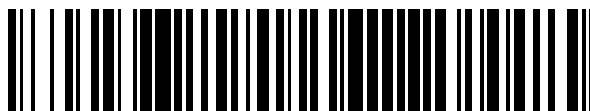


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 317**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/EP2014/078858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092013**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14824467 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3083937**

54 Título: **Sistema dirigido a IS para la inserción génica e ingeniería genética en bacterias Deinococcus**

30 Prioridad:

20.12.2013 EP 13306811

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

23.10.2019

73 Titular/es:

**DEINOVE (100.0%)
1682 Rue de la Valsière Cap Sigma-Zac
Euromedecine II
34790 Grabels, FR**

72 Inventor/es:

**BERNARD, RÉMI;
GERBER, ESTHER;
HAUSER, ELENA y
LEONETTI, JEAN-PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 728 317 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

Sistema dirigido a IS para la inserción génica e ingeniería genética en bacterias *Deinococcus*

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para la integración cromosómica de ácidos nucleicos en bacterias *Deinococcus*. La invención se refiere más particularmente a métodos de inserción génica multicopia mediada por IS o métodos dirigidos a IS para la ingeniería cromosómica en bacterias *Deinococcus*, las bacterias resultantes y los usos de las mismas.

Introducción

Deinococcus es una bacteria Gram positiva que fue aislada en 1956 por Anderson y colaboradores. Este organismo extremófilo es resistente al daño de ADN por UV y radiaciones ionizantes o por un agente de reticulación (mitomicina C) y es tolerante a la desecación. El documento WO01/023526 muestra la resistencia inusual de *Deinococcus* a la radiación y propone además su modificación y uso en bio-remediación. El documento WO2009/063079 muestra que las bacterias *Deinococcus* pueden resistir disolventes y transformar biomasa para generar biocombustibles. El documento WO2010/130806 además describe cepas recombinantes de *Deinococcus* en las que se han insertado genes de biosíntesis de etanol. Estas cepas recombinantes exhiben prestaciones mejoradas en la producción de etanol. El documento WO 02/14490 describe un método para introducir un gen extraño que codifica, p.ej., amilasa, celulasa o lacasa en bacterias, incluyendo *Deinococcus*, mediante recombinación homóloga usando una construcción de ADN que comprende el gen extraño flanqueado por "cajas de homología" cuyas secuencias son homólogas a una secuencia del genoma bacteriano.

La presente invención describe nuevas composiciones y métodos para modificar genéticamente bacterias *Deinococcus*. Más específicamente, la invención proporciona métodos mejorados basados en Secuencia de Inserción para modificar genéticamente bacterias *Deinococcus*.

Sumario de la invención

La invención se refiere a métodos y construcciones para recombinación génica o modificación cromosómica en bacterias *Deinococcus*. Más específicamente, la invención se refiere a métodos y construcciones basados en IS para la inserción o amplificación génica en bacterias *Deinococcus*, o a la modificación genética mediada por IS de bacterias *Deinococcus*.

Un objetivo de la invención, por tanto, se refiere a un método para introducir un ácido nucleico en el genoma de una bacteria *Deinococcus*, que comprende introducir dicho ácido nucleico en dicho genoma mediante una inserción mediada por IS. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico se introduce en el genoma de la bacteria mediante recombinación homóloga con una IS presente en el genoma, mediante inserción mediada por intrón en una IS, o mediante transposición mediada por IS.

Un objetivo adicional de la invención reside en un método para producir una bacteria *Deinococcus* recombinante que comprende una o varias copias de un gen de interés insertado en su genoma, comprendiendo el método la introducción de dicho gen de interés en el genoma de dicha bacteria mediante inserción mediada por IS y, opcionalmente, amplificar el número de copias sometiendo a dicha bacteria, o a un descendiente de la misma, a un tratamiento de amplificación génica.

La descripción también se refiere a un método para inducir (o aumentar) la(s) redistribución(es) cromosómica(s) o el barajado en una bacteria *Deinococcus*, comprendiendo el método la expresión (o el aumento de la expresión) de al menos un gen de transposasa en dicha bacteria.

La invención también se refiere a una bacteria *Deinococcus* obtenida mediante inserción mediada por IS de un ácido nucleico, o de un descendiente de dicha bacteria.

Otro objetivo de la invención es una bacteria *Deinococcus* que comprende una o varias copias de un ácido nucleico insertado en un elemento IS.

Un objetivo adicional de la invención reside en una molécula de ácido nucleico que comprende un gen de interés flanqueado, en uno o en ambos lados, por (i) una secuencia homóloga a una secuencia de un elemento IS de *Deinococcus*, o (ii) por una secuencia de una secuencia de repetición invertida de un elemento IS de *Deinococcus*.

La descripción también se refiere a una bacteria *Deinococcus* recombinante que comprende una o varias copias de un gen de transposasa bajo el control de un promotor.

La invención puede ser llevada a cabo con cualquier bacteria *Deinococcus* y puede usarse para modificar bacterias con genotipos o fenotipos mejorados, particularmente bacterias que expresan genes recombinantes de interés.

Leyendas de las Figuras

Fig. 1: Inserción génica mediante recombinación homóloga mediada por IS en *Deinococcus*.

Fig. 2: Inserción de construcción de ADN de la ruta de etanol en IS66 de *D. geothermalis*.

Fig. 3: Inserción génica mediante transposición artificial mediada por IS en *Deinococcus*.

Descripción detallada de la invención

5 La invención se refiere a la inserción génica mediada por IS o ingeniería cromosómica en bacterias *Deinococcus*, las bacterias resultantes y los usos de las mismas.

10 Las Secuencias de Inserción (IS, del inglés "Insertion Sequences") son elementos genéticos transponibles identificados en determinados organismos procarióticos. Tienen una longitud típica que oscila entre 300 y 3000 pb (Mahillon y Chandler, 1998; Chandler y Mahillon, 2002). En bacterias, las IS se encuentran frecuentemente como parte de plásmidos naturales. Las IS típicamente poseen uno o dos marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican una transposasa, una enzima que es necesaria para su transposición. Este(os) ORF(s) está(n) rodeados por regiones ligando que frecuentemente acaban en repeticiones invertidas (IRs) terminales cortas que oscilan típicamente entre 7 y 50 pb de longitud. Algunas IS pueden portar múltiples secuencias repetidas en ambos extremos, que pueden representar sitios de unión de transposasa (Nagy Zita y Michael Chandler, Research in Microbiology 155 (5) p. 387-398). Al contrario que los transposones, las IS no contienen un ORF que codifique la resistencia a fármacos. Tras la inserción, las IS a menudo son sometidas a repeticiones dirigidas cortas de 2 a 14 pb inmediatamente fuera de las IRs.

20 A pesar de la divergencia de secuencia, las ISs han sido agrupadas en familias en base a las similitudes e identidades en la secuencia primaria de sus transposasa (Tpasas) y en su organización genética (Robinson, Lee & Marx, 2012). Esto incluye la disposición de sus marcos de lectura abiertos (ORFs), su longitud y la similitud de las repeticiones invertidas terminales, y el número característico de pares base en el ADN diana que duplican tras la inserción (Mahillon, Léonard & Chandler, 1999).

25 Dependiendo de la IS, la inserción puede ser selectiva de sitio diana (Craig, 1997; Tobes & Pareja, 2006). A través de transposición, la IS puede interrumpir la región codificadora de un gen, o perturbar regiones promotoras y alterar la expresión génica. Dado que puede haber varias copias de la misma IS en un genoma, la IS también puede actuar como sitio de reordenamiento de ADN, tal como eliminaciones, duplicaciones e inversiones de segmentos de ADN adyacentes a través de recombinación homóloga (Robinson et al., 2012). Las secuencias de inserción contribuyen a la variabilidad de los genomas y fenotipos procarióticos, y se cree que desempeñan un papel importante en la adaptabilidad de los procariontes al entorno (Schneider & Lenski, 2004).

30 Se han identificado elementos de IS en *D. radiodurans* (Makarova et al, 2001; Islam et al., 2003; Mennecier, Servant, Coste, Bailone & Sommer, 2006; Pasternak et al., 2010). La presente invención describe la caracterización de secuencias de IS particulares en bacterias *Deinococcus*, así como usos de las mismas para modificación genética o barajado genético de dichas bacterias.

35 Más específicamente, los inventores analizaron la presencia y la existencia de diferentes familias de IS en genomas de *Deinococcus* sp. Se encontró un total de 11 familias de IS en 5 especies de *Deinococcus* evaluadas, que se presentan en la Tabla 1. Se observó que las familias de IS IS4, IS5, IS1 e IS701 eran las más distribuidas entre *Deinococcus*, siendo la familia más grande la IS4, que contiene un total de 68 miembros en *Deinococcus*. Sorprendentemente, el genoma de *D. geothermalis* DSM113000 y de *D. geothermalis* MX6-1E poseen un mayor número de elementos de IS en comparación con las otras cepas de *Deinococcus* (Tabla 1). En estas cepas, se detectaron setenta y seis elementos de IS que pertenecen a 10 familias distintas (cepa DSM11300) y cincuenta y cinco dispersos en 7 familias de IS (cepa MX6-1E).

45 Por lo tanto, la presente invención muestra un nivel alto inesperado de número de secuencias de inserción en cepas termófilas de *Deinococcus* tales como *D. geothermalis* (tabla 1). Este descubrimiento ofrece nuevas herramientas para la manipulación genética de cepas termófilas de *Deinococcus* y, en particular, permite la integración multicopia en bacterias *Deinococcus* para aumentar su expresión. La presencia de diferentes familias de IS en un único genoma de *Deinococcus* incluso permite la introducción de diferentes construcciones de ADN (un tipo de construcción está dirigido a una familia de IS). La presente invención, por tanto, proporciona un nuevo método para insertar o extender o amplificar un gen deseado en un genoma de *Deinococcus* usando secuencias de inserción de *Deinococcus*.

