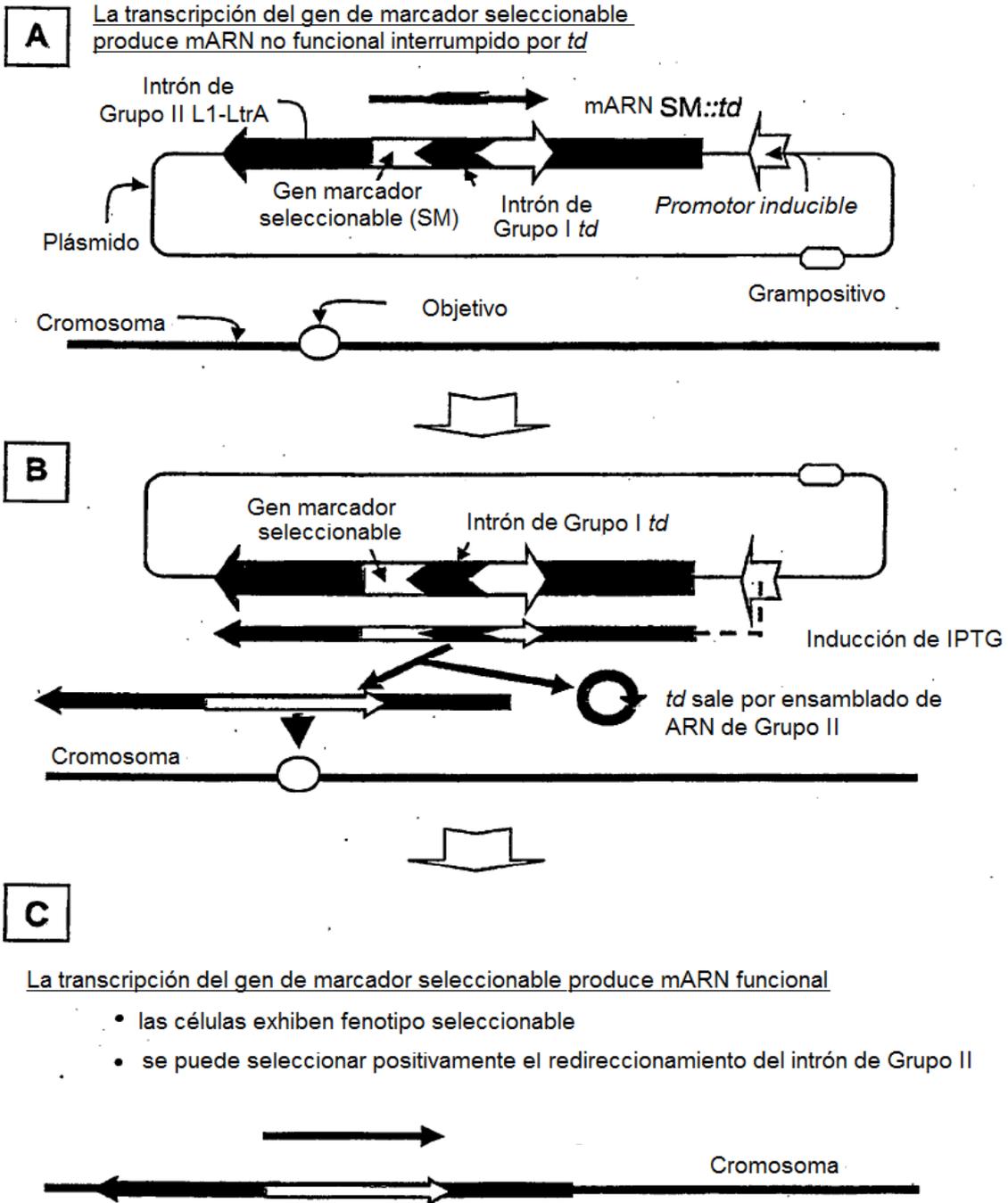


Figura 2

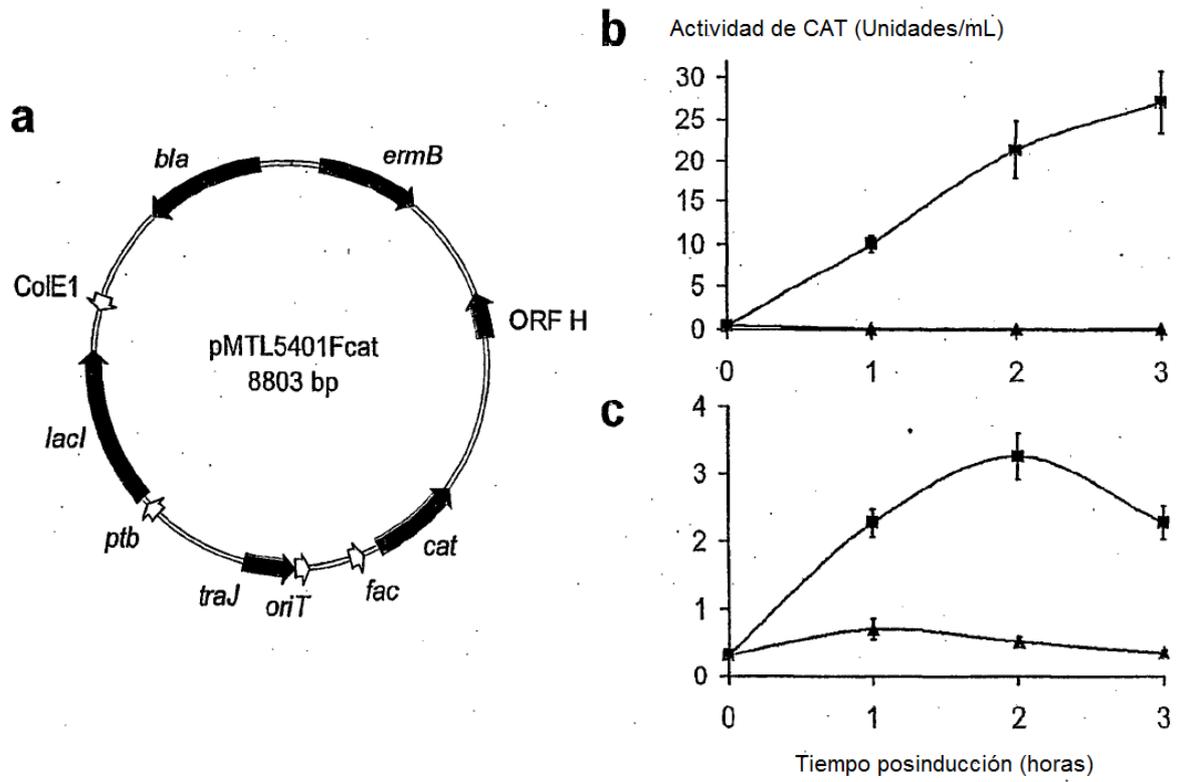


Figura 3

Marco 1

Secuencia de aminoácidos	D	P	R	D/E
Secuencia de nucleótidos	GAC	CCA	AGA	GA

Marco 2

Secuencia de aminoácidos	R/G	P	K	R
Secuencia de nucleótidos	GA	CCC	AAG	AGA

Marco 3

Secuencia de aminoácidos	'X'	T	Q	E	'Z'
Secuencia de nucleótidos	G	ACC	CAA	GAG	A

Figura 4

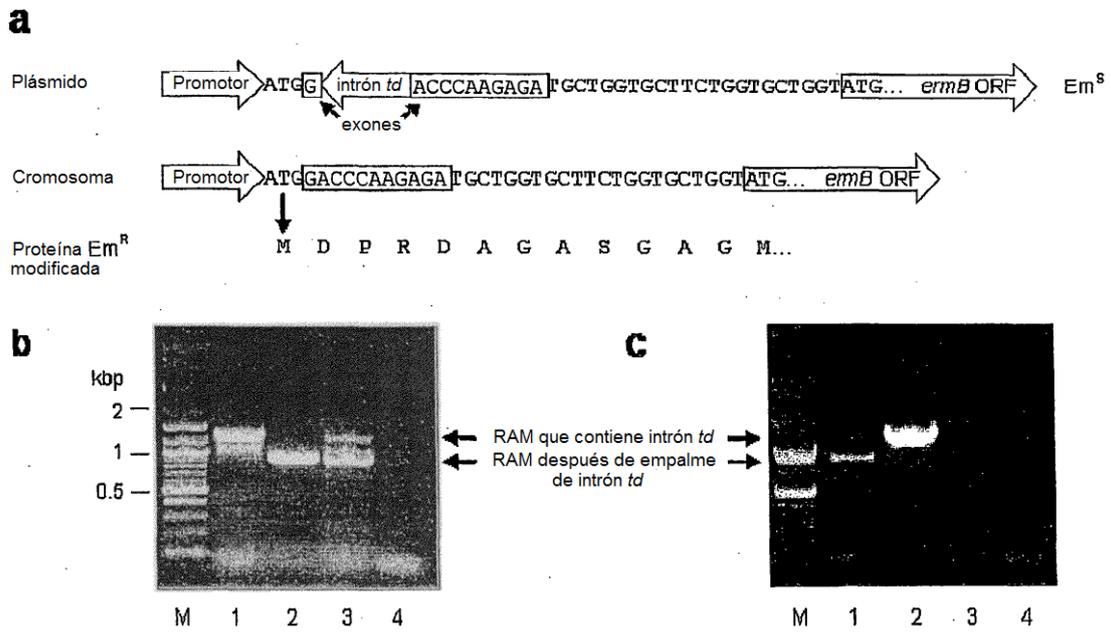
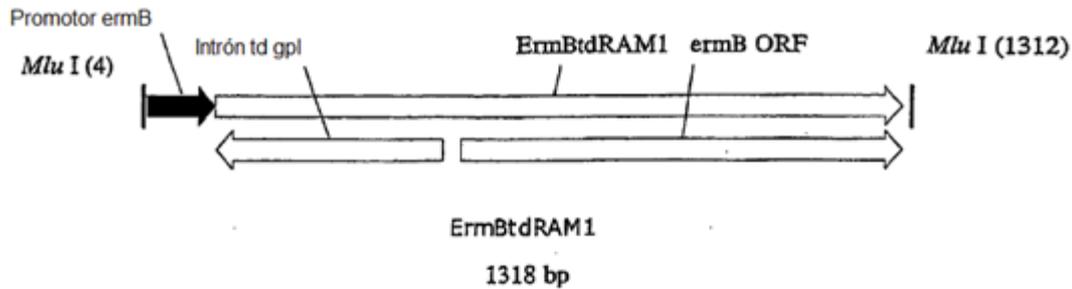


