

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 116**

21 Número de solicitud: 201232017

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**24.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.08.2014**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**SERRANO, 117**

**28006 MADRID ES y**

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POZUETA ROMERO, Javier;**

**BAROJA FERNÁNDEZ, Edurne;**

**MUÑOZ PÉREZ, Francisco José;**

**RAHIMPOUR, Mehdi;**

**MONTERO MACARRO, Manuel y**

**ALMAGRO ZABALZA, Goizeder**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **COMPUESTOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS,  
COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN, PROCEDIMIENTO DE  
IDENTIFICACIÓN DE LOS MISMOS Y SUS APLICACIONES**

57 Resumen:

La presente invención describe una serie de compuestos útiles para reducir o anular procesos determinantes de la patogenicidad y virulencia bacterianas y de la adherencia bacteriana a superficies inertes o células tales como la producción de adhesinas, la motilidad flagelar y la formación de EPSs y biofilms bacterianos. Estos compuestos pueden usarse para la elaboración de composiciones farmacéuticas antibacterianas o de composiciones antisépticas para el tratamiento de un amplio abanico de infecciones bacterianas, como por ejemplo, E. coli, S. typhi, S. dysenteriae, V. cholerae, P. aeruginosa, H. pylori, L. monocytogenes, C. difficile y S. pyogenes. Además, se describe un procedimiento para la identificación de dichos compuestos.

**ES 2 483 116 A2**

**DESCRIPCIÓN****COMPUESTOS ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN, PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE LOS MISMOS Y SUS APLICACIONES**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

10

La invención se enmarca en el campo de desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, la limpieza de materiales asépticos, evitar la proliferación bacteriana en superficies y canalizaciones y por tanto está dirigida al campo de la biomedicina y el desarrollo farmacéutico. También se enmarca en el campo de desarrollo de compuestos que fomenten la interacción de rizobacterias beneficiosas con células vegetales y por tanto está dirigida al campo de la agricultura y la agronomía.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

20

25

30

El glucógeno es un homopolisacárido altamente ramificado formado por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación. En bacterias, la función de este polisacárido de reserva no está bien definida todavía, pero diversos trabajos han vinculado el metabolismo del glucógeno con la supervivencia, y en el caso de patógenos con la colonización y virulencia [Jones, S. A., Jorgensen, M., Chowdhury, F. Z., Rodgers, R., Hartline, J., Leatham, M. P., Struve, C., Krogfelt, K. A., Cohen, P. S., Conway, T. (2008) Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157:H7 in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 76, 2531-2540; Sambou, T., Dinadayala, P., Stadthagen, G., Barilone, N., Bordat, Y., Constant, P., Levillain, F., Neyrolles, O., Gicquel, B., Lemassu, A., Daffe, M., Jackson, M. (2008) Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis and impact on the persistence in mice. *Mol. Microbiol.* 70, 762-774; Bourassa, L., Camilli, A. (2009) Glycogen contributes to the environmental persistence and transmission of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 72, 124-138; Wang, L., Wise, M. J. (2011) Glycogen with short average chain length enhances bacterial durability. *Naturwissenschaften.* 98, 719-729]. Sintetizado por la glucógeno sintasa (GlgA) utilizando ADP-glucosa (ADPG) como molécula donadora del grupo glucosilo, la acumulación de glucógeno bacteriano es un proceso que requiere energía (ATP) y que ocurre cuando en presencia de una fuente de carbono en exceso, existe una deficiencia de otro(s) nutriente(s).

35

40

45

50

55

60

65

La regulación de la síntesis de glucógeno en enterobacterias abarca un complejo ensamblaje de factores que están ajustados al estado nutricional de la célula [Montero, M., Eydallin, G., Almagro, G., Muñoz, F. J., Viale, A. M., Rahimpour, M., Sesma, M.T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2009) *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. *Biochem. J.* 424, 129-141; Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M., Pozueta-Romero, J. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 952-985]. A nivel transcripcional, estudios recientes han mostrado que el metabolismo del glucógeno está sujeto a la regulación del operón *glgBXCAP* perteneciente al regulón a través de RelA [Montero, M., Almagro G., Eydallin G., Viale, A. M., Muñoz, F. J., Bahaji, A., Li, J., Rahimpour, M., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2011) *Escherichia coli* glycogen genes are organized in a single *glgBXCAP* transcriptional unit possessing an alternative suboperonic promoter within *glgC* that directs *glgAP* expression. *Biochem. J.* 433, 107-117]. *glgBXCAP* forma parte del regulón PhoP-PhoQ [Montero, M., Eydallin, G., Almagro, G., Muñoz, F. J., Viale, A. M., Rahimpour, M., Sesma, M.T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2009) *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. *Biochem. J.* 424, 129-141], de modo que su expresión responde positivamente a la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$ . A nivel de actividad enzimática, la biosíntesis de glucógeno está sometida a la regulación alostérica de la ADPG-pirofosforilasa (AGP, también llamada GlgC en bacterias), la cual produce ADPG desde ATP y glucosa-1-fosfato (G1P) [Ballicora, M. A., Iglesias, A. A., Preiss, J. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 213-225]. Los reguladores alostéricos que incrementan su actividad han sido ampliamente descritos y entre ellos se encuentran: NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2), 3-fosfoglicerato (3PGA), sedoheptulosa 1,7-difosfato, D-arabinitol 1,5-difosfato, glucosa 1,6-difosfato, gliceraldehído 3-P, 2-fosfoglicerato, magnesio ( $Mg^{2+}$ ), eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato y fosfoketodeoxigluconato [Preiss, J. (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 38, 419-458; Preiss, J., Shen, L., Greenberg, E., Gentner, N. (1966) Biosíntesis of bacterial glycogen. IV. Activation and inhibition of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase of *Escherichia coli* B. *Biochemistry.* 5, 1833-1845]. Por otro lado, el AMP actúa como regulador alostérico negativo de GlgC.