50 La presente invención también proporciona un método de ingeniería cromosómica de una bacteria de *Deinococcus* a través de la expresión o la sobreproducción en dicha bacteria de una transposasa dirigida a una IS presente (preferiblemente en varias copias) del cromosoma o un plásmido de dicha bacteria.

Definiciones

55 Dentro del contexto de la presente invención, el término "Secuencia de inserción" o elemento "IS" designa un elemento genético transponible que comprende al menos un gen de transposasa y una Repetición Invertida terminal flanqueante. Las IS están desprovistas de gen de resistencia a fármaco. Las ISs tienen una longitud típica que oscila entre 300 y 3000 pb, oscilando las repeticiones invertidas terminales (IRs) típicamente entre 7 y 50 pb de longitud.

Los elementos IS preferidos para uso en la invención son elementos IS de *Deinococcus*, es decir, elementos de IS que tienen una secuencia de una IS presente en una o, preferiblemente, en varias copias del genoma de una bacteria *Deinococcus*. Los ejemplos específicos de elementos IS de *Deinococcus* según la invención son IS200/IS605, IS630; IS701; IS607; IS982; IS3; IS1; IS6; IS5; IS4 o IS66. La secuencia de estas IS se proporciona en el listado de secuencias.

Los métodos “basados en IS” o los métodos “mediados por IS” designan cualquier método para insertar un gen en una bacteria *Deinococcus* que usa todo, o parte de, un elemento IS. La inserción típicamente está dirigida, es decir, es específica de sitio o está controlada por sitio. En particular, puesto que la inserción mediada por IS generalmente sigue una selectividad de diana del elemento IS, la inserción génica no es aleatoria sino que obedece a la misma regla.

El término “gen” designa cualquier molécula de ácido nucleico (p.ej., fragmento de ADN) de interés tal como preferiblemente un ácido nucleico que comprende un ORF que codifica un producto (p.ej., ARN o polipéptido) de interés. El gen puede ser natural, recombinante o sintético. Un gen puede ser de cadena sencilla o doble, típicamente una molécula de ADN. En una realización particular, el gen preferiblemente codifica una proteína, tal como una enzima. El gen puede comprender adicionalmente uno o varios elementos reguladores, ligados operativamente al ORF, tal como un promotor, terminador, intrón, etc.

El término “ingeniería cromosómica” designa cualquier modificación o reordenamiento de un cromosoma, tal como una eliminación, traslocalización, duplicación o inversión de una o varias secuencias dentro de un cromosoma o episoma. La ingeniería cromosómica puede dar como resultado nuevos cromosomas o episomas, creando de este modo nuevas rutas biológicas y/o diversidad genética en bacterias, lo que conduce, p.ej., a bacterias que tienen características mejoradas.

Modificación genética mediada por IS de un *Deinococcus*

Como se ha indicado, la invención reside en una modificación genética mediada por IS de bacterias *Deinococcus*, típicamente para producir bacterias recombinantes o mejoradas genéticamente. La invención es particularmente ventajosa ya que la inserción mediada por IS es efectiva, puede ser selectiva de sitio, y permite la inserción de múltiples copias de un gen seleccionado. La inserción mediada por IS puede comprender preferiblemente la introducción del gen en el genoma de la bacteria mediante recombinación homóloga con una IS presente seleccionada (o insertada o amplificada) en el genoma de la bacteria; o mediante transposición mediada por IS. El método puede implicar el uso de una casete de inserción, la construcción de un trasposón artificial, o el mecanismo de retro-alojamiento de intrón de grupo II como se describe más adelante, en combinación o no con tratamientos que dañan el ADN (radiación UV, gamma, X). Preferiblemente, la inserción mediada por IS de un gen en una bacteria *Deinococcus* incluye la introducción (dirigida) de dicho gen en una secuencia de IS presente en el genoma de dicha bacteria.

La invención puede usarse para modificar genéticamente cualquier *Deinococcus* que contiene un elemento de IS, preferiblemente cualquier cepa de *Deinococcus* que contiene o que puede aceptar al menos dos copias de un elemento IS. Los ejemplos de cepas hospedantes de *Deinococcus* que pueden modificarse según la presente invención incluyen, aunque sin limitación, *D. geothermalis*, *D. radiodurans*, *D. cellulolyticus*, *D. murrayi*, *D. guilhemensis*, *D. aeri*, *D. aerolatus*, *D. aerophilus*, *D. aetherius*, *D. alpinitundrae*, *D. altitudinis*, *D. apachensis*, *D. aquaticus*, *D. aquatilis*, *D. aquiradiocola*, *D. caeni*, *D. claudionis*, *D. daejeonensis*, *D. depolymerans*, *D. deserti*, *D. erythromyxa*, *D. ficus*, *D. frigens*, *D. gobiensis*, *D. grandis*, *D. hohokamensis*, *D. hopiensis*, *D. humi*, *D. indicus*, *D. maricopensis*, *D. marmoris*, *D. misasensis*, *D. mumbaiensis*, *D. navajonensis*, *D. papagonensis*, *D. peraridilitoris*, *D. pimensis*, *D. piscis*, *D. proteolyticus*, *D. radiodurans*, *D. radiomollis*, *D. radiophilus*, *D. radiopugnans*, *D. reticulitermitis*, *D. roseus*, *D. saxicola*, *D. sonorensis*, *D. wulumuqiensis*, *D. xibeiensis*, *D. xinjiangensis*, *D. yavapaiensis* y *D. yunweiensis*. Las bacteriasceptoras preferidas son *Deinococcus* termófilas. Las bacterias más preferidas son *Deinococcus* que comprenden al menos 2 copias de un elemento IS, preferiblemente al menos 3 copias del mismo. Las copias pueden estar presentes en el cromosoma, o inducidas en dicho cromosoma.

Por consiguiente, el método de la invención típicamente comprende las siguientes etapas:

- a) provisión de una bacteria *Deinococcus* que contiene al menos 1, preferiblemente al menos 2 copias de un elemento IS diana, y;
- b) inserción mediada por IS de un gen en dicho elemento IS diana.

Preferentemente, la IS diana es una IS presente en más de una copia del genoma (cromosoma y/o plásmido) de la bacteria *Deinococcus* seleccionada. La IS diana es más preferiblemente uno de los elementos IS seleccionados por los inventores que se enumeran en la Tabla 1. La identificación de varios elementos IS distintos, adicionalmente, permite la propagación y la expresión de diferentes genes de interés en un genoma de *Deinococcus*. Una IS diana preferida se selecciona de IS200/IS605, IS630; IS701; IS607; IS982; IS3; IS1; IS6; IS5; IS4 o IS66.

La bacteria *Deinococcus* puede contener dichas al menos 2 copias de forma natural, o puede ser tratada para ampliar el número de copias de un elemento IS diana, antes de la etapa b), o después de la misma. Por consiguiente, la invención generalmente comprende las siguientes etapas:

- a) provisión de una bacteria *Deinococcus* para la cual se desea una modificación genética;

- b) selección, en dicha bacteria *Deinococcus*, de al menos un elemento IS diana presente en el cromosoma de dicha bacteria, preferiblemente en al menos dos copias;
- c) opcionalmente, tratar la bacteria para ampliar el número de copias de dicho elemento IS diana seleccionado;
- 5 d) insertar un gen en dicha bacteria mediante dicha inserción mediada por IS en dicho elemento IS diana seleccionado.

En una realización particular, la etapa de tratar la bacteria para ampliar el número de copias del elemento IS diana seleccionado se lleva a cabo después de la etapa de inserción. Asimismo, la etapa de amplificación se puede llevar a cabo tanto antes como después de la etapa de inserción. El tratamiento puede comprender cualquier tratamiento que permita o aumente la expresión o actividad de una transposasa y/o produzca un estrés celular, tal como un choque térmico o una irradiación de las células, que puede seleccionarse entre irradiación UV, gamma y/o de rayos X, tanto por separado como en combinaciones, lo más preferiblemente mediante irradiación(es) UV. El tratamiento de irradiación típicamente comprende someter los microorganismos a una o varias irradiaciones secuenciales (p.ej., de 1 a 5), que pueden ser iguales o diferentes en naturaleza, preferiblemente de la misma naturaleza. Normalmente se llevan a cabo tratamientos de irradiación repetidos en un intervalo de entre 1 y 8 horas, preferiblemente de 3 a 5 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 4 horas. Un tratamiento particularmente preferido comprende someter la muestra a irradiación UV, X o gamma. Dicho tratamiento de hecho permite amplificar los números de copias de IS y estimular la ingeniería cromosómica. Los tratamientos de UV particulares típicamente son de entre 0,5 y 400 mJ/cm², más preferiblemente de entre 1 y 200 mJ/cm², típicamente entre 1 y 100 mJ/cm², aplicados durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5" a 5'. Un tratamiento de UV preferido es de 4 mJ/cm² durante 30 segundos.

Durante el proceso completo, las células pueden ser colocadas en un medio de cultivo adecuado tal como, sin limitación, PGY (Bacto-peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 20 g/L) o LB (Bacto-triptona 10 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, cloruro sódico 10 g/L). Debería entenderse que el especialista en la técnica conoce otros medios de cultivo adecuados (Buchanan et al, 1974, Difco, 1995)), o pueden ser preparados por el especialista en la técnica a partir de dichos medios.