Figura 5



<u>Posición</u>	<u>Característica</u>
4	sitio MluI
9-130	Promotor ermB
131-1297	Todo ErmBtdRAM1 ORF incluso ligador e interrumpido por el intrón de Grupo I <i>td</i> Intrón de Grupo I <i>td</i>
135-527 (c)	Intrón de Grupo I <i>td</i> (con eliminación de IEP)
560-1297	ermB ORF original
1312	sitio MluI

(c) indica característica presente en la cadena complementaria

Secuencia **ErmBtdRAM1**

```

CTACGCGTGG AAATAAGACT TAGAAGCAAA CTTAAGAGTG TGTGATAGT GCAGTATCTT 60
AAAATTTTGT ATAATAGGAA TTGAAGTTAA ATTAGATGCT AAAAATTTGT AATTAAGAAG 120
GAGTGATTAC ATGGCATTAT GTTCAGATAA GGTCGTTAAT CTTACCCCGG AATTATATCC 180
AGCTGCATGT CACCATGCAG AGCAGACTAT ATCTCCAAC TGTAAAGCA AGTTGTCTAT 240
CGTTTCGAGT CACTTGACCC TACTCCCCAA AGGGATAGTC GTTAGGCATT TATGTAGAAG 300
CAATCCATT TATCAGATTT TACACGATAA GTAACATAAC CAGACGAAAT TTTCTCTAGA 360
GAAAGTATTT TTAATCTGAT AAATCCGCT TTTCATAAAT ACCTCTTTAA ATATAGAAGT 420
ATTTATTAAA GGGCAGTCCT ACAATTTAGC ACGGGATTGT CTACTAGAGA GGTCCCCCGT 480
TTAGATAGAT TACAAGTATA AGTCACCTTA TACTCAGGCC TCAATTAACC CAAGAGATGC 540
TGGTGCTTCT GGTGCTGGTA TGAACAAAA TATAAAATAT TCTCAAACT TTTTAACGAG 600
TGAAAAAGTA CTAACCAAAA TAATAAAACA ATTGAATTTA AAAGAAACCG ATACCGTTTA 660
CGAAATFGGA ACAGGTAAG GGCATTTAAC GACGAAACTG GCTAAAATAA GTAACAGGT 720
AACGCTATT GAATTAGACA GTCATCTATT CAACTTATCG TCAGAAAAAT TAAACTGAA 780
TACTCGTGTC ACTTTAATTC ACCAAGATAT TCTACAGTTT CAATCCCTA ACAAACAGAG 840
GTATAAAAT GTTGGGAGTA TTCCTTACCA TTTAAGCACA CAAATTATTA AAAAAGTGGT 900
TTTGAAAAGC CATGCGTCTG ACATCTATCT GATTGTTGAA GAAGGATTCT ACAAGCGTAC 960
CTTGATATT CACCGAACAC TAGGGTTGCT CTTGCACACT CAAGTCTCGA TTCAGCAATT 1020
GCTTAAGCTG CCAGCGGAAT GCTTTCATCC TAAACCAAAA GTAAACAGTG TCTTAATAAA 1080
ACTTACCCGC CATAACACAG ATGTTCCAGA TAAATATTGG AAGCTATATA CGTACTTTGT 1140
TTCAAAATGG GTCAATCGAG AATATCGTCA ACTGTTTACT AAAAATCAGT TTCATCAAGC 1200
AATGAAACAC GCCAAAGTAA ACAATTTAAG TACCGTTACT TATGAGCAAG TATTGTCTAT 1260
TTTTAATAGT TATCTATTAT TTAACGGGAG GAAATAATTC TATGAGTCGC ACGCGTTC 1318
    
```

Figura 6

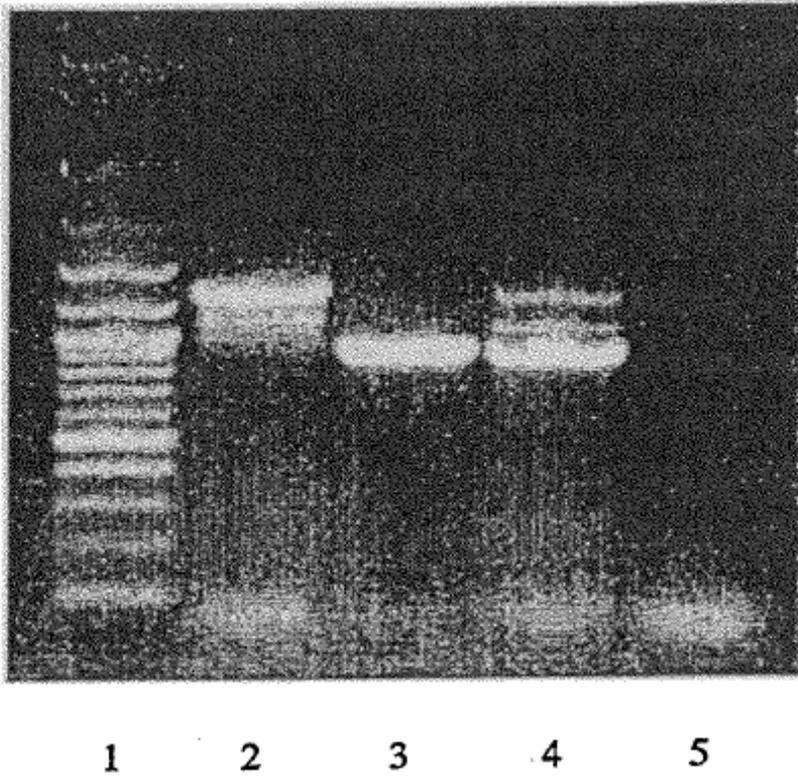
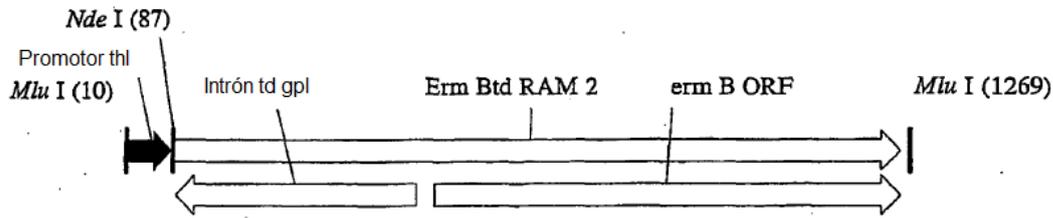


Figura 7

Promotor WT <i>th1</i>	TTGATAAAAATAATAATAGTGGGTATAAT
	x -----17bp-----
Consenso	TTGACA-----17bp-----TATAAT
	xxx -----16bp----- x
Promotor mutante <i>th12</i>	TTccTA-AAATAATAATAGTGGGTAAaAAT

Figura 9



ErmBtdRAM2
1275 bp

<u>Posición</u>	<u>Característica</u>
10	Sitio MluI
15-84	Promotor <i>thl</i> con eliminación interna
85-90	Sitio NdeI
88-1254	Todo ErmBtdRAM2 ORF incluso ligador e interrumpido por intrón de Grupo I <i>td</i>
92-484 (c)	Intrón de Grupo I <i>td</i> (con eliminación de IEP)
517-1254	<i>ermB</i> ORF original
1269	Sitio MluI

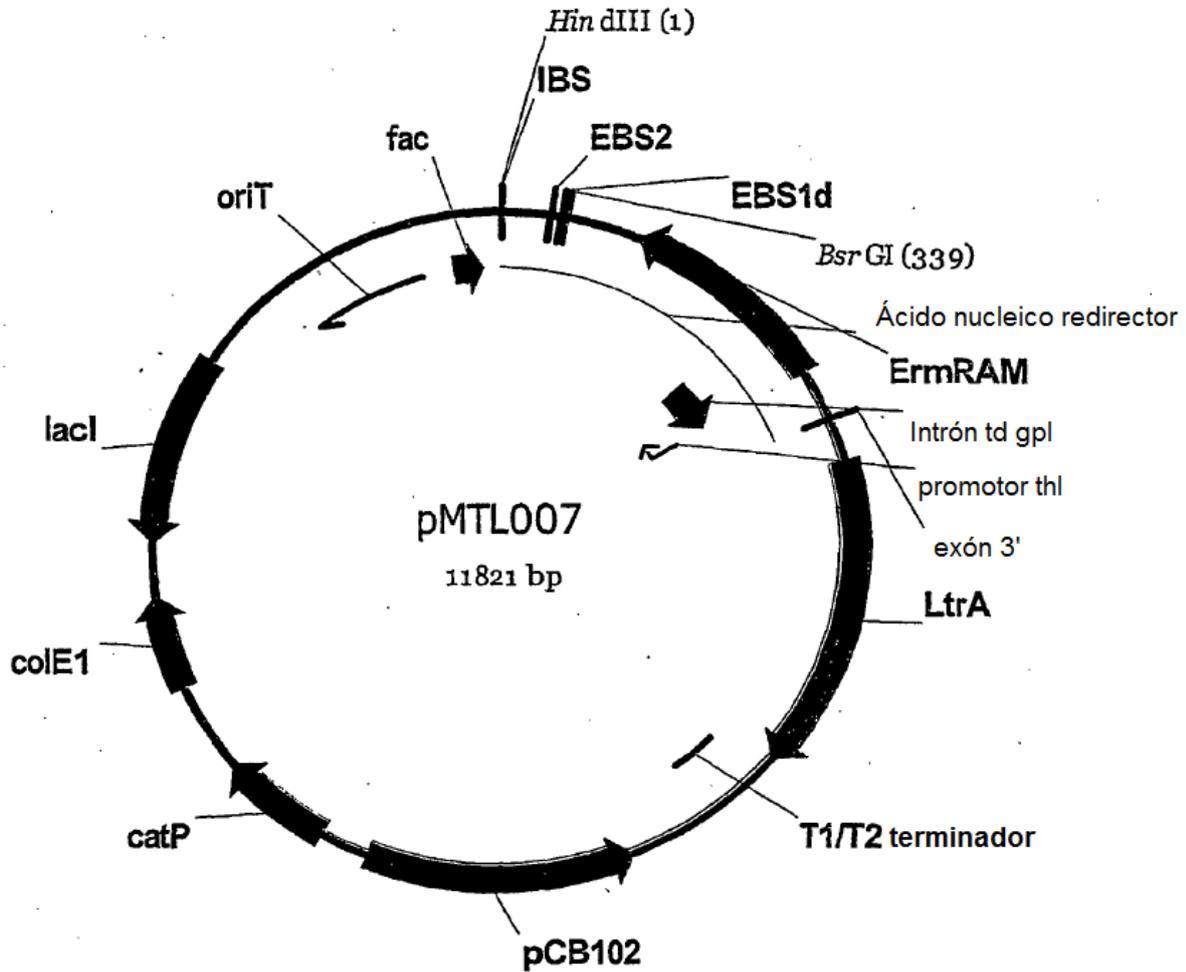
(c) Indica característica presente en la cadena complementaria