Las bacterias poseen además otras AGPs que no son reconocidas por anticuerpos específicos contra GlgC [Martin, M.C., Scheneider, D., Bruton, C.J., Chater, K.F. and Hardisson, C. (1997) A *glgC* gene essential only for the first two spatially distinct phases of glycogen synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 179, 7784-7789; Morán-Zorzano, M.T., Alonso-Casajús, N., Muñoz, F.J., Viale, A.M., Baroja-Fernández, E., Eydallin, G., Pozueta-Romero, J. (2007) Occurrence of more than one important source of ADPglucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *FEBS Lett* 581, 4423-4429; Eydallin, G., Morán-Zorzano, M.T., Muñoz, F.J., Baroja-

Fernández, E., Montero, M., Alonso-Casajús, N., Viale, A.M. and Pozueta-Romero, J. (2007) An *Escherichia coli* mutant producing a truncated inactive form of GlgC synthesizes glycogen: further evidences for the occurrence of various important sources of ADP-glucose in enterobacteria. FEBS Lett 581, 4417-4422]. Las plantas también poseen AGP y aunque su homología con las AGPs bacterianas (como por ejemplo, la GlgC de *E. coli*) es muy baja [Li J., Almagro G., Muñoz F.J., Baroja-Fernández E., Bahaji A., Montero M., Hidalgo M., Sánchez-López A.M., Ezquer I., Sesma M.T., Pozueta-Romero J. (2012) Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in Arabidopsis leaves. Plant Cell Physiol. 53:433-44], su actividad es idéntica. De hecho, las bacterias puede expresar AGP activa de origen vegetal y viceversa [Iglesias A.A., Barry G.F., Meyer C., Bloksberg L., Nakata P.A., Greene T, Laughlin M.J., Okita T.W., Kishore G.M., Preiss, J. (1993) Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 268, 1081-1086; Crevillén P., Ballicora M.A., Mérida A., Preiss J., Romero J.M. (2003) The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. J. Biol. Chem. 278, 28508-28515; Li J., Almagro G., Muñoz F.J., Baroja-Fernández E., Bahaji A., Montero M., Hidalgo M., Sánchez-López A.M., Ezquer I., Sesma M.T., Pozueta-Romero J. (2012) Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in Arabidopsis leaves. Plant Cell Physiol. 53: 433-44]

La acumulación de glucógeno además se ve afectada positivamente por la expresión del gen *glgS*, el cual codifica para una proteína de 7.9 kDa, hidrofílica, altamente cargada, de función desconocida y que carece de homología de secuencia con otras proteínas fuera de las enterobacterias [Hengge-Aronis, R., Fischer, D. (1992) Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 6: 1877-1886; Beglova, N., Fisher, D., Hengge-Aronis, R., Gehring, K. (1997) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR assignments, secondary structure and overall topology of the *Escherichia coli* GlgS protein. Eur J Biochem. 246: 301-310; Kozlov, G., Elias, D., Cygler, M., Gehring, K. (2004) Structure of GlgS from *Escherichia coli* suggests a role in protein-protein interactions. BMC Biology 2: 10-17]. En *Escherichia coli* la expresión de *glgS* está negativamente regulada por el regulador post-transcripcional global CsrA [Yang, H., Liu, M.Y., Romeo, T. (1996) Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the *csrA* gene product. J Bacteriol 178: 1012-1017]. Además, la expresión de *glgS* presenta una fuerte inducción en la fase estacionaria [Hengge-Aronis, R., Fischer, D. (1992) Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 6: 1877-1886; Selinger, D.W., Cheung, K.J., Mei, R., Johansson, E.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R., Lockhart, D.J., Church, G.M. (2000) RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. Nat. Biotechnol. 18, 1262-1268], y está regulada positivamente por el regulador general del estrés RpoS [Hengge-Aronis, R., Fischer, D. (1992) Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 6: 1877-1886], por el regulador de la respuesta estricta ppGpp [Durfee, T., Hansen, A-M., Zhi, H., Blattner, F.R., Lin, D.J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 190, 1084-1096; Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T. (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 68, 1128-1148] y por la chaperona de RNA Hfq [Muffler, A., Traulsen, D.D., Fischer, D., Lange, R., Hengge-Aronis, R. (1997) The RNA-binding protein HF-1 plays a global regulatory role which is largely, but not extensively, due to its role in expression of the sigmaS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179, 297-300], cuya traducción está a su vez inhibida por CsrA [Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., Babitzke, P. (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 44, 1599-1610].

Hasta el momento se desconoce la función exacta de GlgS. Un trabajo anterior sugirió que GlgS podría constituir el sitio de unión de la primera molécula de glucosa durante el proceso de iniciación del gránulo de glucógeno en *E. coli* [Beglova, N., Fisher, D., Hengge-Aronis, R., Gehring, K. (1997) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR assignments, secondary structure and overall topology of the *Escherichia coli* GlgS protein. Eur J Biochem. 246: 301-310]. Sin embargo, esta hipótesis quedó en entredicho tras la demostración de que GlgA de *Agrobacterium tumefaciens* no requiere de proteínas adicionales para la iniciación del gránulo de glucógeno [Ugalde, J.E., Parodi, A.J., Ugalde, R.A. (2003) *De novo* synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100: 10659-10663]. Recientemente, inventores de la presente invención mostraron que mutantes nulos de *glgS* ( $\Delta$ *glgS*) acumulaban altos niveles de AMP [Montero, M., Eydallin, G., Almagro, G., Muñoz, F. J., Viale, A. M., Rahimpour, M., Sesma, M.T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2009) *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental Mg<sup>2+</sup> concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. Biochem. J. 424, 129-141], el regulador alostérico natural y negativo de GlgC [Ballicora, M. A., Iglesias, A. A., Preiss, J. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 213-225]. Para comprender la función de la proteína GlgS, en esta invención se han llevado a cabo análisis transcriptómicos en células  $\Delta$ *glgS* de *E. coli* y estudios de actividad biológica y bioquímicos que han revelado que las funciones de las proteínas GlgS y GlgC ejercen un efecto negativo en la producción de fimbrias de tipo 1, flagelos, exopolisacáridos y biofilms bacterianos que actúan como determinantes mayoritarios tanto de la patogenicidad y virulencia de las bacterianas como de la adhesión de las bacterias a superficies inertes y a células.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 En la presente invención se describe un compuesto útil para reducir o anular procesos determinantes de la patogenicidad y virulencia bacterianas y de la adherencia bacteriana a superficies tales como la producción de fimbrias de tipo 1, la motilidad flagelar y la formación de EPSs y biofilms bacterianos, en adelante compuesto inhibidor de la invención, que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la estimulación de GlgC y/o GlgS o cualquier otra función que conlleve un gasto de ATP y G1P para la producción de ADPG necesario para la síntesis de glucógeno. También se describe un compuesto útil para aumentar procesos determinantes de la adherencia bacteriana a superficies inertes y/o a células de raíces de plantas tales como la motilidad y la formación de EPSs y biofilms bacterianos, en adelante compuesto activador de la invención, que regula negativamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la inhibición de GlgC o cualquier otra función que conlleve un gasto de ATP y G1P para la producción de ADPG necesario para la síntesis de glucógeno.