Para la inserción dirigida por recombinación homóloga en una IS, el gen que va a ser insertado (o amplificado) se ensambla típicamente como una casete de recombinación, que puede ser clonada o no en un vector apropiado, tal como pMD66. A este respecto, la invención muestra que se pueden usar moléculas de ADN lineales directamente para la transformación de bacterias *Deinococcus*. La casete de recombinación típicamente comprende el gen flanqueado, en uno o en ambos lados, por una región HR1 y/o una región HR2 (de aproximadamente 100-1000, más preferiblemente de aproximadamente 200-700, tal como 300-600, típicamente de aproximadamente 500 pb cada una), siendo dichas regiones HR1 y HR2 homólogas, respectivamente, a una secuencia de ADN 5' y 3' del elemento IS diana. HR1 y HR2 pueden ser cualquier parte de la secuencia de la IS diana. HR1 y/o HR2 permiten la inserción del gen de interés en el cromosoma mediante recombinación homóloga específica. La casete de recombinación puede comprender, adicionalmente, p.ej., un gen marcador (tal como un gen de resistencia a fármaco). En dicho caso, los dos genes (gen de interés y gen marcador) pueden colocarse bajo el control de cualquier promotor individual (estructura de operón) o de distintos promotores separados. Los ejemplos de genes marcadores incluyen, p.ej., genes de resistencia a antibióticos tales como los genes que confieren resistencia a, p.ej., canamicina, cloranfenicol, bleomicina, oxitetraciclina, higromicina, eritromicina, puromicina o tianfenicol. La casete de recombinación (o el vector que porta la misma) se introduce en la cepa de *Deinococcus* seleccionada. La introducción se puede llevar a cabo usando técnicas tales como transformación, lipofección, precipitación mediada por calcio, electroporación, etc. La presencia de la casete o vector de recombinación en la célula se puede verificar mediante, p.ej., detección del gen o gen marcador. Tras la introducción en la cepa hospedante, la integración de la casete de recombinación en el(los) sitio(s) diana de IS se produce mediante recombinación homóloga. A este respecto, en una realización preferida, la inserción se induce o se estimula mediante choque térmico. De hecho, tras choque térmico, el vector se pierde y las cepas recombinantes que expresan el gen han insertado por tanto el gen en su cromosoma. Los resultados presentados en los ejemplos demuestran la inserción efectiva mediante recombinación homóloga dirigida a IS. Además demuestran que la transformación de *Deinococcus* es efectiva con una construcción de ADN lineal. Además demuestran que la recombinación homóloga dirigida a IS en *Deinococcus* se puede llevar a cabo con casetes recombinantes muy grandes. De hecho, como se muestra en el Ejemplo C, se puede insertar con éxito una casete recombinante de más de 6 kb (p.ej., que comprende 4 genes distintos) en una bacteria *Deinococcus* mediante recombinación homóloga dirigida a IS.

A este respecto, la invención también se refiere a un método para introducir un ADN en una bacteria *Deinococcus*, método que comprende:

- proporcionar una molécula de ADN lineal, y
- introducir dicha molécula en una bacteria *Deinococcus*.

Más preferiblemente, la molécula de ADN lineal comprende una región HR1 y/o HR2 como se ha definido anteriormente y el método además comprende una etapa de mantenimiento de *Deinococcus* en las condiciones que permitan la recombinación homóloga.

En una realización particular, la molécula de ADN lineal comprende más de 2 kb, incluso más de 3, 4, 5 o incluso 6 kb.

En una realización alternativa, la inserción mediada por IS se lleva a cabo mediante la construcción de un transposón artificial que contiene el gen, y la introducción del transposón en la bacteria *Deinococcus* seleccionada, lo que conduce a la inserción mediada por IS en el cromosoma. El transposón artificial preferiblemente comprende el gen, un gen de transposasa de un elemento IS de *Deinococcus*, opcionalmente un gen marcador, y uno o dos elementos IR de un elemento IS de *Deinococcus*. El transposón artificial puede construirse usando regiones o secuencias de cualquier elemento IS descrito en la Tabla 1 como material de partida. Preferiblemente, el gen de transposasa y las secuencias de IR se derivan (p.ej., tienen una secuencia de un dominio de) un mismo elemento IS. El gen de transposasa puede localizarse dentro del transposón artificial, es decir, el gen de transposasa puede estar localizado entre las dos repeticiones invertidas. En tal caso, puede estar en el vector portador de transposón, o en el cromosoma, o en un vector distinto. La expresión de la transposasa puede estar bajo el control de su propio promotor, un promotor constitutivo, o un promotor inducible. El gen marcador, cuando está presente, puede ser, p.ej., cualquier gen que confiere resistencia a un antibiótico tal como canamicina, cloranfenicol, bleomicina, oxitetraciclina o higromicina. El transposón artificial construido típicamente se clona en un vector adecuado, tal como pmD66, y se introduce en la cepa hospedante de *Deinococcus* seleccionada. Tras la introducción, se produce la inserción mediada por IS del transposón. Si se desea, se pueden aplicar agentes que dañan el ADN tal como irradiaciones gamma y/o X y/o tratamientos UV o, de forma más general, cualquier tratamiento que permita o que aumente la expresión o la actividad de una transposasa, para potenciar la transposición y aumentar la integración y la amplificación del transposón artificial en las células hospedantes de *Deinococcus*. De hecho, se ha demostrado que la irradiación puede inducir la transposición en *Escherichia coli* (Eichenbaum & Livneh, 1998).

Otra realización alternativa para llevar a cabo la inserción multicopia mediada por IS de un gen en el cromosoma de una bacteria *Deinococcus* es usar intrones de grupo II dirigidos a secuencias IS. Los intrones de grupo II móviles son elementos de ARN catalíticos presentes en un amplio rango de organismos procarionóticos y eucarionóticos (Michel & Feral, 1995). Algunos de dichos intrones se pueden movilizar autónomamente con una alta frecuencia a sitios alélicos en un proceso conocidos como alojamiento. Los intrones móviles de grupo II poseen una proteína codificada por intrón (IEP, del inglés "intron-encoded protein") que presenta actividad de transcriptasa inversa, de división de ARN ("maturasa") y de ADN endonucleasa (Frazier, Filippo, Lambowitz & Mills, 2003). La movilidad se inicia cuando la IEP ayuda al ARN de intrón a plegarse en la estructura de ARN catalíticamente activa para promover la división, dando como resultado exones ligados y un complejo de intrón lariat-IEP ribonucleoproteína (RNP). El complejo RNP reconoce sitios diana de ADN específicos y promueve la integración mediante división inversa del ARN de intrón directamente en una cadena del ADN diana. A continuación, la IEP rompe la cadena opuesta y la usa como cebador para la transcripción inversa cebada con ADN diana del ARN de intrón insertado. La copia de ADNc resultante del intrón se integra en ADN genómico mediante recombinación celular o mecanismos de reparación. El reconocimiento del sitio diana de ADN por el complejo RNP implica el emparejamiento de bases de las secuencias de intrón denotadas como EBS1 y -2 (sitios de unión de exón 1 y 2) y δ a las secuencias denotadas IBS1 y -2 (sitios de unión a intrón 1 y 2) y δ' en el sitio diana de ADN.

Las secuencias EBS se pueden mutagenizar para redirigir el intrón a invadir una secuencia IS seleccionada en *Deinococcus*. En la presente invención, se usó un plásmido tal como pmD66 que porta el gen que codifica la proteína IEP (transcriptasa inversa) y el intrón de grupo II que contiene en su secuencia un sitio de clonación múltiple que permite la clonación del gen de interés. La expresión del intrón de grupo II que alberga el gen de interés se controló mediante un promotor constitutivo o inducible, tal como el promotor constitutivo T7, mientras que el gen que codifica IEP (transcriptasa inversa) está bajo el control de un promotor inducible o constitutivo. Alternativamente, los intrones de grupo II que albergan el gen de interés se integran en el cromosoma de *Deinococcus* y el gen que codifica transcriptasa inversa portado por un plásmido replicativo está bajo el control de un promotor constitutivo o por uno inducible. Este sistema que usa la inserción o amplificación mediada por intrón no se basa en la recombinación homóloga para alcanzar una integración multicopia y facilita la administración de genes cromosómicos estables sin selección (Rawsthorne, Turner & Mills, 2006).

Un objetivo adicional de la invención reside en un método para producir una bacteria *Deinococcus* recombinante que comprende uno o varias copias de un gen de interés insertado en su genoma, comprendiendo el método la introducción de dicho gen de interés en el genoma de dicha bacteria mediante inserción mediada por IS y, opcionalmente, la amplificación del número de copias sometiendo dicha bacteria, o un descendiente de la misma, a un tratamiento de amplificación génica.

La invención también se refiere a una bacteria *Deinococcus* obtenida mediante inserción mediada por IS de una molécula de ácido nucleico (p.ej., un fragmento de ADN), o un descendiente de dicha bacteria.

La invención se refiere además a una bacteria *Deinococcus* que comprende una o varias copias de una molécula de ácido nucleico (p.ej., un fragmento de ADN) insertado en un elemento IS.

Un objetivo adicional de la invención es una molécula de ácido nucleico (p.ej., un fragmento de ADN) que comprende un gen de interés flanqueado, en uno o en ambos lados, por una secuencia homóloga a una secuencia de elemento IS de *Deinococcus*, así como un vector que comprende dicho ácido nucleico.

Otro objetivo adicional de la invención es una molécula de ácido nucleico (p.ej., un fragmento de ADN) que comprende un gen de interés flanqueado, en uno o en ambos lados, por una secuencia de una secuencia de repetición invertida de elemento IS de *Deinococcus*, así como un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.

Ingeniería cromosómica

5 Como se ha indicado antes, otro objetivo de la invención reside en un método para inducir (o aumentar) ingeniería cromosómica (p.ej., reordenamiento o barajado) en una bacteria *Deinococcus*, método que comprende expresar en dicha bacteria un gen de transposasa. Más particularmente, el método comprende:

- a) producir o inducir la expresión de al menos una transposasa en una bacteria *Deinococcus*; y
- b) seleccionar una bacteria *Deinococcus* de la etapa a) que tiene un cromosoma rediseñado.

10 En la etapa a), la transposasa puede expresarse en un vector, o cromosoma, o suministrarse como una proteína. La transposasa preferiblemente es una transposasa de un elemento IS presente en dicha bacteria. La expresión de la transposasa puede combinarse con un tratamiento de las células para amplificar un número de copias de gen, tal como irradiación.

15 Por ejemplo, se puede someter una cepa que expresa una o varias transposasas a una presión de selección creciente (p.ej., aumentando la concentración de etanol para potenciar su resistencia a etanol). Se producirá un barajado del genoma debido a la expresión de las transposasas y se seleccionarán los clones más resistentes.