Secuencia ErmBtdRAM2

```

CTACTAGTAC GCGTTATATT GATAAAAATA ATAATAGTGG GTATAATTAA GTTGTTAGAG 60
AAAACGTATA AATTAGGAGG GATTCATATG GCATTATGTT CAGATAAGGT CGTTAATCTT 120
ACCCCGGAAT TATATCCAGC TGCATGTCAC CATGCAGAGC AACTATATC TCCAACTTGT 180
TAAAGCAAGT TGTCTATCGT TTCGAGTCAC TTGACCCTAC TCCCAAAGG GATAGTCGTT 240
AGGCATTTAT GTAGAACCAA TTCCATTTAT CAGATTTTAC ACGATAAGTA ACTAATCCAG 300
ACGAAATTTT CTCTAGAGAA AGTATTTTTA ATCTGATAAA TTCCGCTTTT CATAAATACC 360
TCTTTAAATA TAGAAGTATT TATTAAAGGG CAGTCCTACA ATTTAGCACG GGATTGTCTA 420
CTAGAGAGGT TCCCGTTTTA GATAGATTAC AAGTATAAGT CACCTTATAC TCAGGCCTCA 480
ATTAACCCAA GAGATGCTGG TGCTTCTGGT GCTGGTATGA ACAAATATAT AAAATATTCT 540
CAAACTTTT TAACGAGTGA AAAAGTACTC AACCAATAA TAAAACAATT GAATTTAAAA 600
GAAACCGATA CCGTTTACGA AATTGGAACA GGTAAGGGC ATTTAACGAC GAAACTGGCT 660
AAAATAAGTA AACAGGTAAC GTCTATTGAA TTAGACAGTC ATCTATTCAA CTTATCGTCA 720
GAAAAATTAA AACTGAATAC TCGTGTCACT TTAATTCACC AAGATATTCT ACAGTTTCAA 780
TTCCCTAACA AACAGAGGTA TAAAATTGTT GGGAGTATTC CTTACCATT AAGCACACAA 840
ATTATTAATA AAGTGGTTTT TGAAAGCCAT GCGTCTGACA TCTATCTGAT TGTTGAAGAA 900
GGATTCTACA AGCGTACCTT GGATATTCAC CGAACACTAG GGTTGCTCTT GCACACTCAA 960
GTCTCGATTC AGCAATTGCT TAAGCTGCCA GCGGAATGCT TTCATCCTAA ACCAAAAGTA 1020
AACAGTGCTT TAATAAACT TACCCGCCAT ACCACAGATG TTCCAGATAA ATATTGGAAG 1080
CTATATACGT ACTTTGTTTC AAAATGGGTC AATCGAGAAT ATCGTCAACT GTTTACTAAA 1140
AATCAGTTTC ATCAAGCAAT GAAACACGCC AAAGTAAACA ATTTAAGTAC CGTTACTTAT 1200
GAGCAAGTAT TGTCTATTTT TAATAGTTAT CTATTATTTA ACGGGAGGAA ATAATTCTAT 1260
GAGTCGCACG CGTTC 1275
    
```

Figura 10



<u>Posición</u>	<u>Característica</u>
1-2214	Ácido nucleico redirector
1	Sitio <i>HindIII</i>
7-30	IBS
253-257	EBS2
307-314	EBS1d
339	<i>BsrGI</i>
740-1906 (c)	<i>ErmBtdRAM2</i>
740-1477 (c)	<i>ErmB</i> ORF
1510-1902	Intrón de Grupo I <i>td</i> (con eliminación de IEP)
1910-1979 (c)	Promotor <i>thl</i> (que contiene eliminación interna)
2205-2214	Exón 3' del intrón de Grupo II L1.LtrB

Figura 11

2451-4250	LtrA ORF
4387-4676	T1/T2 terminadores de transcripción
5153-6628 (c)	replicón pCB102
6893-7516	gen <i>catP</i>
8034-8579	replicón ColE1
8877-9968 (c)	<i>lacI</i> ORF
10563-11315 (c)	origen de transferencia <i>oriT</i>
11526-11728	promotor <i>fac</i>

(c) Indica característica presente en la cadena complementaria

Secuencia pMTL5402FlacZTTErmBtdRAM2 (aka pMTL007)

```

AGCTTATAAT TATCCTTACG TGACGGTTAA GTGCGCCCAG ATAGGGTGTT AAGTCAAGTA 60
GTTTAAGGTA CFACTCTGTA AGATAACACA GAAAACAGCC AACCTAACCG AAAAGCGAAA 120
GCTGATACGG GAACAGAGCA CGGTTGGAAA GCGATGAGTT ACCTAAAGAC AATCGGGTAC 180
GACTGAGTCG CAATGTTAAT CAGATATAAG GTATAAGTTG TGTTTACTGA ACGCAAGTTT 240
CTAATTTCCG TTTACGTCG ATAGAGGAAA GTGCTGAAA CCTCTAGTAC AAAGAAAGGT 300
AAGTTACGTT AACCGACTTA TCTGTTATCA CCACATTTGT ACAATCTGTA GGAGAACCTA 360
TGGGAACGAA ACGAAAGCGA TGCCGAGAAT CTGAATTTAC CAAGACTTAA CACTAACTGG 420
GGATACCCTA AACAAGAATG CCTAATAGAA AGGAGGAAA AGGCTATAGC ACTAGAGCTT 480
GAAAATCTTG CAAGGGTACG GAGTACTCGT AGTAGTCTGA GAAGGGTAAC GCCCTTTACA 540
TGGCAAAGGG GTACAGTTAT TGTGTTACTAA AATTAAAAAT TGATTAGGGA GGAAAACCTC 600
AAAATGAAAC CAACAATGGC AATTTTAGAA AGAATCAGTA AAAATTCACA AGAAAATATA 660
GACGAAGTTT TTACAAGACT TTATCGTTAT CTTTTACGTC CAGATATTTA TTACGTGGCG 720
ACGCGTGCGA CTCATAGAAT TATTTCTCCT CGTTAAATAA TAGATAACTA TTAATAATAG 780
ACAATACTTG CTCATAAGTA ACGGTACTTA AATTGTTTAC TTTGGCGTGT TTCATTGCTT 840
GATGAAACTG ATTTTTAGTA AACAGTTGAC GATATCTCG ATTGACCCAT TTTGAAACAA 900
AGTACGTATA TAGCTTCCAA TATTTATCTG GAACATCTGT GGTATGGCGG GTAAGTTTTA 960
TTAAGACACT GTTACTTTT GGTTTAGGAT GAAAGCATT CCGTGGCAGC TTAAGCAATT 1020
GCTGAATCGA GACTTGAGTG TGCAAGAGCA ACCCTAGTGT TCGGTGAATA TCCAAGGTAC 1080
GCTTGTAGAA TCCTTCTTCA ACAATCAGAT AGATGTCAGA CGCATGGCTT TCAAAAACCA 1140
CTTTTTTAAT AATTTGTGTG CTTAAATGGT AAGGAATACT CCCAACAATT TTATACCTCT 1200
GTTTGTTAGG GAATTGAAAC TGTAGAATAT CTTGGTGAAT TAAAGTGACA CGAGTATTCA 1260
GTTTTAATTT TTCTGACGAT AAGTTGAATA GATGACTGTC TAATTCATA GACGTTACCT 1320
GTTTACTTAT TTTAGCCAGT TTCGTCGTTA AATGCCCTTT ACCTGTTCCA ATTTTCGTAA 1380
CGGTATCGGT TTCTTTTAAA TTCAATTGTT TTATATTTG GTTGAGTACT TTTTCACTCG 1440
TTAAAAAGTT TTGAGAATAT TTTATATTTT TGTTCATACC AGCACCAGAA GCACCAGCAT 1500
CTCTTGGGTT AATTGAGGCC TGAGTATAAG GTGACTTATA CTTGTAATCT ATCTAAACGG 1560
GGAACCTCTC TAGTAGACAA TCCCCTGCTA AATTGTAGGA CTGCCCTTTA ATAAATACTT 1620
CTATATTTAA AGAGGTATTT ATGAAAAGCG GAATTTATCA GATTAAAAAT ACTTCTCTA 1680
GAGAAAATTT CGTCTGGATT AGTTACTTAT CGTGTAATAT CTGATAAATG GAATTGGTTC 1740
TACATAAATG CCTAACGACT ATCCCTTTGG GGAGTAGGGT CAAGTGACTC GAAACGATAG 1800
ACAACTTGCT TTAACAAGTT GGAGATATAG TCTGCTCTGC ATGGTGACAT GCAGCTGGAT 1860
ATAATCCGGG GGTAAGATTA ACGACCTTAT CTGAACATAA TGCCATATGA ATCCCTCCTA 1920
ATTTATACGT TTTCTCTAAC AACTTAATTA TACCCACTAT TATTATTTTT ATCAATATA 1980
CGCGTTGGGA AATGGCAATG ATAGCGAAAC AACGTAAAAC TCTTGTTGTA TGCTTTCATT 2040
GTCATCGTCA CGTGATTCAT AAACACAAGT GAATGTCGAC AGTGAATTTT TACGAACGAA 2100
CAATAACAGA GCCGTATACT CCGAGAGGGG TACGTACGGT TCCCGAAGAG GGTGGTGCAA 2160

```

Figura 11 (cont.)