15 Un objeto particular de la presente invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde dicho compuesto es una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular.

20 Una realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la proteína es una proteína con actividad AGP que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 (AGP de origen bacteriano o GlgC) y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 6 (AGP de origen vegetal).

25 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la proteína es una proteína GlgS, y preferentemente, una proteína GlgS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4.

30 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia *agp* que codifica para una proteína o péptido con actividad AGP, y preferentemente, una secuencia que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo, al siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 1 (origen bacteriano) y la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 (origen vegetal).

35 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia *glgS* que codifica para una proteína o péptido GlgS, y preferentemente, una secuencia que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 3.

40 Otro objeto de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención para uso en la prevención y tratamiento de una contaminación bacteriana.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la contaminación bacteriana se refiere a una infección bacteriana en preferiblemente mamíferos, preferentemente humanos, o a la presencia de bacterias en distintos materiales, superficies o equipos asépticos.

45 Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como antiséptico, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos un compuesto inhibidor de la invención, en cantidad farmacéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente, un ser humano, afectado por una infección bacteriana consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la reducción o eliminación de dicha infección.

55 Otro objeto de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención para uso en el fomento de la interacción entre rizobacterias beneficiosas y células de raíces de las plantas.

60 Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento para la identificación de un compuesto inhibidor de la motilidad, formación de EPSs y biofilms determinantes de la patogenicidad y virulencia bacteriana, así como de la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies inertes o células, preferentemente mediante la puesta a punto de un ensayo de alta capacidad ("high throughput screening"), en adelante procedimiento de la invención, que comprende los siguientes pasos:

- a) crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo suplementado con el compuesto candidato,

- b) análisis cualitativo-visual de los niveles de glucógeno bacteriano producidos en las bacterias de a), preferentemente, mediante tinción del glucógeno con vapores de yodo, y
- c) selección de un compuesto inhibidor cuando dicho compuesto incrementa la cantidad de glucógeno bacteriano detectado según el método de b) con respecto a sus niveles basales.

5

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en que los inventores han observado que, en enterobacterias, GlgS ejerce un efecto negativo en la producción de fimbrias de tipo 1, flagelos, exopolisacáridos (EPSs) y biofilms bacterianos que actúan como determinantes mayoritarios tanto de la patogenicidad y virulencia de las bacterianas como de la adherencia de las bacterias a superficies. Además, los inventores han observado que GlgC ejerce en bacterias que acumulan glucógeno un efecto negativo en la motilidad flagelar, en la producción de EPSs y en la producción de biofilms bacterianos.

En esta invención se muestra que la expresión de *glgS* ejerce un efecto negativo en la expresión a nivel transcripcional de genes implicados en la producción de flagelos, fimbrias de tipo 1, purinas y pirimidinas de enterobacterias (Ejemplo 1.1). También se muestra que las células  $\Delta$ *glgS* son hiperflageladas e hiperfimbriadas (Ejemplo 1.2), hipermóviles (Ejemplo 1.3) y acumulan grandes cantidades de biofilm (Ejemplo 1.4) y EPSs (Ejemplo 1.6). Estos fenotipos revirtieron mediante la expresión ectópica de *glgS* (Ejemplo 1.3, Ejemplo 1.4 y Ejemplo 1.6). Además, en esta invención se muestra que la expresión ectópica de *glgS* y de *glgC* en diferentes cepas de *E. coli* y de *Salmonella* conlleva a una reducción de la motilidad y del contenido de biofilm (Ejemplo 1.3 y Ejemplo 1.4).

Análisis a gran escala de la interacción de *glgS* con todos los genes no esenciales de *E. coli* mostraron que las alteraciones en la síntesis *de novo* de AMP revierten los fenotipos de "bajo glucógeno", "elevada motilidad" y "elevado contenido de biofilm" de las células  $\Delta$ *glgS* (Ejemplo 1.5). Estos resultados indicaron que el déficit de glucógeno en las células  $\Delta$ *glgS* se debe a la inhibición de GlgC por un exceso de AMP, de modo que el ATP y G1P no utilizado por GlgC es re-dirigido hacia la propulsión flagelar y hacia la síntesis de EPSs, respectivamente. Confirmando esta hipótesis, en esta invención se muestra que células  $\Delta$ *glgC* carentes de glucógeno presentan fenotipos de "elevada motilidad" (Ejemplo 1.5), "elevado contenido de biofilm" (Ejemplo 1.6) y "elevado contenido de EPSs" (Ejemplo 1.6), mientras que las células  $\Delta$ *glgS* $\Delta$ *flhC*, de motilidad baja, acumulan más glucógeno que las células  $\Delta$ *glgS* (Ejemplo 1.5). Por otra parte, en esta invención se muestra que la expresión ectópica de *glgC* (Ejemplo 1.7) revierte los fenotipos "bajo glucógeno", "elevada motilidad", "elevado contenido de biofilm" y "elevado contenido de EPSs" de las células  $\Delta$ *glgS* (Ejemplo 1.5 y Ejemplo 1.6). Es más, se muestra que un incremento de la expresión de *glgC* en diferentes cepas de *E. coli* y *Salmonella* conlleva a una reducción de la motilidad y del contenido de biofilm (Ejemplo 1.5 y Ejemplo 1.6). Tras demostrar que *glgS* ejerce un efecto negativo en procesos de propulsión flagelar y de síntesis de EPSs de biofilms que compiten con GlgC por el mismo pool de ATP y de G1P, en esta invención se demuestra que cualquier estrategia de estimulación directa o indirecta de GlgS (para el caso de enterobacterias) y/o GlgC (para cualquier tipo de bacteria que acumule glucógeno) reduce la formación de biofilms y la motilidad bacteriana que determinan tanto la patogenicidad y virulencia bacteriana como la capacidad de adherirse las bacterias a superficies. Por el contrario, cualquier estrategia de inhibición directa o indirecta de GlgS (para el caso de enterobacterias) y/o GlgC (para el caso de cualquier tipo de bacteria que acumule glucógeno) incrementa la formación de flagelos (con el consiguiente incremento de la motilidad flagelar), fimbrias de tipo 1, EPSs y biofilms determinantes tanto de la adherencia de las bacterias a superficies como de la virulencia y patogenicidad bacteriana.