20 Se puede usar el método de la invención para insertar cualquier gen de interés en una cepa de *Deinococcus*, en una o más copias, permitiendo un aumento de su expresión. El gen puede codificar cualquier producto de interés, tal como un ARN (mARN, tARN, siARN, etc.) o un polipéptido (proteína, péptido, etc.). Los ejemplos de dichos polipéptidos incluyen, sin limitación, enzimas implicadas en el metabolismo, cualquier polipéptido biológicamente activo, etc.

25 El polipéptido puede ser un polipéptido que presente interés farmacéutico y/o agro-químico. En una realización particular, el polipéptido es un compuesto farmacéutico (p.ej., adecuado para uso en medicina humana o veterinaria). Los ejemplos específicos de dicho compuesto incluyen, sin limitación, antibióticos, compuestos bacteriostáticos, anti-metabolitos, compuestos quimioterapéuticos, antioxidantes, anti-inflamatorios, polisacáridos, agentes anti-parasitarios, agentes anti-fúngicos, compuestos anti-virales, compuestos con actividad de citocina, factores de crecimiento celular, hormonas, anti-depresivos, anti-migraña, anti-asmáticos, anticonceptivos, anti-diabéticos, psicotrópicos, anti-arritmicos, inhibidores enzimáticos o adyuvantes.

El polipéptido también puede presentar utilidad, p.ej., en cosmética o agricultura, tal como pigmentos, insecticidas, pesticidas, compuestos de degradación química, etc.

30 Los ejemplos de enzimas incluyen enzimas de degradación de biomasa o enzimas de fermentación, tal como lacasas, xilanasas, amilasas, ADH (alcohol deshidrogenasa), PDC (piruvato descarboxilasa), etc. Otros ejemplos de polipéptidos incluyen enzimas de rutas biosintéticas biológicas, en particular enzimas implicadas en la síntesis de antibióticos.

En la siguiente sección experimental, que es ilustrativa, se describirán aspectos y ventajas adicionales de la invención.

35 Ejemplos

A. Caracterización de sitios de IS de *Deinococcus*

Los inventores llevaron a cabo una búsqueda y compilación de secuencias IS presentes en cepas de *Deinococcus*. En la Tabla 1 a continuación se presenta una lista completa de todas las secuencias IS identificadas encontradas en las diferentes especies de *Deinococcus*.

40

Tabla 1 – Distribución de IS entre las especies de *Deinococcus*.

<i>Deinococcus</i> sp.	IS200 / IS605	IS630	IS701	IS607	IS982	IS3	IS1	IS6	IS5	IS4	IS66	Total de IS	Tamaño genoma (Mb)
<i>D. deserti</i> VCD115	0	2	1	0	2	5	0	0	1	4	0	15	3,86
<i>D. geothermalis</i> DSM11300	3	1	17	1	1	0	19	8	12	8	6	76	3,25
<i>D. geothermalis</i> MX6-1E	6	0	6	0	0	0	12	2	1	18	10	55	3,25
<i>D. maricopensis</i> DSM21211	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3,5
<i>D. proteolyticus</i> MRP	0	0	0	0	2	0	0	0	5	13	0	23	2,89
<i>D. radiodurans</i>	9	10	0	0	0	0	0	0	2	25	1	47	3,28
Nº total de IS entre <i>Deinococcus</i> sp.	18	13	24	1	5	5	31	10	22	68	17	217	-

B. Inserción génica mediante recombinación homóloga mediada por IS en *Deinococcus*

5 Construimos plásmidos de *Deinococcus* (de tipo pMD66 para replicativo, de tipo pUC para no replicativo) que albergan casetes dirigidas a IS (véase la Fig. 1). Un fragmento de ADN que contiene un gen que codifica resistencia a higromicina (rectángulo gris) bajo el control de su propio promotor fue flanqueado por dos regiones de 500 pb denominadas HR1 y HR2 (rectángulo negro), que son homólogas a las secuencias N-terminal y C-terminal, respectivamente, de la secuencia de inserción IS66 de la *Deinococcus geothermalis*. Las secuencias de ácido nucleico de HR1 y HR2 se proporcionan como SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente. El vector dirigido a IS es transformado a 10 continuación en *D. geothermalis* y las cepas que expresan el gen de higromicina son seleccionadas usando el marcador embebido sobre placa PGY-agar que contienen 800 µg/mL de higromicina. En un experimento alternativo, se usó directamente un fragmento de ADN lineal que contiene HR1-higromicina-HR2 para transformar células de *Deinococcus*, llevándose a cabo la selección de recombinantes como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron los clones que presentaron resistencia a higromicina. Dichos clones son bacterias recombinantes que tienen insertado el ácido nucleico en un elemento IS. A este respecto, para verificar la inserción del gen que codifica resistencia a 15 higromicina en la IS66, los clones fueron sometidos a amplificación de PCR con cebadores designados "A" y "B", que se hibridan específicamente con la región por encima de IS66 y al extremo 5' del gen de higromicina, generando respectivamente un fragmento de PCR de ADN de aproximadamente 700 pb (véase la Fig. 1).

Los resultados presentados en la Fig. 1 confirman la inserción del ácido nucleico recombinante en la IS diana.

20 C. Inserción de genes de ruta de etanol mediante recombinación homóloga dirigida a IS en *Deinococcus geothermalis*

Se construyó una casete dirigida a IS que comprende un gen PDC y dos genes que codifican alcohol deshidrogenasa. La casete también comprende un marcador de resistencia antibiótica a higromicina. La casete está flanqueada por dos regiones de 500 pb HR1 (SEQ ID NO: 11) y HR2 (SEQ ID NO: 12) (Fig. 2, rectángulo negro), que son homólogas a las secuencias N-terminal y C-terminal de la secuencia de inserción IS66 del *Deinococcus geothermalis*, respectivamente. La casete comprende 6548 pb. La casete dirigida a IS (molécula lineal) o un vector que contiene la casete, son transformados en *D. geothermalis* y se seleccionan las cepas recombinantes que tengan insertada la casete en su cromosoma usando un marcador embebido sobre placa de PGY-agar que contiene 800 µg/mL de higromicina. El mapeo de la casete en el genoma es confirmado mediante PCR usando los cebadores "C" y "D", siendo el cebador C específico de cada secuencia por encima de IS66 y siendo D específico del extremo 5' de PDC. Los resultados se presentan en la Fig. 2. Muestran que la construcción se encuentra integrada en cuatro localizaciones diferentes de IS66: CDS_1696, CDS_1721, CDS_2881 y CDS_2557 (Fig. 2), en el cromosoma o en el plásmido nativo 1 de *Deinococcus*.

Estos resultados confirman la eficacia del método con construcción de ADN lineal. Confirman la especificidad del método, ya que la casete se encuentra en la IS diana. También demuestran la eficacia del método con casetes de expresión muy largas.

35 D. Inserción génica mediante transposición artificial mediada por IS en *Deinococcus*

Se prepara una casete de propagación de IS (Fig. 3). El gen de interés está flanqueado por 2 secuencias de repetición invertidas (negro, IRs) que pueden ser reconocidas por una transposasa. Se transforma un vector replicativo de *Deinococcus* que permite la expresión termosensible de transposasa en la cepa GOI_IRs. Tras la expresión de transposasa (gris), el gen es insertado y propagado en el cromosoma.

Referencias

- Craig, N. L. (1997). Target site selection in transposition. *Annual review of biochemistry*, 66, 437-74. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.437
- 5 Eichenbaum, Z., & Livneh, Z. (1998). UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics*, 149 (3), 1173-1181. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1460249&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 10 Frazier, C. L., Filippo, J. S., Lambowitz, A. M., & Milis, D. A. (2003). Genetic Manipulation of *Lactococcus lactis* by Using Targeted Group II Introns : Generation of Stable Insertions without Selection Genetic Manipulation of *Lactococcus lactis* by Using Targeted Group II Introns : Generation of Stable Insertions without Selec. doi: 10.1128/AEM.69.2.1121
- Gunji et al. (n.d.). US6303381B1.
- Islam, S. M., Hua, Y., Ohba, H., Satoh, K., Kikuchi, M., Yanagisawa, T., & Narumi, I. (2003). Characterization and distribution of IS8301 in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Genes genetic systems*, 78(5), 319-327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676423>
- 15 Kichenaradja, P., Siguier, P., Pérochon, J., & Chandler, M. (2010). ISbrowser: an extension of ISfinder for visualizing insertion sequences in prokaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 38(Database issue), D62-8. doi:10.1093/nar/gkp947
- Mahilion, J., Léonard, C., & Chandler, M. (1999). IS elements as constituents of bacterial genomes. *Research in Microbiology*, 150(9-10), 675-687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673006>
- 20 Mennecier, S., Servant, P., Coste, G., Bailone, A., & Sommer, S. (2006). Mutagenesis via IS transposition in *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology*, 59(1), 317-325. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04936.x
- Michel, F., & Peral, J. (1995). STRUCTURE AND ACTIVITIES.
- 25 Pastemak, C., Ton-Hoang, B., Coste, G., Bailone, A., Chandler, M., & Sommer, S. (2010). Irradiation-Induced *Deinococcus radiodurans* Genome Fragmentation Triggers Transposition of a Single Resident Insertion Sequence. (Array, Ed.) *PLoS Genetics*, 6(1), 10. doi:10.1371/journal.pgen.1000799
- Rawsthorne, H., Tumer, K. N., & Milis, D. a. (2006). Multicopy integration of heterologous genes, using the lactococcal group II intron targeted to bacterial insertion sequences. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6088-93. doi: 10.1128/AEM.02992-05
- 30 Robinson, D.G., Lee, M.-C., & Marx, C. J. (2012). OASIS: an automated program for global investigation of bacterial and archaeal insertion sequences. *Nucleic acids research*, 40(22), e174. doi: 10.1093/nar/gks778
- Sallam, K. I., Tamura, N., Imoto, N., & Tamura, T. (2010). New vector system for random, single-step integration of multiple copies of DNA into the *Rhodococcus* genome. *Applied and environmental microbiology*, 76(8), 2531-9. doi:10.1128/AEM.02131-09
- 35 Schneider, D., & Lenski, R. E. (2004). Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Research in Microbiology*, 155(5), 319-327. doi: 10.1016/j.resmic.2003.12.008
- Tobes, R., & Pareja, E. (2006). Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC genomics*, 7, 62. doi: 10.1186/1471-2164-7-62

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DEINOVE

5 <120> Sistema dirigido a IS para la inserción génica e ingeniería genética en bacterias Deinococcus

<130> B1739PC

<160> 12

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 1248

<212> ADN

<213> Deinococcus sp.