ACCAGTCACA GTAATGTGAA CAAGGCGGTA CCTCCCTACT TCACCATATC ATTTTCTGCA 2220
 GCCCCCTAGA AATAATTTTG TTTAACTTTA AGAAGGAGAT ATACATATAT GGCTAGATCG 2280
 TCCATTCCGA CAGCATCGCC AGTCACTATG GCGTGCTGCT AGCGCTATAT GCGTTGATGC 2340
 AATTTCTATG CACTCGTAGT AGTCTGAGAA GGGTAACGCC CTTTACATGG CAAAGGGGTA 2400
 CAGTTATTGT GTACTAAAT TAAAAATTGA TTAGGGAGGA AAACCTCAA ATGAAACCAA 2460
 CAATGGCAAT TTTAGAAAGA ATCAGTAAAA ATTCACAAGA AAATATAGAC GAAGTTTTTA 2520
 CAAGACTTTA TCGTTATCTT TTACGTCCAG ATATTTATTA CGTGGCGTAT CAAAATTTAT 2580
 ATTCCAATAA AGGAGCTTCC ACAAAGGAA TATTAGATGA TACAGCGGAT GGCTTTAGTG 2640
 AAGAAAAAAT AAAAAAGATT ATTCAATCTT TAAAGACGG AACTTACTAT CCTCAACCTG 2700
 TACGAAGAAT GTATATTGCA AAAAAAGATT CTAAAAAGAT GAGACCTTTA GGAATTCCAA 2760
 CTTTCACAGA TAAATTGATC CAAGAAGCTG TGAGAATAAT TCTTGAATCT ATCTATGAAC 2820
 CGGTATTCGA AGATGTGCTT CACGGTTTTA GACCTCAACG AAGCTGTCA ACAGCTTTGA 2880
 AAACAATCAA AAGAGAGTTT GCGGCGCAA GATGGTTTGT GGAGGGAGAT ATAAAAGGCT 2940
 GCTTCGATAA TATAGACCAC GTTACACTCA TTGGACTCAT CAATCTTAAA ATCAAAGATA 3000
 TGAAAATGAG CCAATTGATT TATAAATTTT TAAAAGCAGG TTATCTGGAA AACTGGCAGT 3060
 ATCACAAAAA TTACAGCGGA ACACCTCAAG GTGGAATCTT ATCTCCTCTT TTGGCCAACA 3120
 TCTATCTTCA TGAATTGGAT AAGTTTGT TTACAATCAA AATGAAGTTT GACCGAGAAA 3180
 GTCCAGAAAAG AATAACACCT GAATATCGGG AGTCCACAA TGAGATAAAA AGAATTTCTC 3240
 ACCGTCTCAA GAAGTTGGAG GGTGAAGAAA AAGCTAAAGT TCTTTTAGAA TATCAAGAAA 3300
 AACGTAAAAA ATTACCCACA CTCCCCTGTA CCTCACAGAC AAATAAAGTA TTGAAATACG 3360
 TCCGGTATGC GGACGACTTC ATTATCTCTG TTAAAGGAAG CAAAGAGGAC TGCAATGGA 3420
 TAAAAGAACA ATTAAACTT TTTATTCATA ACAAGCTAAA AATGGAATTG AGTGAAGAAA 3480
 AAACACTCAT CACACATAGC AGTCAACCCG CTCGTTTTCT GGGATATGAT ATACGAGTAA 3540
 GGAGATCTGG AACGATAAAA CGATCTGGTA AAGTCAAAA GAGAACACTC AATGGGAGTG 3600
 TAGAACTCCT TATTCCTCTT CAAGACAAA TTCGTCAATT TATTTTTGAC AAGAAAATAG 3660
 CTATCCAAA GAAAGATAGC TCATGGTTT CAGTTCACAG GAAATATCTT ATTCGTTCAA 3720
 CAGACTTAGA AATCATCACA ATTTATAATT CTGAACTCCG CGGGATTTGT AATTACTACG 3780
 GTCTAGCAAG TAATTTTAA CAGCTCAATT ATTTTGCTTA TCTTATGGAA TACAGCTGTC 3840
 TAAAAACGAT AGCCTCCAAA CATAAGGGAA CACTTTCAAA AACCATTTCC ATGTTTAAAG 3900
 ATGGAAGTGG TTCGTGGGGG ATCCCCTATG AGATAAAGCA AGGTAAGCAG CGCCGTTATT 3960
 TTGCAAATTT TAGTGAATGT AAATCCCCTT ATCAATTTAC GGATGAGATA AGTCAAGTC 4020
 CTGTATTGTA TGGCTATGCC CGGAATACG TTGAAAACAG GTTAAAAGCT AAATGTTGTG 4080
 AATTATGTGG GACGTCTGAT GAAAATACTT CCTATGAAAT TCACCATGTC AATAAGGTCA 4140
 AAAATCTTAA AGGCAAAGAA AAAATGGAAA TGGCAATGAT AGCGAAACAA CGTAAACTC 4200
 TTGTTGTATG CTTTCATTGT CATCGTCACG TGATTCATAA ACACAAGTGA ATGTCGAGCA 4260
 CCCGTTCTCG GAGCACTGTC CGACCGCTT GGCCGCCGCC CAGTCCTGCT CGCTTCGCTA 4320
 CTTGGAGCCA CTATCGACTA CGCGATCATG GCGACCACAC CCGTCCTGTG GATCGCCAAG 4380
 CTCGCCGATG GTAGTGTGGG GTCTCCCAT GCGAGAGTAG GGAAGTCCA GGCATCAAAT 4440
 AAAACGAAAG GCTCAGTCGA AAGACTGGG CTTTCGTTTT ATCTGTTGTT TGTCGGTGAA 4500
 CGCTCTCCTG AGTAGGACAA ATCCGCCGG AGCGGATTTG AACGTTGCGA AGCAACGGCC 4560
 CGGAGGGTGG CGGGCAGGAC GCCCGCCATA AACTGCCAGG CATCAAATTA AGCAGAAGGC 4620
 CATCCTGACG GATGGCCTTT TTGCGTTTCT ACAAATCTT CCTGTCGTCA TATCTACAAG 4680
 CCATCCCCC ACAGATACGG TAAACTAGCC TCGTTTTTGC ATCAGGAAAG CAGAACGCCA 4740
 TGAGCGGCCT CATTTCTTAT TCTGAGTTAC AACAGTCCG ACCGCTGTCC GGTAGCTCCT 4800
 TCCGGTGGGC GCGGGGCATG ACTATCGTCG CCGCACTTAT GACTGTCTTC TTTATCATGC 4860
 AACTCGTAGG ACAGTGCCA GCTTGGCACT GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA 4920
 AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCTTTTCG CCAGCTGGCG 4980
 TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA 5040
 ATGGCGCTAG CGAAGAGATG CAGCAGCCAT TATTTTTTTG AACAATTGAC AATTCATTTT 5100
 TTATTTTTTA TTAAGTGATA GTCAAAAAGC ATAACAGTGC TGAATAGAAA GAAATTTACA 5160
 GAAAAGAAAA TTATAGAATT TAGTATGATT AATTATACTC ATTTATGAAT GTTTAATTGA 5220

Figura 11 (cont.)

ATACAAAAA AAATACTTGT TATGTATTCA ATTACGGGTT AAAATATAGA CAAGTTGAAA 5280
 AATTTAATAA AAAAATAAGT CCTCAGCTCT TATATATTAA GCTACCAACT TAGTATATAA 5340
 GCCAAAACTT AAATGTGCTA CCAACACATC AAGCCGTTAG AGAACTCTAT CTATAGCAAT 5400
 ATTTCAAATG TACCGACATA CAAGAGAAAC ATTAECTATA TATATTCAAT TTATGAGATT 5460
 ATCTTAACAG ATATAAATGT AAATTGCAAT AAGTAAGATT TAGAAGTTTA TAGCCTTTGT 5520
 GTATTGGAAG CAGTACGCAA AGGCTTTTTT ATTTGATAAA AATTAGAAGT ATATTTATTT 5580
 TTTTCATAAT AATTTATGAA AATGAAAGGG GGTGAGCAAA GTGACAGAGG AAAGCAGTAT 5640
 CTTATCAAAAT AACAAGGTAT TAGCAATATC ATTATTGACT TTAGCAGTAA ACATTATGAC 5700
 TTTTATAGTG CTTGTAGCTA AGTAGTACGA AAGGGGGAGC TTTAAAAAGC TCCTTGGAAAT 5760
 ACATAGAATT CATAAATTA TTTATGAAA GAAGGGCGTA TATGAAAAC TGTAAAAAT 5820
 GCAAAGAGTT TATTAAGAT ACTGAAATAT GCAAATACA TTCGTTGATG ATTCATGATA 5880
 AAACAGTAGC AACCTATTGC AGTAAATACA ATGAGTCAAG ATGTTTACAT AAAGGGAAAG 5940
 TCCAATGTAT TAATTGTTCA AAGATGAACC GATATGGATG GTGTGCCATA AAAATGAGAT 6000
 GTTTTACAGA GGAAGAACAG AAAAAAGAAC GTACATGCAT TAAATATTAT GCAAGGAGCT 6060
 TAAAAAAGC TCATGTAAAG AAGAGTAAAA AGAAAAATA ATTTATTTAT TAATTTAATA 6120
 TTGAGAGTGC CGACACAGTA TGCCTAAAA AATATATCTG TGGTGTAGTG AGCCGATACA 6180
 AAAGGATAGT CACTCGCATT TTCATAATAC ATCTTATGTT ATGATTATGT GTCGGTGGGA 6240
 CTTACAGACG AAAACCCACA ATAAAAAAG AGTTCGGGGT AGGGTTAAGC ATAGTTGAGG 6300
 CAACTAAACA ATCAAGCTAG GATATGCAGT AGCAGACCGT AAGGTCGTTG TTTAGGTGTG 6360
 TTGTAATACA TACGCTATTA AGATGTAAAA ATACGGATAC CAATGAAGGG AAAAGTATAA 6420
 TTTTTGGATG TAGTTTGTGTT GTTCATCTAT GGGCAAATA CGTCCAAAGC CGTTTCCAAA 6480
 TCTGCTAAAA AGTATATCCT TTCTAAAATC AAAGTCAAGT ATGAAATCAT AAATAAAGTT 6540
 TAATTTTGAA GTTATTATGA TATTATGTTT TTCATTAAA ATAAATTAAG TATATAGAAT 6600
 AGTTTAATAA TAGTATATAC TTAATGTGAT AAGTGTCTGA CAGCTGACCG GTCTAAAGAG 6660
 GTCCCTAGCG CCTACGGGGA ATTTGTATCG ATAAGGGGTA CAAATCCCA CTAAGCGCTC 6720
 GGCGGGGATC GATCCCGGGT ACGTACCCGG CAGTTTTTCT TTTTCGGCAA GTGTTCAAGA 6780
 AGTTATTAAG TCGGGAGTGC AGTCGAAGTG GGCAAGTTGA AAAATTCACA AAAATGTGGT 6840
 ATAATATCTT TGTTCAATAG AGCGATAAAC TTGAATTTGA GAGGGAECTT AGATGGTATT 6900
 TGAAAAAAT GATAAAAAATA GTTGGAACAG AAAAGAGTAT TTTGACCACT ACTTTGCAAG 6960
 TGTACTTGT ACCTACAGCA TGACCCTTAA AGTGGATATC ACACAAATA AGGAAAAGGG 7020
 AATGAACTA TATCCTGCA TGCTTTATTA TATTGCAATG ATTGTAAACC GCCATTGAGA 7080
 GTTTAGGACG GCAATCAATC AAGATGGTGA ATTTGGGATA TATGATGAGA TGATACCAAG 7140
 CTATACAATA TTTTACAATG ATACTGAAAC ATTTTCCAGC CTTTGGACTG AGTGTAAAGTC 7200
 TGACTTTAAA TCATTTTTAG CAGATTATGA AAGTGATACG CAACGGTATG GAAACAATCA 7260
 TAGAATGGAA GGAAAGCCAA ATGCTCCGGA AAACATTTTT AATGTATCTA TGATACCGTG 7320
 GTC AACCTTC GATGGCTTTA ATCTGAATTT GCAGAAAGGA TATGATTATT TGATTCTCTAT 7380
 TTTTACTATG GGGAAATATT ATAAAGAAGA TAACAAAATT ATACTTCCTT TGGCAATTCA 7440
 AGTTCATCAC GCAGTATGTG ACGGATTTCA CATTTGCCGT TTTGTAAACG AATTGCAGGA 7500
 ATTGATAAAT AGTTAACTTC AGGTTTGTCT GTAACATAAA ACAAGTATTT AAGCAAAAAC 7560
 ATCGTAGAAA TACGGTGTGTT TTTGTTACCC TAAAATCTAC AATTTTATAC ATAACCACAG 7620
 GTTAGTACAA AGACCTTGTG TTTCTTTTTG AAAGGCTTAA AACAAGGATT TTTCTTTGAT 7680
 TTAAGCCCCG AAAAGCAACA CAACCAAGGT TTTAGTATCA ATCTGTGGTT TTTATATTTT 7740
 CAGAGACCGG TCAGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA 7800
 GGTGCCTCAC TGATTAAGCA TTGTAACCTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG 7860
 ATTGATTTAA AACTTCATTT TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT 7920
 CTCATGACCA AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA 7980
 AAGATCAAAG GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA 8040
 AAAAAACCAC CGTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT 8100
 CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCTTCT AGTGTAGCCG 8160
 TAGTTAGGCC ACCACTTCAA GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC 8220
 CTGTTACCAG TGGCTGCTGC CAGTGCCGAT AAGTCGTCTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA 8280