Se identifica así que la alteración directa o indirecta de la expresión de los genes bacterianos *glgS* y *glgC* o de las proteínas expresadas por los mismos, GlgS y GlgC, ya sea de forma simultánea o independiente, como vías terapéuticas para alterar la virulencia y patogenicidad bacteriana, o bien para alterar la capacidad de adherencia de bacterias a superficies inertes tales como catéteres, tuberías, etc., evitando así la contaminación bacteriana de los mismos, concretamente utilizando estos elementos biotecnológicos para reproducir e incrementar el nivel de expresión y actividad de sus funciones biológicas para reducir la producción de fimbrias de tipo 1, la motilidad y la formación de polisacáridos de biofilms bacterianos, por ejemplo, mediante composiciones farmacéuticas que contengan estos vectores génicos que permitan la expresión de dichos genes en bacterias patógenas o el uso de dichas proteínas como fármacos o antisépticos antibacterianos. Por otro lado, los elementos biotecnológicos – vectores, proteínas expresadas - y las células desarrolladas en la presente invención permiten el desarrollo de ensayos para la identificación de compuestos que incrementen la expresión/actividad de estas dos dianas in vivo, GlgS y/o GlgC, por ejemplo, mediante el uso de tecnología "high-throughput".

Así, un primer objeto de la presente invención lo constituye un compuesto útil para reducir o anular procesos determinantes de la patogenicidad y virulencia bacterianas y de la adherencia bacteriana a superficies inertes o células tales como la producción de fimbrias de tipo 1, la motilidad flagelar y la formación de EPSs y biofilms bacterianos, en adelante compuesto inhibidor de la invención, que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la estimulación de GlgC y/o GlgS o cualquier otra función que conlleve un gasto de ATP y G1P para la producción de ADPG necesario para la síntesis de glucógeno.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde dicho

compuesto es una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular.

5 Una realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la proteína es una proteína con actividad AGP que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 (AGP de origen bacteriano o GlgC) y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 6 (AGP de origen vegetal).

10 Tal como se usa en la presente invención el término "proteína con actividad AGP" se refiere a una proteína o péptido, ya sea de origen eucariota o procariota, y que presente al menos un 40% de homología con la SEQ ID NO 2 o con SEQ ID NO 6.

15 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la proteína es una proteína GlgS, y preferentemente, una proteína GlgS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4.

Tal como se usa en la presente invención el término "proteína GlgS" se refiere a una proteína o péptido que presente al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO 4.

20 Otro objeto particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde dicho compuesto es una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular.

25 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia *agp* que codifica para una proteína o péptido con actividad AGP, y preferentemente, una secuencia que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo, al siguiente grupo: la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 1 (origen bacteriano) y la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 5 (origen vegetal).

30 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia *glgS* que codifica para una proteína o péptido GlgS, y preferentemente, una secuencia que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 3.

35 Otro objeto particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde el compuesto es un regulador alostérico capaz de activar a una proteína o péptido con actividad AGP, o cualquier otro tipo de sustancia capaz de activar la expresión de secuencias nucleotídicas codificantes para AGP o GlgS.

40 Otro objeto particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde el compuesto pertenece, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: sedoheptulosa 1,7-difosfato, D-arabinitol 1,5-difosfato, glucosa 1,6-difosfato, gliceraldehido 3-P, 2-fosfoglicerato, eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato, fosfoketodeoxigluconato, ión magnesio ( $Mg^{2+}$ ), NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2) o 3-fosfoglicerato (3PGA).

45 Otro objeto de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención para uso en la prevención y tratamiento de una contaminación bacteriana.

50 Otro objeto particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la contaminación bacteriana se refiere a una infección bacteriana en mamíferos, preferentemente humanos, o a la presencia de bacterias en distintos materiales, superficies o equipos asépticos.

55 Otro objeto de la invención lo constituye el uso del compuesto inhibidor de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o para la limpieza antiséptica (por ejemplo, superficies tales como catéteres, tuberías, material biomédico, sistemas de aire acondicionado, etc.), producida por una bacteria perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- a) Gram negativas, preferentemente, *Escherichia*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bartonella*, *Neisseria* y *Bordetella*, y más preferentemente, *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *C. jejuni*, *S. dysenteteriae*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *B. bacilliformis*, *N. gonorrhoeae*, *B. pertusis*; y
- 60 b) Gram positivas, preferentemente, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, y más preferentemente, *L. monocytogenes*, *C. difficile* y *S. pyogenes*.

65 Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como antiséptico, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende al menos un compuesto inhibidor de la invención, en cantidad farmacéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas o antisépticas.

5

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de eliminar los microorganismos patógenos, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, para el caso de una composición terapéutica, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta, forma y frecuencia de administración; y para el caso de una composición antiséptica, las condiciones del entorno, la forma de aplicación, entre otras.

10

En otra realización particular, dicha composición farmacéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Fauli i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

15

20

Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular.

25

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una proteína con actividad AGP que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 (origen bacteriano) y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 6 (origen vegetal).

30

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una proteína GlgS, y preferentemente, una proteína GlgS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4.

35

Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular.

40

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una secuencia de nucleótidos *agp* que codifica para una proteína o péptido con actividad AGP, y preferentemente, una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia perteneciente, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo: secuencia SEQ ID NO 1 (secuencia nucleotídica que codifica para una AGP de origen bacteriano, GlgC) y secuencia SEQ ID NO 5 (secuencia nucleotídica que codifica para un AGP de origen vegetal).

45

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es una secuencia nucleotídica *glgS* que codifica para una proteína o péptido GlgS, y preferentemente, una secuencia que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 3.

50

Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor es un regulador alostérico capaz de activar a una proteína o péptido con actividad AGP, o cualquier otro tipo de sustancia que active la expresión de secuencias nucleotídicas que codifiquen para GlgC o GlgS.

55

Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención donde el compuesto inhibidor pertenece, a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, al siguiente grupo de sustancias: sedoheptulosa 1,7-difosfato, D-arabinitol 1,5-difosfato, glucosa 1,6-difosfato, gliceraldehido 3-P, 2-fosfoglicerato, eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato, fosfoketodeoxigluconato, magnesio ( $Mg^{2+}$ ), NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2) o 3-fosfoglicerato (3PGA).