<220>

<221> característica miscelánea

20 <223> IS3_Deinococcus deserti VCD115-Deide_02801-ISDs1

<400> 1

tgaggatgac ccgatatggc gtagatggag ataagccctc acgataggag gcaccatcat	60
gactgatcgc agaatccaca ccgccgagtt caagcgagac gcagtgagc ttgctcgaac	120
gagcggcaac ctgtcgggca ccgcgcgtga cctgggcatc aacagctccc tgctgcgcaa	180
atggatgaat gctgagcagg agaagggcga gttggcattc cctggtcagg gcaaacagct	240
cctcactcca gagcaacagg agatacaacg gcttcgcaag gagaacgaaa tcctgcgaca	300
ggagcgcgag atcctaataaa aggcggcagc cttcttcgcc aaagaaacca cacgctgagg	360
tatgaattca tccaagatca acgccccgag taccgcctgg acctgctgtg ccgggtgctg	420
gaggctctcg tgagcgggta ccacagctgg cgaagaaggc cgatctgcga ccgcaaggaa	480
gaggatgcgc tgctcagaca gcgcatccag gaagtgcac aacgtagtaa acgccgctat	540
ggggcggcac gcattcacgc ggagttgcac gctggaggag tgccgcgtgtc ccgcaagcgg	600
gtggcgcgtc tgatgcgtgc cagtggctcg cgggccaagg gaaagcgcgg ctgggtgcgg	660
accacgggga gcagtcacac catggccgtc tgcccgaacc tgcttgagcg gcggttcgag	720
gtctcgcagc cgaaccagggt ctgggcgttg gacctgacgt atctgccac gaaagagggc	780
tggctgtatc tcgcagtcac cttagacctg cattcgcgag ccgtgggtggg ttacgcgatg	840
gacatgcaga tgccagccac cttgccactg gcggcccttc agatggctgc tggccgacgt	900
cttccgccac caggcctcct tcatcacagc gacaggggca gtcaatacgc gagtggcatc	960
tttcaggcag aactggcccg catgcgggcc aggggcagta tgagtcgtaa ggggattgt	1020
tgggacaacg ccgtgggtgga aagcttcttc agctccctga aaagggagtt gctggaggac	1080
accatctttg agaccgggga cgtggcccga caagccgtat ttgaattcat cgaggtcttc	1140
tacaaccgtc agcgtcgtca ctcgtctctt gggacttga cggccctgga gttcgaacgc	1200
caagctacag ctgcttaact tcagctacgc aatatcgggc caggccca	1248

25 <210> 2

<211> 1757

<212> ADN

<213> Deinococcus sp.

30

ES 2 728 317 T3

<220>

<221> característica miscelánea

<223> IS200/IS605_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo-2273-ISDge10

5 <400> 2
caaaacgggg tctggggctg aaaaccaacc ccttcagggg ttggatgcag agtcccagcc 60
ggccgtcagg gcgggcaggg ctgaggctgt tgcgccgtgt tagtaggggc ttgcgacaaa 120
cgccgagccg tgtcagtctc tcttcgtggc tgaccagtac aaacacgcca acaccacggt 180
gtatctgctg aactaccact tcgtgttcat cccgaagcgg cggcggaagg tgctggtcgg 240
cccggtcgag acgcgcctga aggaagtgct ggcggagaag tgtgcggaga tgaagtggga 300
cattctcgcc ctgaggtga tgcctgacca cgttcacctg ttccttgccg ccgacccccg 360
caccgcgcc aatcaggtga tgcacttctg gaagggctac acgtcgcgga ttctccggca 420
ggagtccccg cacctgaaca cgctccccgc cctgtggacc cggagctact tcgtgtccac 480
ggctggggcg gtgagtgggg ccaccatcca aaagtacatc gccgctcaga agacgagggg 540
ctgaatgacg acgcaccgca aggtctacag gtatcggatt gagccgacct cggttcaaga 600
gtcgaagctg tacatgctgg cgggaagtgc gcgcttcgtc ttcaactggg ctcttgccgc 660
tcgaaggaa cactacgccg aaacgggcaa gaccctgggg tacaacgctc aggcgggaga 720
gttgacggcc ctgaagaacc aggagaaac ctctggctg aaggaatcgg acagccagct 780
tctccagcag gccctcaagg acgtggagcg ggcttcgtc aacttcttg agaagcgggc 840
gaggttcccc cggttcaaga gcaaaaagac ggatactccg cgcttccgta ttccccagcg 900
gggtcgggata gaggggagcc gtgtgtatgt cccgaaggtg ggatgggta agctccgcaa 960
gtctcaggag atagagggca agaccaagag cgcgacgttc aagcgggagg cagacggtca 1020
ctggtacgtc ttgctcgtct ccgagtttga gatgcccgat gtaccgctgc cccccgtccc 1080
tgagtccgag gtggtcggga ttgacctcgg cctgaaggat ttctacgtgt tgtccgacgg 1140
cgggcggaaa gagggccccg ggtttgcccg caaggggag cggaaactcc gccgcgctgc 1200
ccgtcgtcac tccaaatgca ccagggggag caaccgcaag gcgaaggcca agcgggaagct 1260
cgcccgtgtt caccgccaga ttgcgaatca gagaaggac ttcgttcaca aggccacctc 1320
cggctctgtt cagcagtacc agggtttctg catcgagaac ttgagcatca aggggatggc 1380
gaaaaccaag ctgtccaaga gcgttctcga cgcgccctg ggagagtctc gccgccagct 1440
-
cgcctacaag gccagtggtc accggaagtg gctgggggtc atagaccgct ggtttccgtc 1500
cagcaagctg tgtggggaat gcggcagcat caacgcagac ctgaccctga gtgaccggga 1560
atggacgtgc gaatgtggag cggttcacga ccgcgacctc aacgccgccc ggaacatcaa 1620
gcgggaagg ctttcgcaaa tcgtcgtcgc ggggcacgcg gagacgttaa acgctcgggg 1680
agaggtgtc agacctgcga tagcgggag ccctcgatga agcgagaatc caacggcttt 1740
agccgttggg gtgtcaa 1757

10 <210> 3
<211> 1071
<212> ADN
<213> Deinococcus sp.

ES 2 728 317 T3

<220>

<221> característica miscelánea

<223> IS630_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_1042-ISDge7

5 <400> 3
 ttattgagtc cggcatgggt tggagacgac aggtacactg agggcgtgct ccgcgtctgg 60
 cgaccctoga ccctgacccg cgaccaactg gaggaacggc ggctctatgc tcagcaactc 120
 ctagccacag gcgagatcag taccaaggaa atcgcggaaa cgctcggcgt ttccgaaagt 180
 accgtccgaa cctggaagca gcgcctccgt gagcatggga gcctcaaggc tacccaagct 240
 ccggggcctc cccagcgcct gagtccagaa cagcgtgctc agttggagga actgctccgc 300
 gaaggacctc tggccgctgg ctaccccgac tcgcgttggc ctaccctcgc cgtgcggggc 360
 atcatcggaa cgcactttga cgtgtgtgat cacgccgatc acgtcagaac agtccttcat 420
 cagctcggct tcagtcctca gaagccagaa ccgcgtgcc cttggaacgaa tgagcaggcc 480
 attcagactt ggtcgagca cacgctcccc gagttggaaa aaaaaggctc agcagggcgc 540
 gaccctcgtc ttctcgtatg aaagtggctt cagtctgaag cccaccgtga cccgaacctg 600
 ggcccctoga ggacaaacac cgatccttcg gacgaaagca gcttgggaca agctctcgac 660
 catcggggcc atcaccacga gcggccagtt cctgcaacac acacactcgg gagccattcg 720
 aggtgctcag gtggtggcct tctgccaaca tcttctccgg cacgtgcagg gtgaattcgt 780
 tgtgctgatg gataacgccc gcatccacaa aacgaaggcc ctgagggcct tcgttgagca 840
 gcaaccgcgt ctcaccatcg aatatcttcc accttacgcg cctgacctca accccattga 900
 gcgggtgtgg gcctacatca aaggaccaat cctgggcaac ttctgcgcca aggacatcgg 960
 cgaattgaag gggagactga aggctgcctg gcaacgtggt cgctacgttc agctcccca 1020
 gcgcctcgcc cgcccctacc gtgcgtccca aacctaagcc ggagtcaata g 1071

<210> 4

<211> 1150

<212> ADN

<213> Deinococcus sp.