Figura 11 (cont.)

CGATAGTTAC	CGGATAAGGC	GCAGCGGTCG	GGCTGAACGG	GGGGTTCGTG	CACACAGCCC	8340
AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	CACCGAACTG	AGATACCTAC	AGCGTGAGCA	TTGAGAAAGC	8400
GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	AAAGGCGGAC	AGGTATCCGG	TAAGCGGCAG	GGTCGGAACA	8460
GGAGAGCGCA	CGAGGGAGCT	TCCAGGGGGA	AACGCCTGGT	ATCTTTATAG	TCCTGTCCGG	8520
TTTCGCCACC	TCTGACTTGA	GCGTCGATTT	TTGTGATGCT	CGTCAGGGGG	GCGGAGCCTA	8580
TGAAAAACG	CCAGCAACGC	GCCCTTTTTA	CGGTTCCTGG	CCTTTTGCTG	GCCTTTTGCT	8640
CACATGTTCT	TTCTGCGTTF	ATCCCCTGAT	TCTGTGGATA	ACCGTATTAC	CGCCTTTGAG	8700
TGAGCTGATA	CCGCTCGCCG	CAGCCGAACG	ACCGAGCGCA	GCGAGTCAGT	GAGCGAGGAA	8760
GCGGAAGCAG	TAAGACGGGT	AAGCCTGTTG	ATGATACCGC	TGCCTTACTG	GGTGCATTAG	8820
CCAGTCTGAA	TGACCTGTCA	CGGGATAAAT	CCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	8880
TGCCCGCTTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	8940
CGGGAGAGAG	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCC	AGGGTGGTTT	TTCTTTTCAC	CAGTGAGACG	9000
GGCAACAGCT	GATTGCCCTT	CACCGCTGG	CCCTGAGAGA	GTTGCAGCAA	GCGGTCCACG	9060
CTGGTTTGCC	CCAGCAGGCG	AAAATCCTGT	TTGATGGTGG	TTGACGGCCG	GATATAACAT	9120
GAGCTGTCTT	CGGTATCGTC	GTATCCCCT	ACCGAGATAT	CCGCACCAAC	GCGCAGCCCG	9180
GACTCGGTAA	TGGCGCGCAT	TGCGCCCAGC	GCCATCTGAT	CGTTGGCAAC	CAGCATCGCA	9240
GTGGGAACGA	TGCCCTCATT	CAGCATTGTC	ATGGTTTGTT	GAAAACCGGA	CATGGCACTC	9300
CAGTCGCCTT	CCCGTTCCGC	TATCGGCTGA	ATTTGATTGC	GAGTGAGATA	TTTATGCCAG	9360
CCAGCCAGAC	GCAGACGCGC	CGAGACAGAA	CCTAATGGGC	CCGCTAACAG	CGCGATTTGC	9420
TGGTGACCCA	ATGCGACCAG	ATGCTCCACG	CCCAGTCGCG	TACCGTCTTC	ATGGGAGAAA	9480
ATAATACTGT	TGATGGGTGT	CTGGTCAGAG	ACATCAAGAA	ATAACGCCGG	AACATTAGTG	9540
CAGGCAGCTT	CCACAGCAAT	GGCATCCTGG	TCATCCAGCG	GATAGTTAAT	GATCAGCCCA	9600
CTGACGCGTT	GCGCGAGAAG	ATTGTGCACC	GCCGCTTTAC	AGGCTTCGAC	GCCGCTTCGT	9660
TCTACCATCG	ACACCACCAC	GCTGGCACCC	AGTTGATCGG	CGCGAGATTT	AATCGCCCGG	9720
ACAATTTGCG	ACGGCGCGTG	CAGGGCCAGA	CTGGAGGTGG	CAACGCCAAT	CAGCAACGAC	9780
TGTTTGCCCG	CCAGTTGTTG	TGCCACGCGG	TTGGGAATGT	AATTCAGCTC	CGCCATCGCC	9840
GCTTCCACTT	TTTCCC CGCT	TTTCGCAGAA	ACGTGGCTGG	CCTGGTTCAC	CACGCGGGAA	9900
ACGGTCTGAT	AAGAGACACC	GGCATACTCT	GCGACATCGT	ATAACGTTAC	TGTTTTCATA	9960
TGTTGCACCT	CTACTTTAAT	AATTTTAAAC	TTTTATATAT	GATTAATTTA	ATTGTTTGTT	10020
AAATTTATAT	CAATCAATGC	TATGAATATT	TCTTTATACC	TTATTGTAAC	AAAAAATAT	10080
TGGAAATGTT	GAATTTTCAG	AATATTTATT	TTATTATATT	ATTAATTTTA	TATATTCATT	10140
TTTATAAGAT	TTCACAACAC	GAACGTAATA	TAATATATCT	TCCTCATCTT	CTGAAAAGAT	10200
TATACTAATT	CTATTCATGT	TACTTATAAT	CCTATTTTGG	TAAATCGAAT	TTTTCAATTA	10260
TATGTTCCGG	AACCTTTATC	CCATCAACAG	CCGCTGATAT	TATACCACCT	GCAAATCCTG	10320
CCCCTTCTCC	AGTTGGATAA	AGTCCGCATA	CATTTATACT	TTCAAGTGAA	GCATTTCTAT	10380
TCAATCTAAC	TGGTGCTGAT	GTTCTTGCT	CAATTCCTCGT	TAAAATTGCA	TCTTCTCTTG	10440
CATACCCTTT	TATCTTTTTA	TCAAAATTTA	TAATTCCTTC	TTAAGAGCC	TCTACAACAT	10500
AATCAGGTAA	ACATTCCTTT	AATTCCTGTA	ATTATCTGCA	GAATTCGCC	TTCTGCTTC	10560
GGGGTCATTA	TAGCGATTTT	TTCCGGTATAT	CCATCCTTTT	TCGCACGATA	TACAGGATTT	10620
TGCCAAAGGG	TTCGTGTAGA	CTTTCCTTGG	TGTATCCAAC	GGCGTCAGCC	GGGCAGGATA	10680
GGTGAAGTAG	GCCCACCCGC	GAGCGGGTGT	TCCTTCTTCA	CTGTCCCTTA	TTCGCACCTG	10740
GCGGTGCTCA	ACGGGAATCC	TGCTCTGCGA	GGCTGGCCGG	CTACCGCCGG	CGTAACAGAT	10800
GAGGGCAAGC	GGATGGCTGA	TGAAACCAAG	CCAACCAGGA	AGGGCAGCCC	ACCTATCAAG	10860
GTGTACTGCC	TTCCAGACGA	ACGAAGAGCG	ATTGAGGAAA	AGGCGGCGGC	GGCCGGCATG	10920
AGCCTGTCCG	CCTACCTGCT	GGCCGTCCGG	CAGGGCTACA	AAATCACGGG	CGCTGTGGAC	10980
TATGAGCACG	TCCGCGAGCT	GGCCCGCATC	AATGGCGACC	TGGGCCGCCT	GGGCGCCCTG	11040
CTGAAACTCT	GGCTCACCGA	CGACCCGCGC	ACGGCGCGGT	TCGGTGATGC	CACGATCCTC	11100
GCCCTGCTGG	CGAAGATCGA	AGAGAAGCAG	GACGAGCTTG	GCAAGGTCAT	GATGGGCGTG	11160
GTCCGCCCGA	GGGCAGAGCC	ATGACTTTTT	TAGCCGCTAA	AACGGCCGGG	GGGTGCGCGT	11220
GATTGCCAAG	CACGTCCCCA	TGCGCTCCAT	CAAGAAGAGC	GACTTCGCGG	AGCTGGTGAA	11280
GTACATCACC	GACGAGCAAG	GCAAGACCGA	TCCCCATCCC	GAAGTGGTCA	GACTGGAAAA	11340

Figura 11 (cont.)