60

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente, un ser humano, afectado por una infección bacteriana consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita la reducción o eliminación de dicha infección.

65

La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención para la limpieza antiséptica de entornos o materiales contaminados por bacterias.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento para la identificación de un compuesto inhibidor de la motilidad, formación de EPSs y biofilms determinantes de la patogenicidad y virulencia bacteriana, así como de la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies inertes o células, preferentemente mediante la puesta a punto de un ensayo de alta capacidad ("high throughput screening"), en adelante procedimiento de la invención, que comprende los siguientes pasos:

- a) crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo suplementado con el compuesto candidato,
- b) análisis cualitativo-visual de los niveles de glucógeno bacteriano producidos en las bacterias de a), preferentemente, mediante tinción del glucógeno con vapores de yodo, y
- c) selección de un compuesto inhibidor cuando dicho compuesto incrementa la cantidad de glucógeno bacteriano detectado según el método de b) con respecto a sus niveles basales.

Otro objeto de la presente invención es un compuesto útil para incrementar procesos determinantes de la unión de rizobacterias beneficiosas a las raíces de las plantas tales como la producción de adhesinas, la motilidad, la formación de EPSs y/o biofilms bacterianos, en adelante agente estimulador de la invención, caracterizado porque regula negativamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la inhibición de GlgC o de cualquier otra función que conlleve un gasto de ATP y G1P para la producción de ADPG necesario para la síntesis de glucógeno.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el agente estimulador de la invención donde dicho agente es un regulador alostérico capaz de inhibir a GlgC u otra AGP de origen microbiano cuya secuencia es diferente a GlgC.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el agente estimulador de la invención caracterizado porque es un regulador alostérico de GlgC perteneciente al siguiente grupo: AMP, ADP, ortofosfato y pirofosfato.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.- Clasificación funcional de los genes cuyos niveles de expresión son diferentes en células  $\Delta glgS$  y en células silvestres (WT).** Las barras negras corresponden a los genes cuya expresión es mayor en células  $\Delta glgS$  que en células WT, mientras que las barras blancas corresponden a los genes cuya expresión es inferior en células  $\Delta glgS$  que en células WT. Los genes se clasificaron en categorías COG [Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D. (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 33 (Database issue), D334-D337, doi:10.1093/nar/gki108].

**Figura 2.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa en células silvestres (WT, barras blancas) y en células  $\Delta glgS$  (barras grises) que expresan la fusión transcripcional *lacZY* indicada.** Las células fueron cultivadas en medio Kornberg líquido suplementado con glucosa y recolectadas a la entrada de la fase estacionaria para la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados son la media  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes.

**Figura 3.- Imágenes de microscopía electrónica de células silvestres (WT) pertenecientes a la cepa BW25113 y  $\Delta glgS$  teñidas negativamente con ácido fosfotungstíco al 2%.** Las barras en los paneles superiores e inferiores son de 2 y 0.5  $\mu$ m, respectivamente. Las flechas indican la posición de las fimbrias de tipo I. Nótese que GlgS afecta negativamente a la producción de flagelos (paneles superiores) y fimbrias de tipo I (paneles inferiores). Las células fueron cultivadas en medio Kornberg líquido suplementado con glucosa y recolectadas a la entrada de la fase estacionaria.

**Figura 4.- GlgS ejerce un efecto negativo en la motilidad tipo "swarming". (A)** Fenotipo de motilidad tipo "swarming" de células silvestres (WT) de la cepa BW25113,  $\Delta glgS$ ,  $\Delta glgS\Delta flhC$ ,  $\Delta glgS\Delta flhA$  y  $\Delta glgS$  que sobreexpresan (SE) *glgS*. Nótese que las células  $\Delta glgS$  presentan un fenotipo "high swarming" que se revierte con la expresión ectópica de *glgS*. Como era esperado, las células  $\Delta glgS\Delta flhC$  y  $\Delta glgS\Delta flhA$  no presentan motilidad tipo "swarming", confirmando así que los flagelos constituyen un factor determinante del fenotipo "high swarming" de las células  $\Delta glgS$ . **(B)** Fenotipo de motilidad tipo "swarming" de células de *E. coli* W y células W que sobreexpresan *glgS*. **(C)** Fenotipo de motilidad tipo "swarming" de células de la cepa 3934 de *Salmonella* y de células 3934 que sobreexpresan *glgS*. **(D)** Fenotipo de motilidad tipo "swarming" de células LT2 de *Salmonella* y células LT2 que sobreexpresan *glgS*. **(E)** Fenotipo de quimiotaxis de células W y células W que sobreexpresan *glgS*. Nótese en "B" y en "E" que la expresión ectópica de *glgS* ejerce un efecto negativo en la motilidad tipo "swarming" y en la quimiotaxis de células W, respectivamente.

**Figura 5.- GlgS ejerce un efecto negativo en la acumulación de biofilm (A)** Contenido total de biofilm (normalizado con respecto al crecimiento bacteriano) de células de *E. coli* silvestres (WT) de la cepa BW25113,



*ΔglgS*, *ΔglgSΔflhC*, *ΔglgSΔfimA*, *ΔglgSΔwzc* y *ΔglgS* que sobre-expresan (SE) *glgS*. **(B)** Contenido de biofilm en células de las cepas LT2, 1334, 3934 y 14028 de *Salmonella* y de las células de las cepas LT2, 1334, 3934 y 14028 que sobre-expresan *glgS*. Las células fueron cultivadas en placas de poliestireno de 96 pocillos a 28°C durante 48 h en medio Kornberg suplementado con 50 mM de glucosa. Los resultados son la media ± ES de 5 experimentos independientes.

**Figura 6.- Ruta metabólica de la biosíntesis de novo de purinas.** En negrita están indicadas las enzimas cuya reducción, desaparición o inhibición promueve la acumulación de glucógeno en células *ΔglgS*.

**Figura 7.- Contenido de glucógeno y motilidad tipo “swarming” en bacterias *ΔglgS*, *ΔglgSΔpurM* y *ΔglgSΔpurL*.** **(A)** Contenido de glucógeno y **(B)** motilidad tipo “swarming” de células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgSΔpurM* y *ΔglgSΔpurL*. Nótese que el impedimento de la síntesis de novo de AMP conlleva a un aumento del contenido de glucógeno y revierte el fenotipo hipermótil de las células *ΔglgS*. Los resultados en “A” son la media ± ES de 3 experimentos independientes. En “A”, las células fueron cultivadas en medio Kornberg líquido suplementado con glucosa y recolectadas a la entrada de la fase estacionaria.