10

<220>

<221> característica miscelánea

<223> IS701_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_3008-ISDge5

15

<400> 4

ES 2 728 317 T3

tcaggagttg cacctgaata ggtagcgaag aagcgcctccc agacgcgaga atctggggat 60
gtcgaattcg cagattctgg gggagcgcgc ccgtattctg gcagatcagc tcctcgtgt 120
gccaccacc gtctatcagc agcgcagctt gcaagctgcg ctgcacctgt tcctcgatac 180
ggggacaaa accgccctgc accgtgcgcc gctggctcagc aagagtgcgg tgagccgctt 240
gttgaacaat tatgactggg atacagcggc ctgctgggcg ttgctccagc gcagccagtg 300
ggaggccctg ctgctcgcgc cacgacgcaa gcgtcgtgcc tgccctccggt tgagcgtgga 360
cctgaccagc atcgagaaga cgggcaagca attgcccttc gtccgcgtct acaacgaagt 420
ccacggcatt catctggtcg tgctgtttgc cgaataccgg gggctgaaat tcccgtggg 480
gtatcgggtc taccggggaa agggcacagc aacccccgtg tcgctcgcgc tggaattgct 540
gggggaggtg cccgacgcca ttcggaagcg ctttcgaatc cgtgtgctgg cggacagcgg 600
ctttgaagcc gctgtcttcc tggatggggg tcgtaccctg ggcttcgagt tcgtcgtcgg 660
cgtccgagcg actcggcgta ccaccatcc cggtaagtg acggtggcgg actgcgaaca 720
tggggcctgg ctggaattgc agaactggcc gcatgacacc ctgaccctcg cccgagttga 780
gcggggagag cggacctttt tctcggtcgc ctcagagttg atgacgggag acgaagtggc 840
cgccgagggg ggcaagcggg ggaacatcga gtcctttttc aaggagggca agcaccagtt 900
tagtctccag cagttcgcct tgcgaactgc ccgcggctta gaccgctggg tgctgctggt 960
gtttctcgc ttcaccttaa cgatgctgca ccgctcgcct gacctctcgc ttgaagaggc 1020
cgcagggctg gccttgacc tggccctccc tttcctcgc ttgaacgtca tcttcgccc 1080
cctcgcaca gacgaggaat ttctgcgcca gcacggctat tcaactcaaaa ttgcaaggtg 1140
caactcctga 1150

<210> 5
<211> 907
5 <212> ADN
<213> Deinococcus sp.

<220>
10 <221> característica miscelánea
<223> IS982_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_1090-ISDge8

<400> 5
accgcaata ggggttgaca gagcaggggg agaaatggca aaggacggt gctcatgtgc 60

ES 2 728 317 T3

	cgtcccgacc tcagtttact ccccatcccg gaggcgctcc agcacctcac ggtctggctc	120
	actccgcaga tgccctccaa gctgatccat ccgcacgaaa aaatcagtga cggcgaactg	180
	gtcgcgtgtg ccctgttgca acgcctctac aaagcgccgt atttcaaggg gtggtggaag	240
	ctcaatcaact gtccccactt cccctccgag gtgcaggccc gaaccggtt ggaacgcctg	300
	acgcctgtaa tggagcgact tgcaaccgaa gtccaggcac tggacttcgt cgctgtggac	360
	tccgaaccgc tcccgggtgtg caccttcaaa cgcgcgcccc gctgcaagtt caaaggggca	420
	cgacacggct tcagtactgc tggcccgtc tatgggttca agctgcatgc ctggaccacc	480
	ctgaaccgca agatcgctaa gtatgagatc cggcccgcga acgaacacga cttcacggtc	540
	gggtgctgta tgaaccagga ttggcccgcc tatgggagga atggcgtcct caggggcgtc	600
	cgttcaagac gaacagggcc gaagcaaatt ggggacaaag gctaccagt cggcacctat	660
	ctgacgcctc ccaagaagaa tgccaagcga tctgaccctc ggtggaaaga agaatatgcg	720
	gcagctcgta agatcatcga atcggcgttc tccgtcctgg tgggtccgg gctgcgtgg	780
	gggcaggtca aaaccctggt tagtctctgc cttaaggctg ccctcctcgt cctggcgcac	840
	aacctcaagt tccttgacct ctccccctga tcacagccca gcctccgagt caaccctat	900
	tccggt	907
	<210> 6	
	<211> 748	
5	<212> ADN	
	<213> Deinococcus sp.	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
10	<223> IS1_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_0430-ISDge2	
	<400> 6	
	ggtagtggct gcgacgacgt gatgtaatgg aggggtgccc gagtgcccaa cctgtcagag	60
	catccagacg gtcaagaacg gaaaggccaa aaacggcacc cagacgtact tgtgtaaggt	120
	ctgtggtcgt cgcttccacc ccaacgccag acctgtggcc cacagtgaag cgaccaagga	180
	gcagattctc caggcgggtc atgagcgaat gacgctcaga ggcgtaacgc gcgtgtttgg	240
	cgtccaccgc aacaccgtca tccggtggat aaaaaggggg cctccgaagt gaggcagacc	300
	gtaccggtct gcctcacacc tcccgaagaa gtggtggttg agctggatga attgtggacc	360
	ttcgtgggca agaaaaagca ggcgaggtgg ctctggattg ccctggagcg cagcaccoga	420
	aaggtgctgg cttgggttct gggcgaccgg agtgagcaaa ccgcgttcaa gctctgggac	480
	cgcttgccgc tgtcccaga acagcgcctg aaggcacgt tttgcacgga cctgtggcgt	540
	gcttacgacg agccactcct ggggtgtaag cggctcacc gcaaggggga aacgaaccac	600
	gtcgaacggc tcaactgcac cctcagacag cggctaggtc ggctggtccg caagtcggtg	660
	tccttctcaa agtccgacga gatgctcga ggcagcctga ccctcgcctt ccatcgctac	720
15	aacctgtcac gttgatgcag ccactacc	748
	<210> 7	
	<211> 806	
	<212> ADN	

ES 2 728 317 T3

<213> Deinococcus sp.

<220>

<221> característica miscelánea

5 <223> IS6_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_2913-ISDge13

<400> 7

```

ggttctgtca ggtaagttc gggtaggctg gtttatcgtg cctgctgacc cgaagcccta    60
tcgccaccgt ttccccaaga gcatcatcca acacgccggt tggctgtatc accgcttccc    120
tctcagctac cgagatggtg aagaattgct gctccaacgc ggaattcaag tcagtcaacga    180
aacaattcgt gactgggtgcg ataagttcgg cccaccatc accaaggaat tgaagaaacg    240
ggaaccccat cggggttccc attggcacct ggatgaagtc tgcgtcaaga tcaagggcgt    300
caagcactgg ttgtggcgtg ccgtggacga gcatggcgct gtgctggatg ttcttctgca    360
agaacaccgc gacactgagg cggccaagat gttcttcaact atggtgctga gcaactacga    420
ggctccaacc accatccaca ccgacaaact gggcagttac agagcagcca ttcgtgagat    480
tcctgaactt catggtgcgc tgcaccgtga agtgatttcg acggccaggt gcaacaattt    540
gattgaacag tcgcaccgac cgacacgaaa tcaggaacga agccagaaaag gcttcaaggg    600
catagagaac acacagaaat tccttgatct acacgccaga accagcaatc tccaccagtt    660
cacgcgaacg accgtgaccg ccaaaaacgag acgaagcaac cagagaaccg cttttcaaac    720
ctggaacgag gttgcgctgc tcgcagcctg accaatcagg ccaccctgcc cccgtcaacg    780
tcgcaaaaac ttaacctgac agaacc                                         806
    
```

10 <210> 8

<211> 1117

<212> ADN

<213> Deinococcus sp.

15 <220>

<221> característica miscelánea

<223> IS5_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_2191-ISDge6

<400> 8

```

agaccgctg cgaaataggg gcgggtgtgaa gtagattcgg ggggtgttgc gcgtccagac    60
gctgaaaacg cggtcccgtg ccttcgaacg cctcatcggg ctgactcctg agcagttcga    120
cgctttgctg gccgacctcg aaccggagtg ggagcgcgct cgtcgctcgt ccctgctgcg    180
    
```

20

ES 2 728 317 T3

tgctgaccgc gttcggggcga ttggcgggtgg ccgcacccac aagctggaac tgccagagcg 240
cctcttggtg acgttgctct atctacgtca gtacttcacc gtccacgtcc tcgggatggt 300
cttcgacctg gacgacagca acgtgtgccg caacattcac gccctgctgc ccgtcctgga 360
gcaggttctt cccgctcccg tgcgcgccag gacgttggcg gccacgggag acgagccgcc 420
gaagaagggc gagaagaagc cagcaagat ccgctcgctc gacgagttcg ttgaagcctt 480
ccccgagtac gaggacctga tcgtggacgc gaccgagcag cctcgcggcc agcccaaagt 540
caagaagggg gagacgccg gcaagaaggc ggtcggacgt ccgaaagaca agaagaagtt 600
tttcagcgtc aaggcgggca cccataccct caagacccaa gtgcgctca cgccggacgg 660
gctgattcgg cacctgagcg cccccgtgcc gggccggatg cacgacatgc gcctcttgcg 720
ccgctcccgg ctggaagggc gcgtgcccg ccacgtgccg ctgtggggcg atcggggcta 780
caccggactc gacacgctct acccggaccg agagacgggtg gtgccccgca agaagcccaa 840
gaaaggcgtg ctcagcgacg aagacaagga gatgaaccgc ctgatcgcca aggtgcgcat 900
cacggtggag aacgtcctgt gtcagatcaa gaagtaccgg gcgtgtggag agttcttccg 960
caatcccatg aagcggcacg gggatgatgt gggatgcgtg gcaggcctgg tgaacctacg 1020
aacgctcgac cgcttgccc tccatcccgc ctgaacgacc cagcaacgac ggagagccgt 1080
gcctggtcgg cacggcccct tgtttcgcag caggtct 1117

<210> 9
<211> 1127
<212> ADN
<213> Deinococcus sp.