ES 2 546 648 T3

```
TCAGAGGGCA GGAAGTGC GAACACTGCGA ACAGCAAAAA GTCAGATAGC ACCACATAGC AGACCCGCCA 11400
TAAAACGCCC TGAGAGCCCG TGACGGGCTT TTCTTGATTT ATGGGTAGTT TCCTTGATG 11460
AATCCATAAA AGGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCATTA 11520
ATGCAGAATT CCCCAGGATCG AGATAGTATA TGATGCATAT TCTTTAAATA TAGATAAAGT 11580
TATAGAAGCA ATAGAAGATT TAGGATTTAC TGTAATATAA ATTACACTTT TAAAAAGTTT 11640
AAAAACATGA TACAATAAGT TATGGTTGGA ATTGTTATCC GCTCACAATT CCAACTTATG 11700
ATTAAAATTT TAAGGAGGTG TATTTTCATAT GACCATGATT ACGAATTCGA GCTCGGTACC 11760
CGGGGATCCT CTAGAGTCGA CGTCACGCGT CCATGGAGAT CTCGAGGCCT GCAGGCATGC 11820
A 11821
```

Figura 11(cont.)

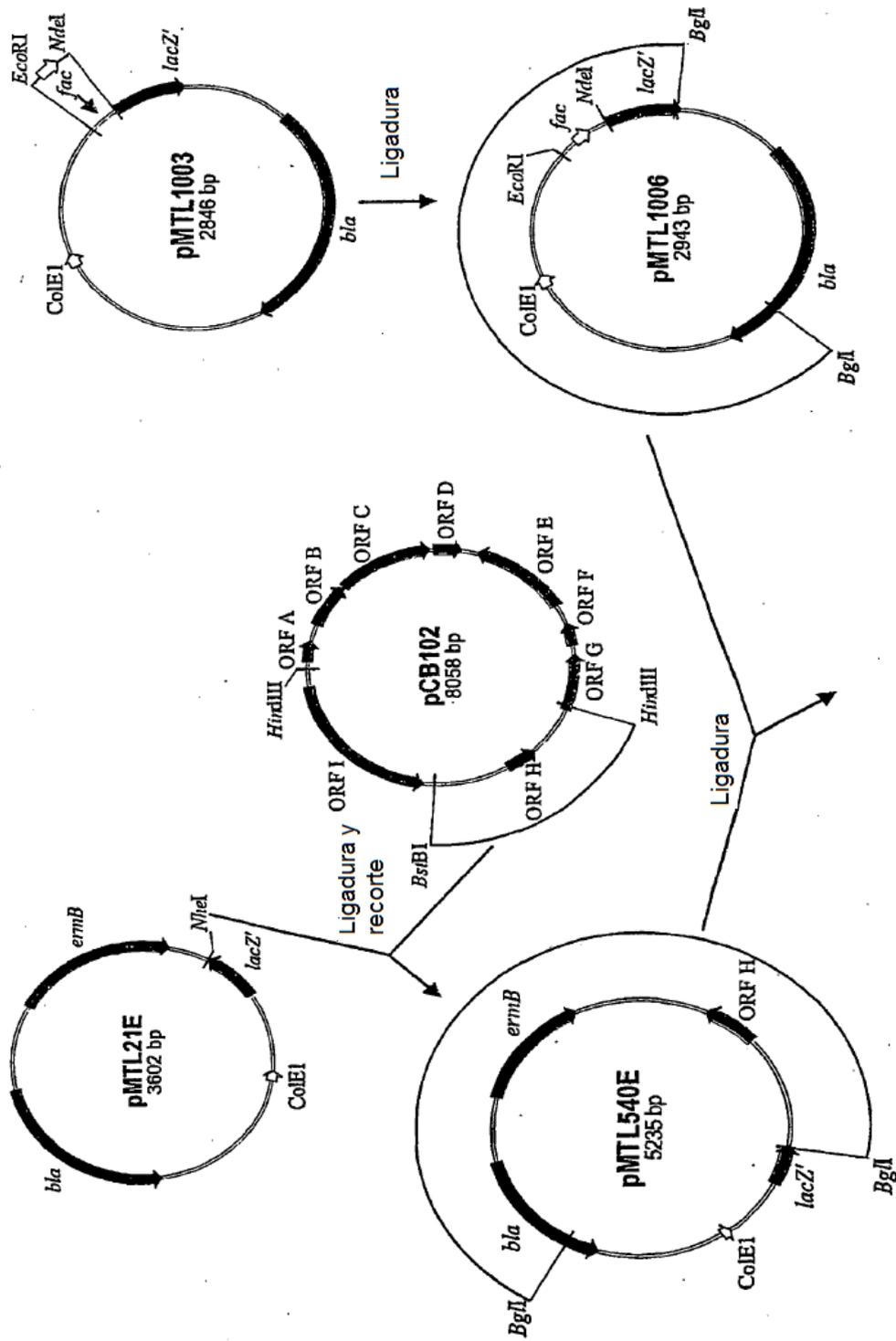


Figura 12

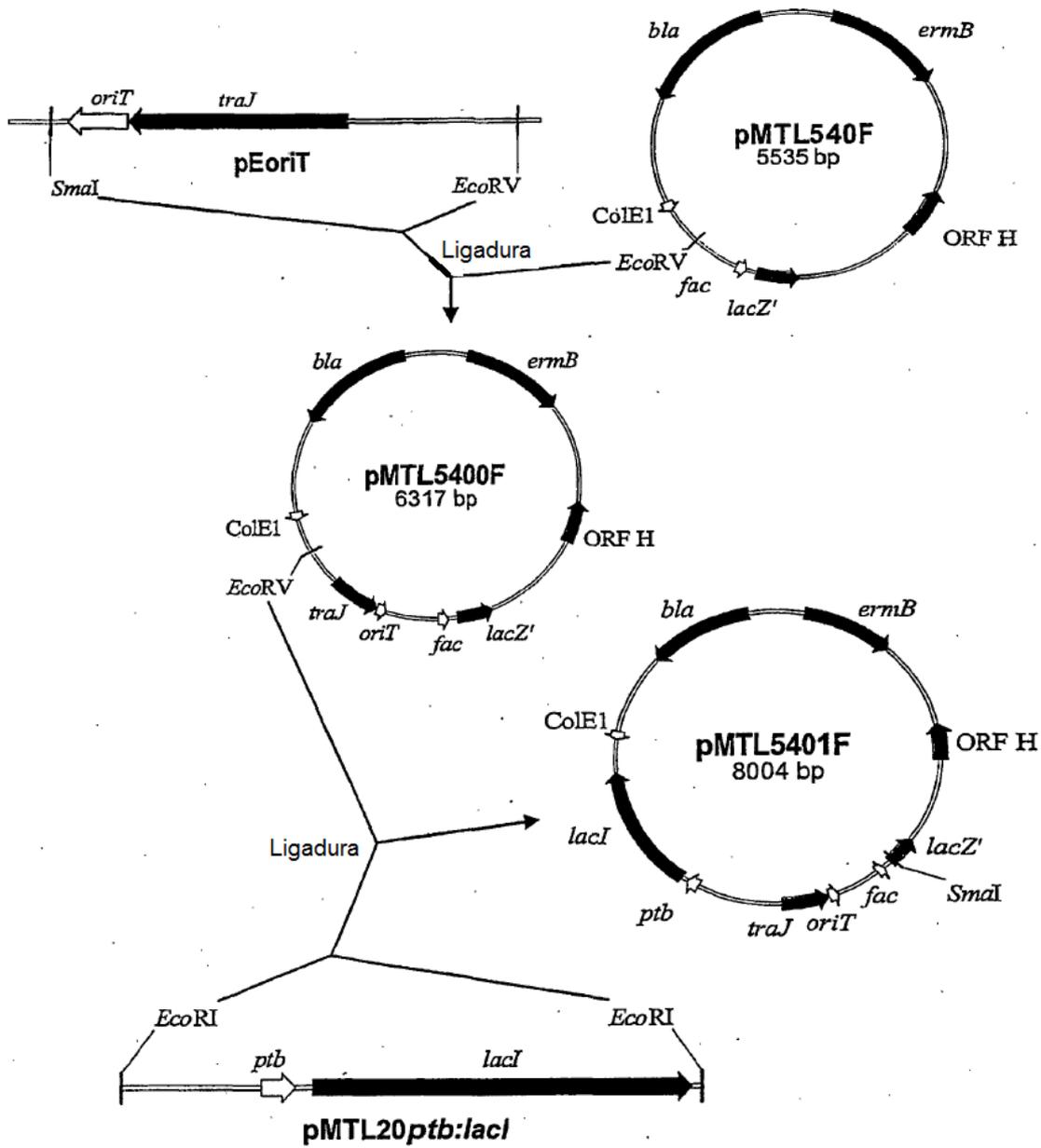


Figura 12 (cont.)