**Figura 8.- Contenido de glucógeno y motilidad tipo “swarming” en células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgSΔflhC*, *ΔglgSΔfliA*, *ΔglgA*, *ΔglgC*, células WT que sobre-expresan *glgC* y células *ΔglgS* que sobre-expresan *glgC*, y motilidad tipo “swarming” en células de *Salmonella* que sobre-expresan *glgC*.** **(A)** Contenido de glucógeno en células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgSΔflhC*, *ΔglgSΔfliA*, *ΔglgA*, *ΔglgC*, células WT que sobre-expresan *glgC*, y células *ΔglgS* que sobre-expresan (SE) *glgC*. **(B)** Motilidad tipo “swarming” de células WT de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgA*, *ΔglgC*, y células *ΔglgS* que sobre-expresan *glgC*. **(C)** Motilidad tipo “swarming” de células de la cepa 3934 de *Salmonella* y de células 3934 que sobre-expresan *glgC*. **(D)** Motilidad tipo “swarming” de células de la cepa 14028 de *Salmonella* y de células 14028 que sobre-expresan *glgC*. Los resultados en “A” son la media ± ES de 3 experimentos independientes. En “A”, las células fueron cultivadas en medio Kornberg líquido suplementado con glucosa y recolectadas a la entrada de la fase estacionaria.

**Figura 9.- Contenido de biofilm en células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgA*, *ΔglgC*, células WT que sobre-expresan *glgC*, células *ΔglgS* que sobre-expresan *glgC*, *ΔglgSΔpurL*, *ΔglgCΔgalU* y *ΔglgSΔgalU* y en diferentes cepas de *Salmonella* con y sin sobre-expresión de *glgC*.** **(A)** Contenido de biofilm en células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgA*, *ΔglgC*, células WT que sobre-expresan (SE) *glgC*, células *ΔglgS* que sobre-expresan *glgC*, *ΔglgSΔpurL*, *ΔglgCΔgalU* y *ΔglgSΔgalU*. **(B)** Contenido de biofilm en células de las cepas LT2, 1334, 3934 y 14028 de *Salmonella* y de las células de las cepas LT2, 1334, 3934 y 14028 que sobre-expresan *glgC*. Nótese que la (a) la sobre-expresión de *glgC* conlleva a una reducción del contenido de biofilm y (b) la eliminación de GalU revierte el fenotipo “alto contenido de biofilm” de las células *ΔglgC* y *ΔglgS* demostrando así que el alto contenido de biofilm de las células deficientes en glucógeno *ΔglgS* y las células carentes de glucógeno *ΔglgC* es debido, al menos en parte, a la conversión por GalU de la G1P no utilizada por GlgC en EPSs. Las células fueron cultivadas en placas de poliestireno de 96 pocillos a 28°C durante 48 h en medio Kornberg suplementado con 50 mM de glucosa. Los resultados son la media ± ES de 5 experimentos independientes.

**Figura 10.- Ruta metabólica de síntesis de ácido colánico a partir de G1P.**

**Figura 11.- Contenido de ácido colánico en células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, *ΔglgS*, *ΔglgC*, *ΔgalU*, *Δwzc*, *ΔglgSΔgalU*, *ΔglgCΔgalU*, *ΔglgSΔwzc*, *ΔglgCΔwzc*, células *ΔglgS* que sobre-expresan *glgC*, células *ΔglgC* que expresan ectópicamente *glgC*.**

**Figura 12.- Ruta metabólica de la biosíntesis de novo de pirimidinas.** En negrita están indicadas las enzimas cuya reducción, desaparición o inhibición promueve la acumulación de glucógeno en células *ΔglgS*.

**Figura 13.- Propuesta de un modelo integrativo de la síntesis de fimbrias de tipo I, flagelos, polisacáridos de biofilm y glucógeno controlado por GlgS (ScoR, de Surface Composition Regulator) en enterobacterias.** Según este modelo, la expresión de *glgS* (*scoR*) estaría altamente determinada por RpoS, cuyos niveles a su vez estarían determinados por los niveles intracelulares de (p)ppGpp producidos por RelA y por SpoT que aumentan cuando las bacterias se enfrentan a un estrés nutricional o a otro tipo de estrés ambiental. En *E. coli* y en *Salmonella* el (p)ppGpp ejerce un efecto positivo sobre la acumulación de glucógeno debido a que (a) transcripcionalmente regula positivamente la expresión del operón *glgBXCAP* y de *csrC* (un pequeño RNA no codificante), el cual a su vez inactiva al represor post-transcripcional de la biosíntesis de glucógeno CsrA, y (b) inhibe fuertemente a PurA, el cual cataliza el primer paso comprometido de la biosíntesis de novo del inhibidor principal de GlgC, el AMP. Por el contrario, (p)ppGpp ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de flagelos y EPSs ya que reprime la expresión de los genes flagelares y de los genes de la síntesis de novo de UMP (*carAB*, *pyrBI*, *pyrC*, *pyrD* and *pyrF*) que actúan como determinantes de la producción de EPSs. Según este modelo, cuando existe un exceso de nutrientes (fase exponencial del crecimiento), la expresión *glgBXCAP* y *scoR* será baja como consecuencia de los bajos niveles de (p)ppGpp y RpoS, y de los altos niveles de CsrA activa, una situación que (a) no favorecerá la acumulación de glucógeno, y (b) permitirá la expresión de los operones negativamente regulados por ScoR tales como los implicados en la producción de fimbrias de tipo I y flagelos, y de los operones involucrados en la biosíntesis de

EPSs. Por el contrario, en condiciones estrictas debidas a la ausencia de algún nutriente (estado estacionario) el aumento de los niveles de (p)ppGpp y de RpoS así como la inactivación de CsrA por *csrC* incrementarán la expresión de *glgBXCAP* (lo cual acarreará un incremento del contenido de glucógeno) y de *scoR* (lo cual conllevará a una reducción de la expresión de los operones implicados en la producción de flagelos y en la síntesis de UTP necesario para la síntesis de EPS). Según este modelo, la falta de ScoR promoverá la producción constitutiva de flagelos y EPSs que competirán con GlgC por el mismo pool de ATP y de G1P, respectivamente, dando lugar a bacterias con bajo contenido de glucógeno y con alta motilidad. Por el contrario, un incremento de la expresión de GlgS supondrá una inhibición de la producción de flagelos y una reducción de la utilización de ATP para la motilidad flagelar. El ATP "excedente" o "sobrante" será utilizado por GlgC para la producción de glucógeno a partir de G1P, que será utilizado en menor medida para la producción de EPS. Según este modelo, un incremento de la actividad GlgC supondrá un mayor consumo de ATP y G1P, impidiendo la motilidad flagelar dependiente de ATP y la producción de EPSs dependiente de G1P.

### EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

#### Ejemplo 1.- Reducción de la producción de flagelos, fimbrias y biofilm mediante el estímulo de la actividad de GlgS y GlgC.

##### 1.1.-Perfil transcriptómico de las células $\Delta glgS$

Para investigar los mecanismos celulares relacionados con la reducción del contenido de glucógeno en células  $\Delta glgS$  se examinaron los perfiles de expresión de células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113 y  $\Delta glgS$  entrando en la fase estacionaria, utilizando "microarrays" (microarreglos) del genoma de *E. coli*. Los genes con expresión diferencial se clasificaron de acuerdo a los sitios web *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) y *RegulonDB* (<http://regulondb.ccg.unam.mx>). Brevemente, el análisis transcriptómico reveló que 122 genes mostraban cambios estadísticamente significativos en los niveles de transcrito en células  $\Delta glgS$  respecto a células WT. Entre esta población 87 genes tenían mayores niveles de expresión en  $\Delta glgS$  que en WT (Tabla 1) y 35 genes tenían menores niveles de expresión en  $\Delta glgS$  que en WT (Tabla 2).

**Tabla 1:** Genes cuya expresión es más elevada en células  $\Delta glgS$  que en WT. Las variaciones en los niveles de expresión se presentan en escala log 2 ( $\Delta glgS$  vs WT).

Gen	Cambio	Función en <i>E. coli</i> ( <a href="http://www.genome.jp/">http://www.genome.jp/</a> ) [KEGG entry]
<b>OPERONES POLYCISTRONICOS</b>		
<b>operon <i>carAB</i></b>		
<i>carA</i>	1.63	Carbamoyl-phosphate synthetase, glutamine [b0032]
<i>carB</i>	1.77	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit [b0033]
<b>operon <i>codBA</i></b>		
<i>codB</i>	1.54	Cytosine permease/transport [b0336]
<i>codA</i>	2.14	Cytosine deaminase [b0337]
<b>operon <i>cusCFBA</i></b>		
<i>cusC</i>	33.35	Probable outer membrane lipoprotein <i>cusC</i> precursor [c_0658]
<i>cusF</i>	22.12	Orf, hypothetical protein [b0573]
<i>cusB</i>	42.06	Putative resistance protein [b0574]
<i>cusA</i>	10.46	Putative cation efflux system protein <i>cusA</i> [c_0661]
<b>operon <i>cusRS</i></b>		
<i>cusR</i>	6.64	Putative 2-component transcriptional regulator [b0571]
<i>cusS</i>	5.18	Putative 2-component sensor protein [b0570]
<b>operon <i>cvpA-purF</i></b>		
<i>cvpA</i>	1.59	Membrane protein required for colicin V production [b2313]
<i>purF</i>	1.55	Amidophosphoribosyltransferase, purine synthesis [b2312]
<b>operon <i>fimAICDFGH</i></b>		
<i>fimA</i>	2.83	Major type 1 subunit fimbriae [b4314]
<i>fimI</i>	1.96	Fimbrial protein [b4315]
<i>fimC</i>	3.13	Periplasmic chaperone, required for type 1 fimbriae [b4316]
<i>fimD</i>	2.05	Outer membrane protein; export and assembly of type 1 fimbriae [b4317]
<i>fimF</i>	2.05	Fimbrial morphology [b4318]
<i>fimG</i>	2.60	Fimbrial morphology [b4319]
<i>fimH</i>	1.61	Minor fimbrial subunit, D-mannose specific adhesin

		[b4320]
<b>operon <i>flgAMN</i></b>		
<i>flgA</i>	3.76	Flagellar biosynthesis; assembly of basal-body periplasmic P ring [b1072]
<i>flgM</i>	2.62	Anti-FliA [b1071]
<i>flgN</i>	2.03	Protein of flagellar biosynthesis [b1070]
<b>operon <i>flgBCDEFGHIJ</i></b>		
<i>flgB</i>	10.83	Flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod [b1073]
<i>flgC</i>	10.91	Flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod [b1074]
<i>flgD</i>	8.92	Flagellar biosynthesis, initiation of hook assembly [b1075]
<i>flgE</i>	8.67	Flagellar biosynthesis, hook protein [b1076]
<i>flgF</i>	8.42	Flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod [b1077]
<i>flgG</i>	3.79	Flagellar biosynthesis, cell-distal portion of basal-body rod [b1078]
<i>flgH</i>	2.37	Flagellar biosynthesis, basal-body outer-membrane L [b1079]
<i>flgI</i>	2.55	Homolog of Salmonella P-ring of flagella basal body [b1080]
<i>flgJ</i>	2.56	Flagellar biosynthesis [b1081]
<b>operon <i>flgKL</i></b>		
<i>flgK</i>	3.07	Flagellar biosynthesis, hook-filament junction protein 1 [b1082]
<i>flgL</i>	2.29	Flagellar biosynthesis; hook-filament junction protein [b1083]
<b>operon <i>flhBAE</i></b>		
<i>flhB</i>	1.77	Putative part of export apparatus for flagellar proteins [b1880]
<i>flhA</i>	1.51	Flagellar export pore protein [b1879]
<i>flhE</i>	1.68	Flagellar protein [b1878]
<b>operon <i>flhDC</i></b>		
<i>flhD</i>	1.64	Regulator of flagellar biosynthesis; transcriptional initiation factor [b1892]
<i>flhC</i>	1.68	Regulator of flagellar biosynthesis; transcription initiation factor [b1891]
<b>operon <i>fliAZY</i></b>		
<i>fliA</i>	6.07	Flagellar biosynthesis; alternative sigma factor 28 [b1922]
<i>fliZ</i>	2.67	Orf, hypothetical protein [b1921]
<b>operon <i>fliDST</i></b>		
<i>fliD</i>	3.73	Flagellar biosynthesis; filament capping protein; enables filament assembly [b1924]
<i>fliS</i>	1.95	Flagellar protein fliS [c_2340]
<i>fliT</i>	1.50	Flagellar synthesis, predicted chaperone [b1926]
<b>operon <i>fliFGHIJK</i></b>		
<i>fliF</i>	3.23	Flagellar biosynthesis; basal-body MS [b1938]
<i>fliG</i>	3.46	Flagellar biosynthesis, component of motor switching and energizing [b1939]
<i>fliH</i>	3.07	Flagellar biosynthesis; export of flagellar proteins? [b1940]
<i>fliJ</i>	3.12	Flagellar fliJ protein [b1942]
<i>fliK</i>	1.91	Flagellar hook-length control protein [b1943]
<b>operon <i>fliLMNOPQR</i></b>		
<i>fliL</i>	7.95	Flagellar biosynthesis [b1944]
<i>fliM</i>	7.35	Flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing [b1945]
<i>fliN</i>	4.59	Flagellar biosynthesis, component of motor switch and energizing [b1946]
<i>fliO</i>	2.38	Flagellar biosynthesis [b1947]
<i>fliP</i>	1.90	Flagellar biosynthesis [b1948]
<i>fliQ</i>	2.36	Flagellar biosynthesis [b1949]
<i>fliR</i>	1.50	Flagellin export apparatus, integral membrane protein [b1950]