5

<220>
<221> característica miscelánea
<223> IS4_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_1784-ISDge9

10

<400> 9
ctctctaggg gtcaaaactc agatggagac ttgagaagtc ggctcctgta cgggtgtttc 60
tgcgatgaaa gacacccgga gccgaccgc tcagtctagc ctcaactgcc tgcttctgta 120
gcacttcccg ctggatcctc gtcgcctgac cgtcttgagc gccctgatct tggccgtgat 180
tcaggcacga agcgtcgttc tttaccagct cgtccagatc gttgacctc ccggctcaaa 240
cgacaccgtg taccaacgcc tgaagcgctt cgtgcaattc gcacttctctg atctcctggt 300
tgcccgcttc gtccctggccc atctgcgaga cgagcagcat ctgctgctcg tcctggaccg 360
caccaattgg aagctcggtc agcaggacat caatattctc ctgctcagtg tgcggtggca 420
gaccttcagt ttcccgcctc tctggacctt gttgccgcat agcggcaaca gcaacatggc 480
gaccgcgcat gcgctggctg aacgcctgct cccattgctc cagggcaaga cactcttctc 540
ggccgctgac cgagagttcg tcgggtggga gtggttcgtg gccttgcgcc gcatgagcct 600

15

ES 2 728 317 T3

ttctcccgtg atccgtttgc gggctgacag catggctgag gggccccag tctgggtcag 660
 attcaagaaa ctcaagccgg gtgaagtgcg ggtctggtac aagcccactc acgtctacgg 720
 cgtgacgctg cgcgttctag cgtgccagaa cgtccacggc cagactctct tcctggctta 780
 ccaaggccat gctgaaaaag ccctgaaaag ttacgcgctg cgctggacag cagaaaacat 840
 gcatcagggc ctgaaatcca ggggcttttt tctcgaaagc actcacctga ctgatcccag 900
 tcgggtttcc acgctcctgg ccgtggtcgc actggccttt gtatggtgct gtttagtggg 960
 agagtttgag cagcagcgtg acccgtcacg ctgcctcagg cacggctatc cccccaaaag 1020
 cctcttcaga cgtggcctgg atgcccttcg cggcgtgctg accaagccca accgtggggc 1080
 tgcacgcgcg tttcccgact ttctcgccac ttttgacccc tagagag 1127

<210> 10
 <211> 1453
 <212> ADN
 <213> Deinococcus sp.

5

<220>
 <221> característica miscelánea
 <223> IS66_Deinococcus geothermalis DSM11300-Dgeo_0266-ISDge4

10

<400> 10
 gtgactactc agcaggggga gttgatgtct gcgcaaggt agagtagggc atcacacagg 60
 acgcctgccc gaactgcca cgcactggaag ctgaacttgt gcagcttcgt caggaacttg 120
 agcgtctgaa ggcagagcta cgcgaactga aatcccgtct gaaacgcgat agtgagactt 180
 caaatcagcc accgagcaaa gacccgccct ggaagcccaa aagtgagcgg cagaagagcg 240
 aacgctcttc tggtggctcag cgtggtcatc cggggaaaac cctgaaattc agtgacgaac 300
 ccgatgacat ccagcccctc ccgctcacgg gtcaatgcgg gtgtggacaa gcgtgggacg 360
 aggtgaaggc gactgaacat ctggcccggc aggttcacga cctgccgaa ctgcccctgc 420
 acatcactga atttcaggct gaagtcaaaa tctgtcccag gtgtggttgc cggggacagg 480
 cggcttttcc tgagcatggt cctggacagg tgcaatacgg gccgcgctg cacgccctga 540
 cgacatattt gaatgtggtg catttcgtac cactgcaacg ggtaactcag atcacggacg 600
 cgctttttgg cgcgtccatc agcgtggca ccgtggctct gaacatcaat ctggcctcag 660
 agcgcctcaa accgtttgag gacgacctga aggtggact caggcagcaa cccgtgctgc 720
 acgcagatga aacgggcgca aaggtgaatg gcaaattgaa ctggttccat gtcgcgtgct 780
 ttgctggtgg gacgctctac acgctgcatc cgcaacgagg ctatgccgcg atcaaagccg 840
 ccggtgtcct gtctgacttt gggggcgtcg tggttcacga cgcttggaac acctatttcc 900
 gtctgccagg ggaacatgcg ctgtgcaatg ctcacctgtt gcgggagtta cgcaaactgg 960

ES 2 728 317 T3

atgagcatga cgggcaaccc tgggccggtg aactgcgacg cgaactccag caggtctacc 1020
 acttgcaaaa atcaggagga atcaccgaac agcagaaaat ggccttctat acacgctttg 1080
 acgaactggt gcaggctgct ctggaagcca acccagtgca ggaaccatt ccaaacacagc 1140
 gtgaaaacc caaacaactt ccaggagga acctagcctt gcggtgccag cagcatcgcg 1200
 ccgcatgct gcgctttctg gaacgtgatg atgtgccctt tgataacaac caggccgagc 1260
 gtgacatcag gatgctatgc gtgaaacgca aggtttcagg tgggttccgc tctgaggcgg 1320
 gtggcgaggc gttctgtcgc attcggagtt tctgtcaac ccttcacaag cagggtctat 1380
 ccgtttggga cggtttagtg gatgttttc gcggtgtcct acccaaactc gatttctcgt 1440
 gctgagcagt tac 1453

5 <210> 11
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> región HR1

<400> 11
 gtgactactc agcaggggga gttgatgtct gcggcaaggt agagtagggc atcacacagg 60
 acgcctgccc gaactgcaa cgactggaag ctgaacttgt gcagcttcgt caggaacttg 120
 agcgtctgaa ggcagagcta cgcaactga aatcccgtct gaaacgcgat agtgagactt 180
 caaatcagcc accgagcaa gaccgcctt ggaagcccaa aagtgagcgg cagaagagcg 240
 aacgctcttc tggtggtcag cgtggtcatc cggggaaaac cctgaaattc agtgacgaac 300
 ccgatgacat ccagcccctc ccgctcacgg gtcaatgcgg gtgtggacia gcgtgggacg 360
 aggtgaaggc gactgaacat ctggcccggc aggttcacga cctgccggaa ctgcccctgc 420
 acatcactga atttcaggct gaagcaaaa tctgtcccag gtgtggttgc cggggacagg 480
 cggcttttcc tgagcatggt c 501

15 <210> 12
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> región HR2

<400> 12
 ctggacaggt gcaatacggg ccgcccctgc acgcccctgac gacatatttg aatgtggtgc 60
 atttcgtacc actgcaacgg gtaactcaga tcacggacgc gctttttggc gcgtccatca 120
 gcgatggcac cgtggctctg aacatcaatc tggcctcaga gcgcctcaaa ccgtttgagg 180
 acgacctgaa ggctggactc aggcagcaac ccgtgctgca cgcagatgaa acgggcgcaa 240

ES 2 728 317 T3

aggatgaatgg caaattgaac tggttccatg tcgctgctt tgctggtggg acgctctaca	300
cgctgcatcc gcaacgaggc tatgccgcga tcaaagccgc cgggtgcctg tctgactttg	360
ggggcgctgt ggttcacgac gcttgaaca cctatttccg tctgccaggg gaacatgcgc	420
tgtgcaatgc tcacctgtt cgggagttac gcaaactgga tgagcatgac gggcaaccct	480
gggccggtga actgcgacgc gaact	505

REIVINDICACIONES

1. Un método para introducir una molécula de ácido nucleico en el genoma de una bacteria *Deinococcus*, que comprende la introducción dirigida de dicha molécula de ácido nucleico en una secuencia IS presente en el genoma de dicha bacteria.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha IS está presente en varias copias en el genoma de dicha bacteria.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia IS se selecciona entre IS200/IS605, IS630; IS701; IS607; IS982; IS3; IS1, IS6; IS5; IS4 o IS66.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ácido nucleico se introduce en el genoma de la bacteria mediante recombinación homóloga con una IS presente en el genoma, mediante inserción mediada por intrón en una IS, o mediante transposición mediada por IS.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ácido nucleico comprende un gen de interés flanqueado, en uno o en ambos lados, por una secuencia de mediación de la inserción.
- 15 6. El método de la reivindicación 5, en donde la secuencia de mediación de la inserción comprende una secuencia homóloga a una secuencia de la IS, que permite la inserción mediada por IS del gen de interés mediante recombinación homóloga.
7. El método de la reivindicación 5, en donde la secuencia de mediación de la inserción comprende un elemento de Repetición Invertida de una IS, que permite la inserción mediada por IS del gen de interés mediante transposición; o una secuencia de intrón, que permite la inserción mediada por IS del gen de interés mediante retro-alojamiento.
- 20 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de ácido nucleico es lineal o circular.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el gen de interés comprende un marco de lectura abierto, preferiblemente un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido o ARN biológicamente activo.
- 25 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde antes, durante o después de la inserción mediada por IS del ácido nucleico en el genoma de la bacteria, la bacteria es sometida a un tratamiento de amplificación génica, preferiblemente un tratamiento de daño a ADN o térmico.
11. Un método para producir una bacteria *Deinococcus* recombinante que comprende una o varias copias de un gen de interés insertado en su genoma, que comprende introducir dicho gen de interés en el genoma de dicha bacteria mediante inserción mediada por IS y, opcionalmente, amplificar el número de copias sometiendo dicha bacteria, o un descendiente de la misma, a un tratamiento de amplificación génica.
- 30 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bacteria *Deinococcus* se selecciona entre *D. deserti*; *D. geothermalis*; *D. maricopensis*; *D. proteolyticus*; o *D. radiodurans*; *D. murrayi*; *D. cellulolysiticus*; *D. guilhemensis*, *D. aquaticus*, *D. ficus*, *D. gobiensis*, *D. grandis*, *D. radiopugnans* o *D. roseus*, o de cualquier bacteria *Deinococcus* termófila, más preferiblemente la bacteria *Deinococcus* es una bacteria *D. geothermalis*.
- 35 13. Una bacteria *Deinococcus* obtenida mediante inserción mediada por IS de un ácido nucleico, o un descendiente de dicha bacteria.
14. Una bacteria *Deinococcus* que comprende una o varias copias de un ácido nucleico insertado en un elemento IS.
15. Un ácido nucleico que comprende un gen de interés flanqueado en ambos lados por (i) una secuencia homóloga a una secuencia de elemento IS de *Deinococcus* o (ii) una secuencia de una secuencia de repetición invertida de elemento IS de *Deinococcus*.
- 40 16. El uso de una bacteria de la reivindicación 13 o 14 para la producción de un polipéptido que tiene interés farmacéutico y/o agroquímico, o para la producción de una enzima tal como una enzima de degradación de biomasa o una enzima de fermentación, tal como lacasas, xilanasas, amilasas, celulasas, glucanasas, ADH (alcohol deshidrogenasa) o PDC (piruvato descarboxilasa).