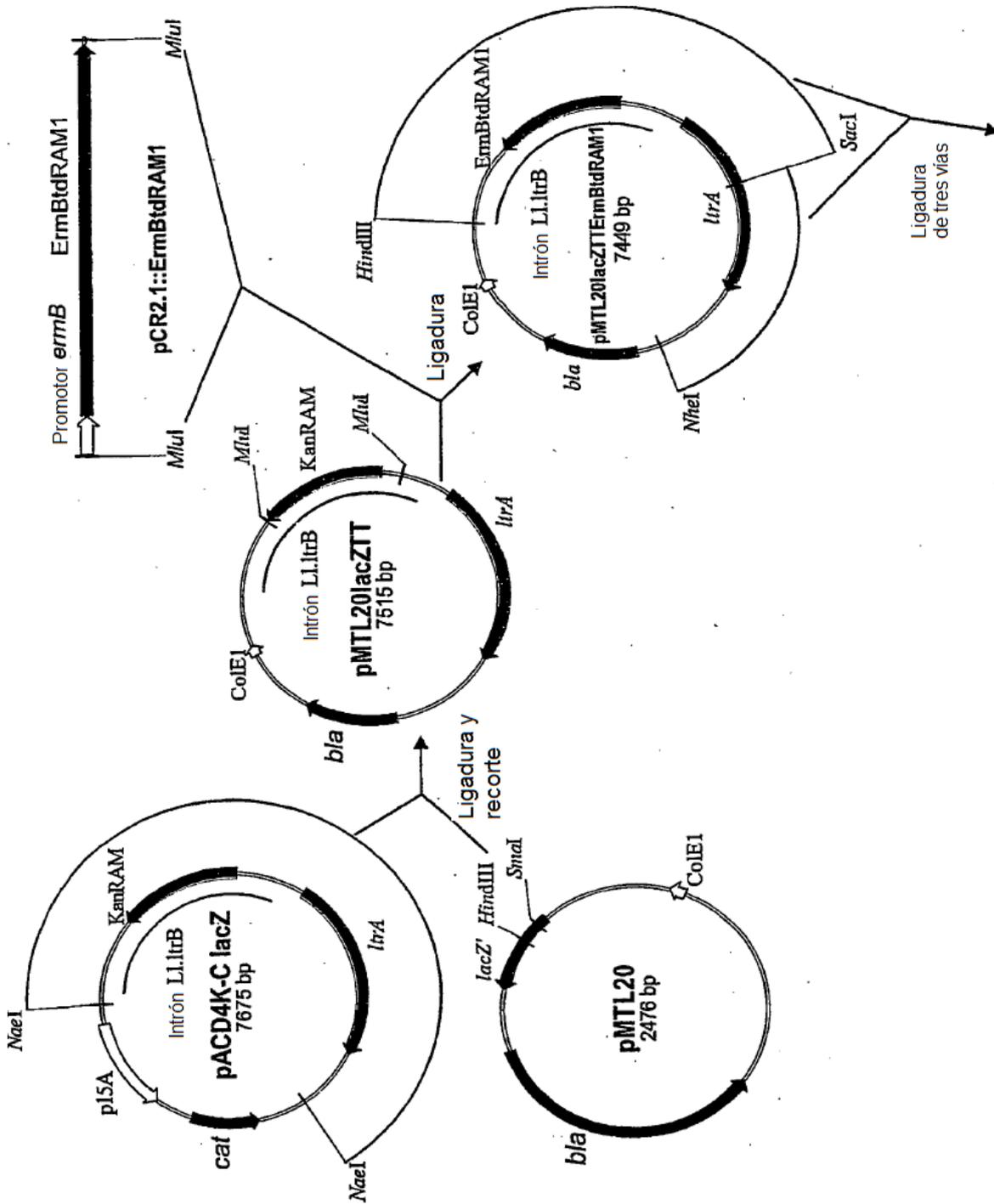


Figura 13

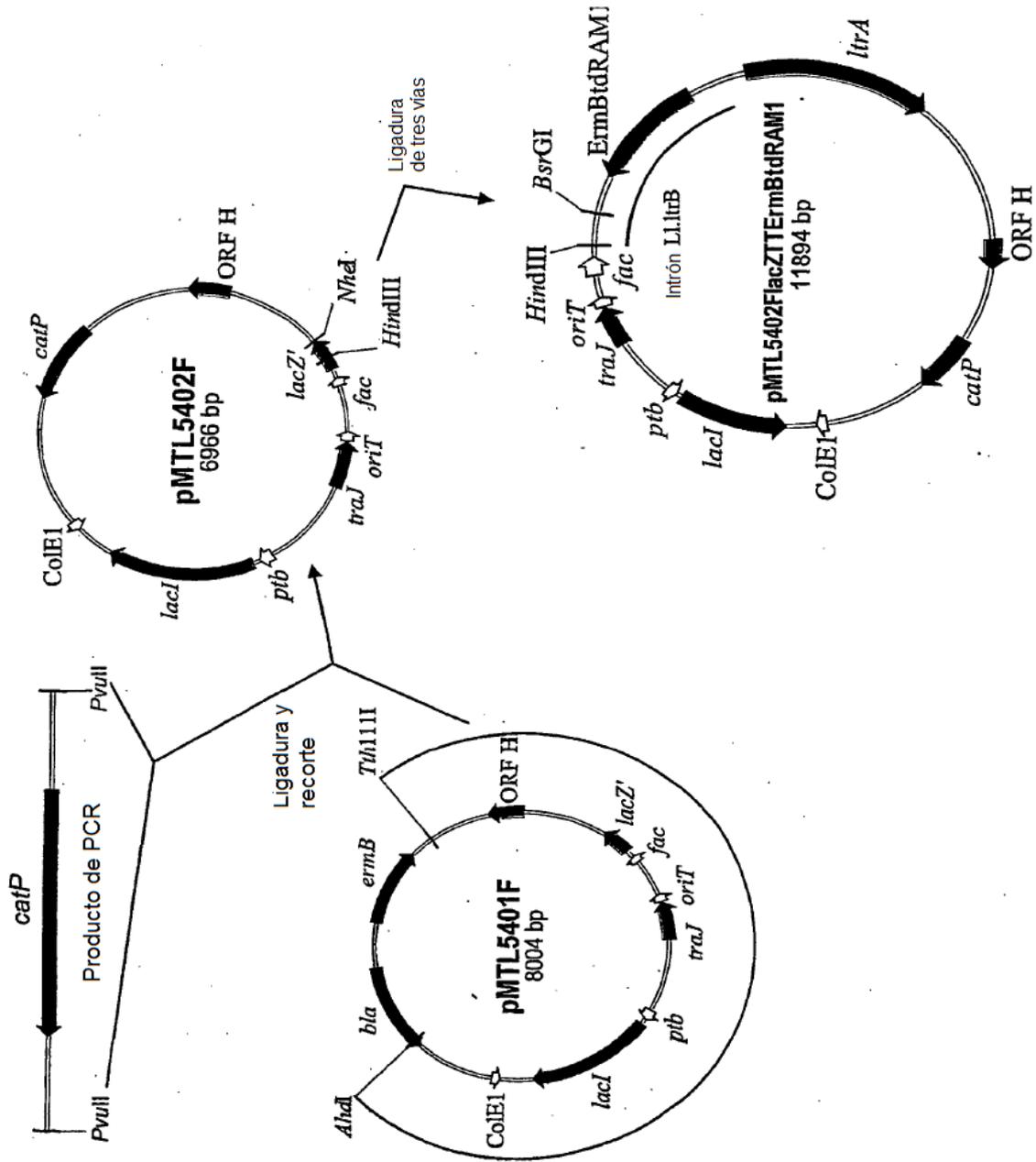


Figura 13 (cont.)