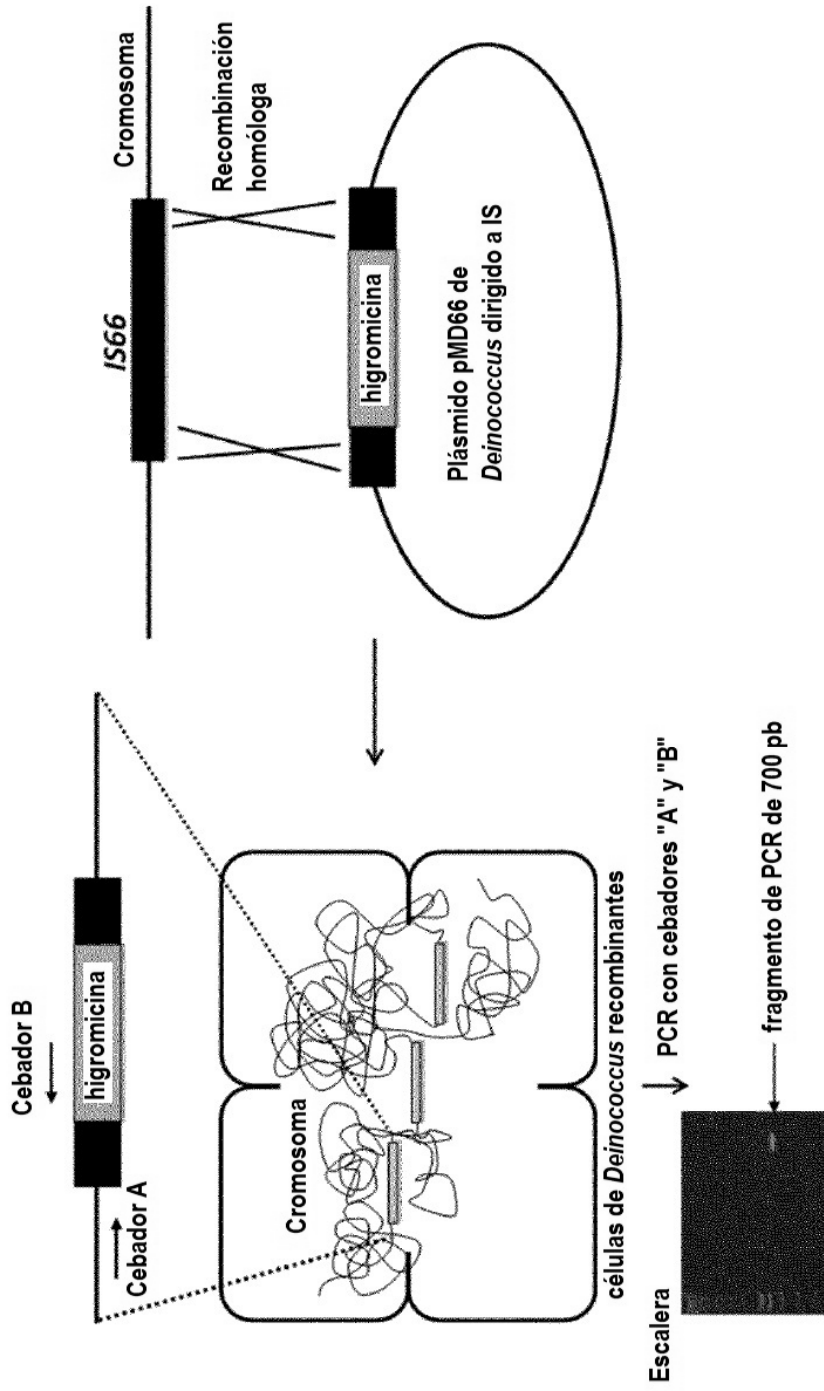


Figura 1

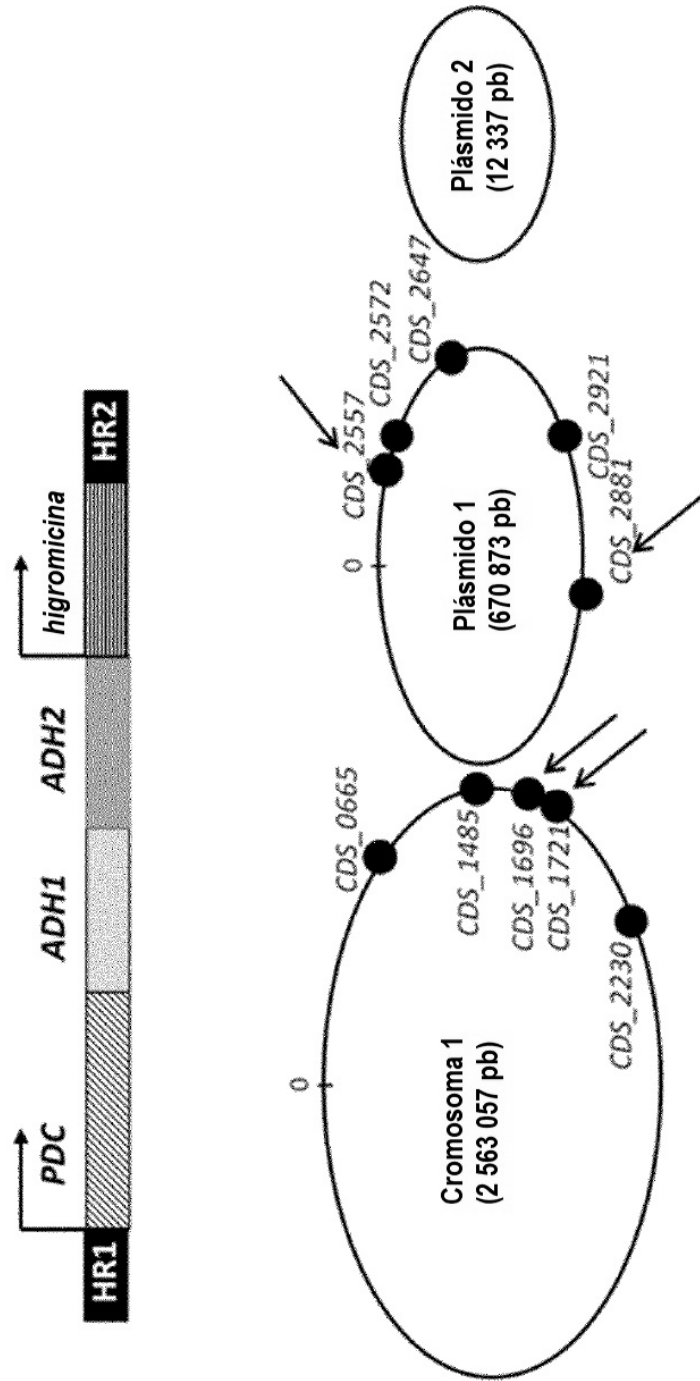


Figura 2

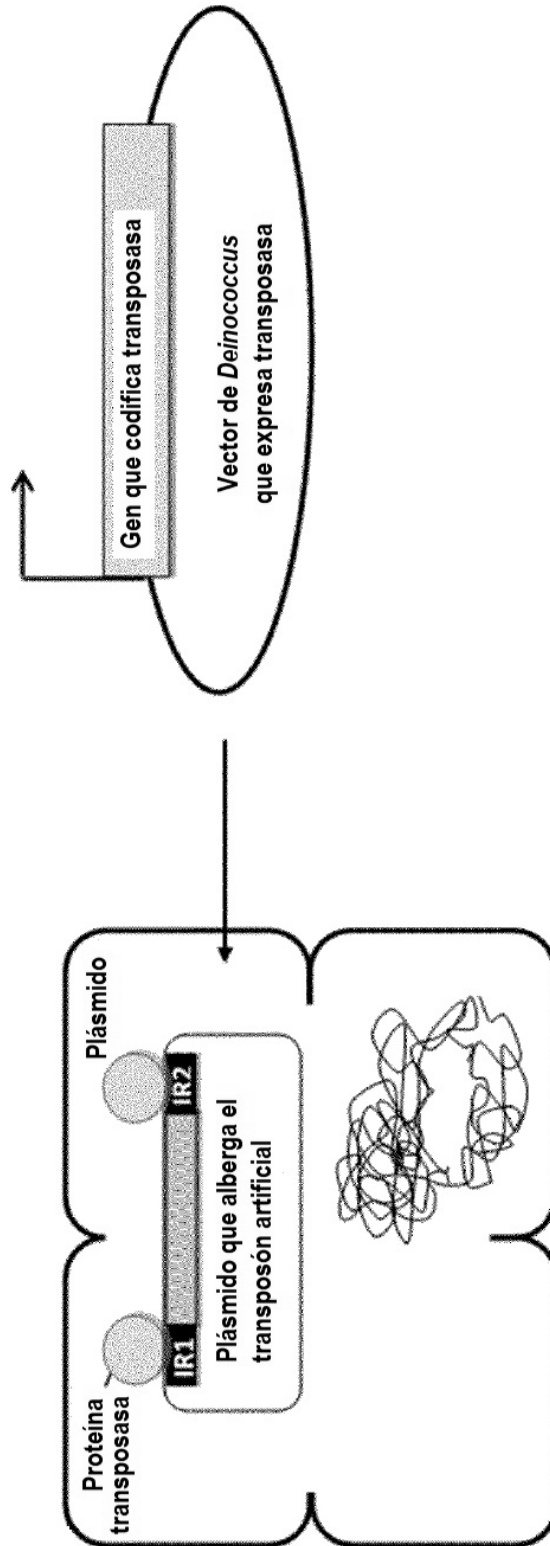


Figura 3