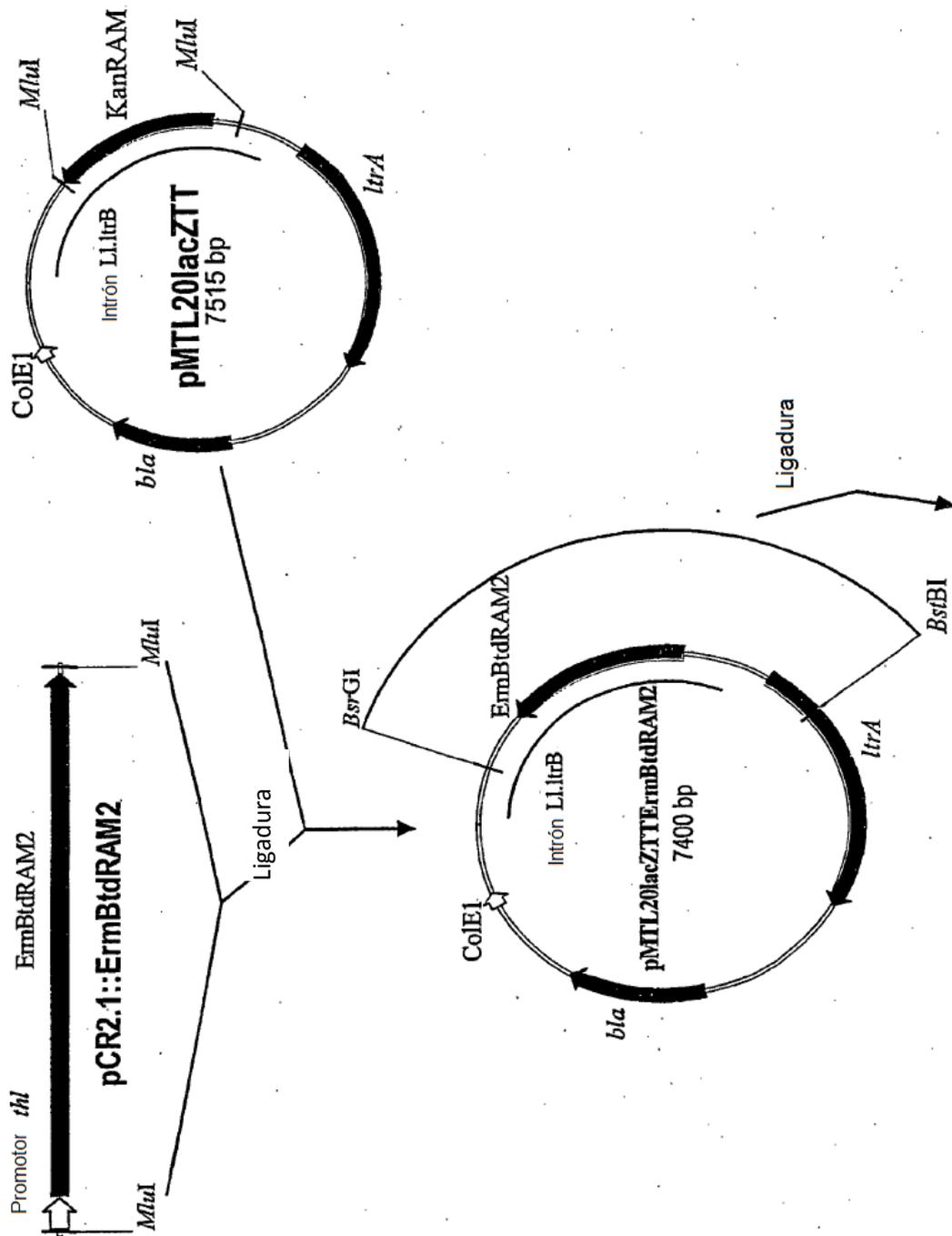


Figura 14

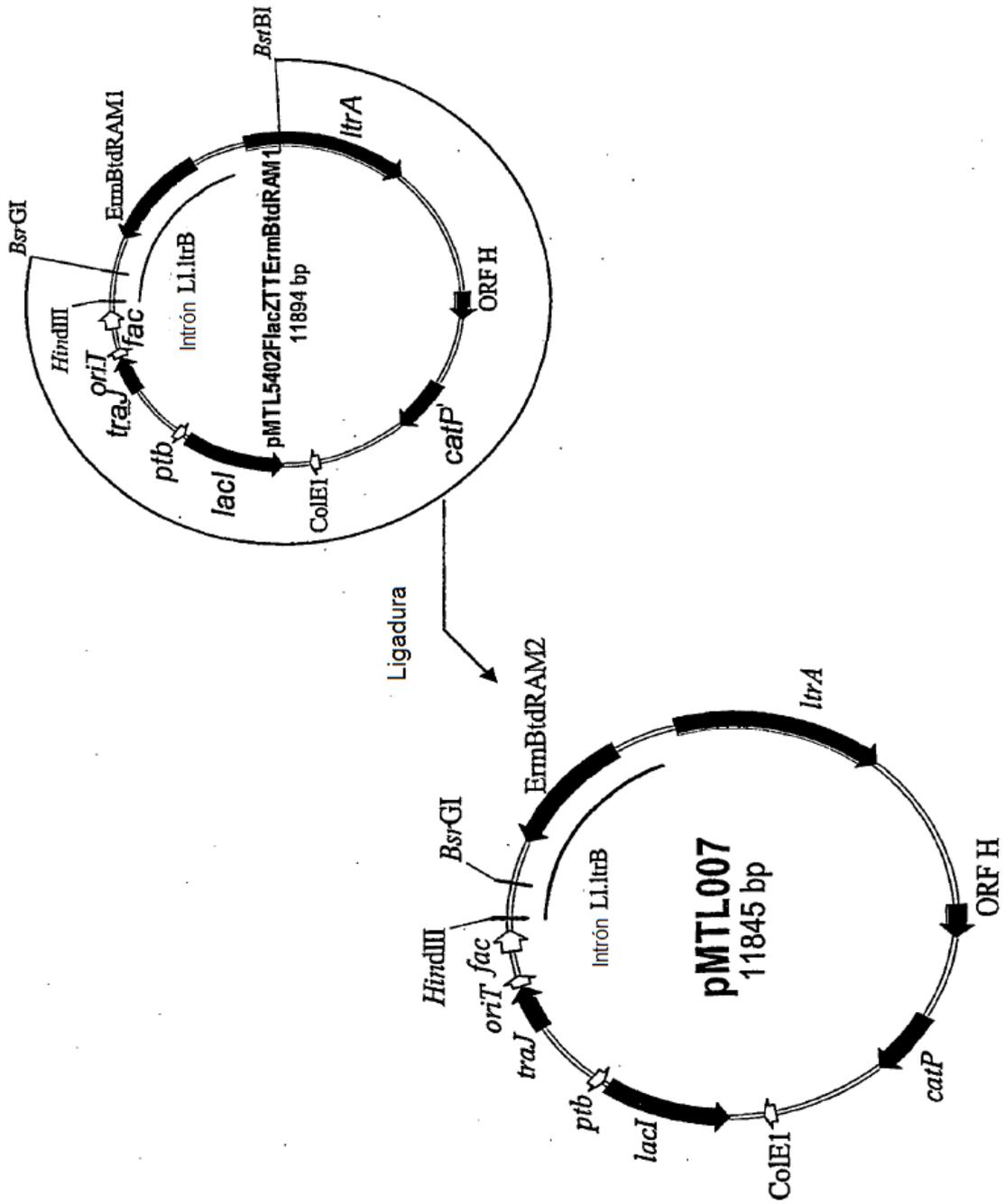


Figura 14 (cont.)

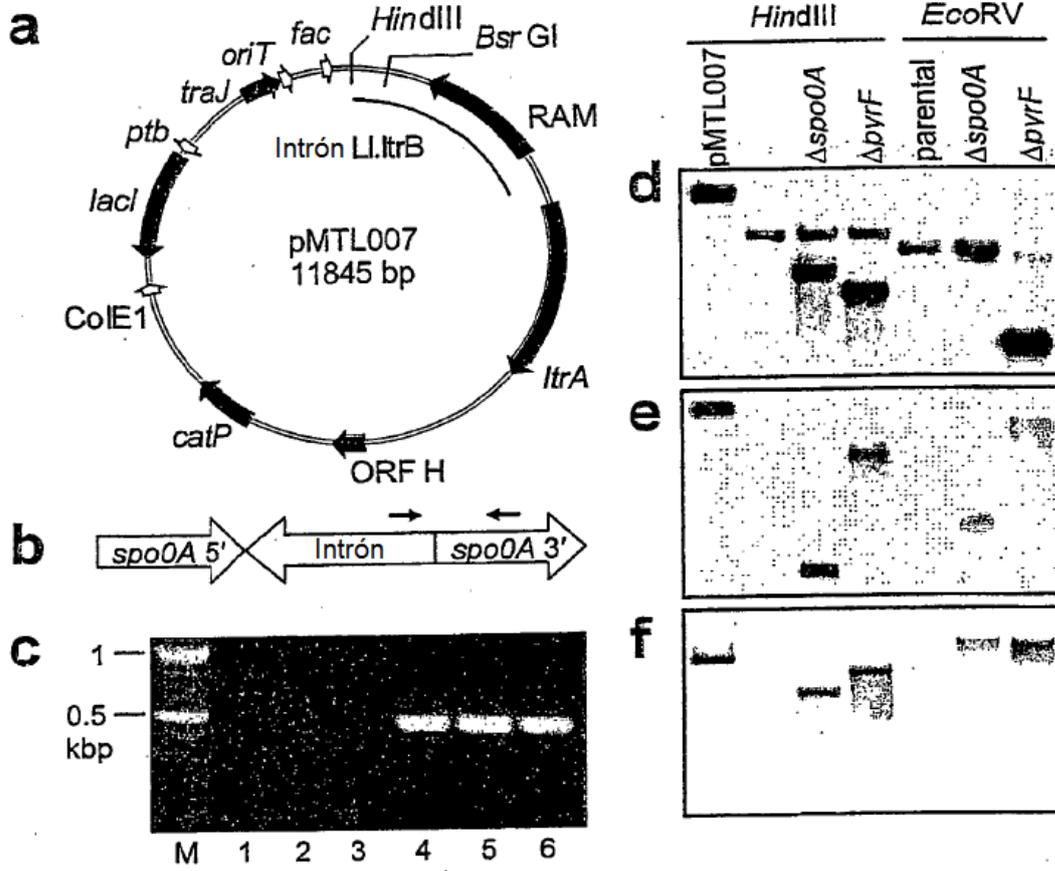


Figura 15

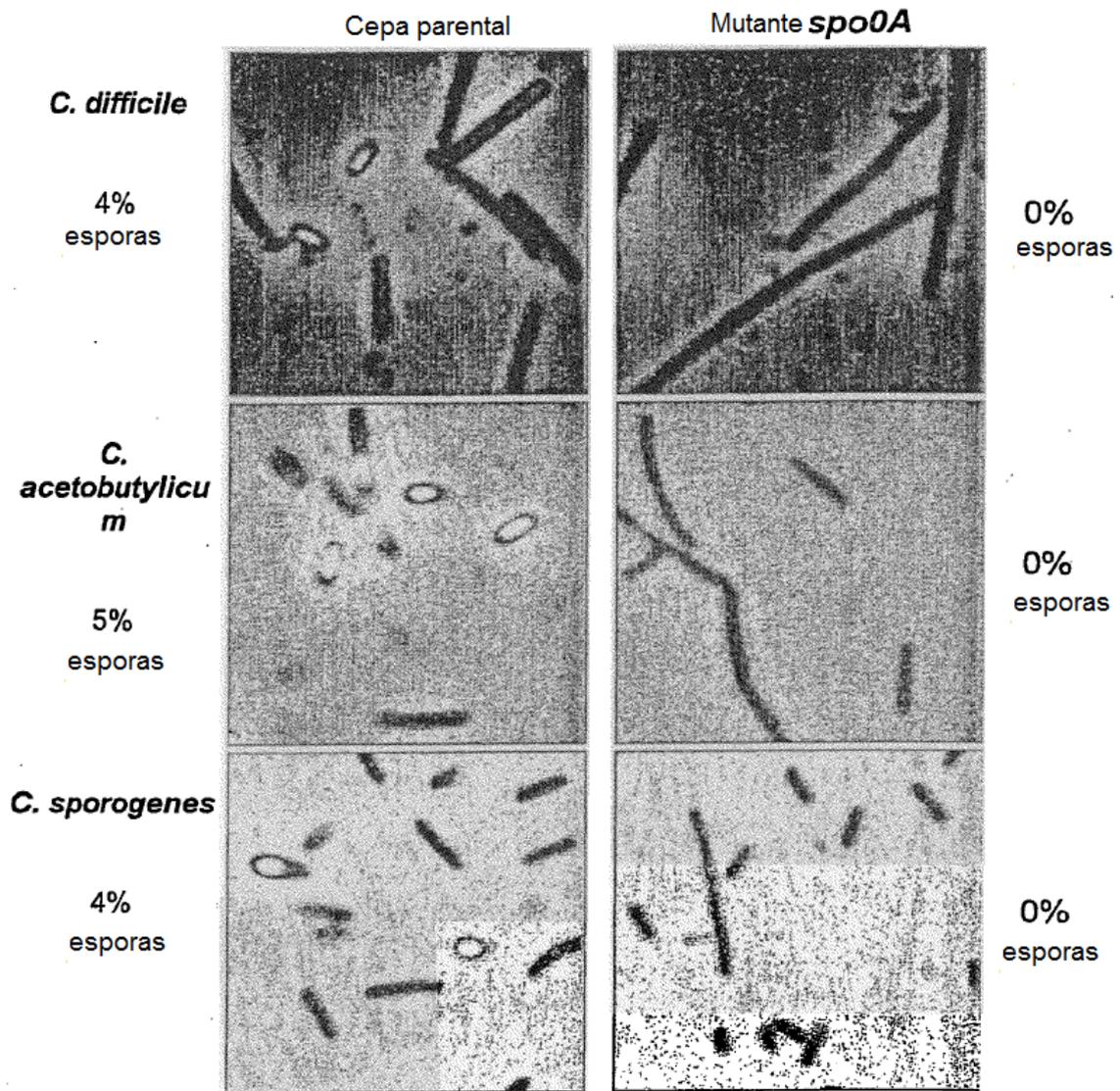


Figura 16