## ES 2 483 116 A2

<b><i>insJK</i></b>		
<i>insJ</i>	4.29	IS150 hypothetical protein [b3557]
<i>insK</i>	2.30	IS150 putative transposase [b3558]
<b>operon <i>motAB-cheAW</i></b>		
<i>motA</i>	1.67	Proton conductor component of motor; no effect on switching [b1890]
<i>motB</i>	2.40	Enables flagellar motor rotation, linking torque machinery to cell wall [b1889]
<i>cheA</i>	2.76	Sensory transducer kinase between chemo- signal receptors and CheB and CheY [b1888]
<i>cheW</i>	2.94	Positive regulator of CheA protein activity [b1887]
<b>operon <i>tar-tap-cheRBYZ</i></b>		
<i>tar</i>	4.21	Methyl-accepting chemotaxis protein II, aspartate sensor receptor [b1886]
<i>tap</i>	2.01	Methyl-accepting chemotaxis protein IV, peptide sensor receptor [b1885]
<i>cheY</i>	2.52	Chemotaxis regulator transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components [b1882]
<i>cheZ</i>	2.01	Chemotactic response CheY protein phosphatase; antagonist of [Z2935]
<b>operon <i>purHD</i></b>		
<i>purH</i>	1.55	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; purine synthesis [b4006]
<i>purD</i>	1.50	Phosphoribosylamine-glycine ligase, purine synthesis [b4005]
<b>operon <i>purMN</i></b>		
<i>purM</i>	1.56	Phosphoribosyl-aminoimidazole (AIR) synthase [b2499]
<i>purN</i>	1.55	Glycinamide ribonucleotide transformylase (GART) 1, purine synthesis [b2500]
<b>operon <i>pyrLBI</i></b>		
<i>pyrB</i>	2.30	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit [b4245]
<i>pyrI</i>	1.86	Aspartate carbamoyltransferase, regulatory subunit [b4244]
<b><i>PyrF-yciH</i></b>		
<i>pyr F</i>	1.52	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase; OMP decarboxylase [b1281]
<i>yciH</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b1282]
<b><i>YjdA-yjcZ</i></b>		
<i>yjdA</i>	2.49	Putative vimentin [b4109]
<i>yjcZ</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b4110]
<b>OPERONES</b>		
<b>MONOCISTRONICOS</b>		
<i>atoE</i>	1.76	Hypothetical protein [c_2368]
<i>betI</i>	1.51	Probably transcriptional repressor of bet genes [b0313]
<i>cusX</i>	10.49	Hypothetical protein cusX precursor [c_0659]
<i>fliC</i>	3.20	Flagellar biosynthesis; flagellin, filament structural protein [b1923]
<i>flu</i>	1.62	Outer membrane fluffing protein, similar to adhesin [b2000]
<i>flxA</i>	1.92	Orf, hypothetical protein [b1566]
<i>guaB</i>	1.76	IMP dehydrogenase [ECs3370]
<i>insJ</i>	4.29	IS150 hypothetical protein [b3557]
<i>insK</i>	2.30	IS150 putative transposase [b3558]
<i>narL</i>	1.66	Pleiotrophic regulation of anaerobic respiration: response regulator [Z1996]
<i>ompT</i>	1.88	Outer membrane protein 3b [b0565]
<i>pheT</i>	1.69	Phenylalanine specific transport system
<i>pyrC</i>	1.53	Dihydroorotate, the third step in pyrimidine biosynthesis [b1062]
<i>pyrD</i>	2.02	Dihydro-orotate dehydrogenase [b0945]
<i>pyr F</i>	1.52	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase; OMP decarboxylase [b1281]
<i>ridA</i>	1.73	Protein YjgF [c_5342]
<i>tsr</i>	1.85	Methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor

<i>upp</i>	1.58	receptor [b4355]
<i>ycgR</i>	4.29	Uracil phosphoribosyltransferase [b2498]
<i>yciH</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b1194]
<i>yecR</i>	1.66	Orf, hypothetical protein [b1282]
<i>yedW</i>	1.62	Orf, hypothetical protein [b1904]
<i>yhjH</i>	1.72	Putative 2-component transcriptional regulator [b1969]
<i>yjcZ</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b3525]
<i>yjdA</i>	2.49	Orf, hypothetical protein [b4110]
<i>yjgF</i>	1.73	Putative vimentin [b4109]
<i>ylcB</i>	4.56	Protein YjgF [c_5342]
		Putative resistance protein [Z0711]

**Tabla 2:** Genes cuya expresión es inferior en células  $\Delta$ *glgS* que en WT. Las variaciones en los niveles de expresión se presentan en escala log 2 ( $\Delta$ *glgS* vs WT).

Gen	Cambio	Función en <i>E. coli</i> ( <a href="http://www.genome.jp/">http://www.genome.jp/</a> ) [KEGG entry]
<b>OPERONES</b>		
<b>POLICISTRONICOS</b>		
<b>operon <i>cysPUWAA</i></b>		
<i>cysP</i>	-1.55	Thiosulfate-binding protein precursor [c_2959]
<i>cysW</i>	-1.59	Sulfate transport system permease W protein [b2423]
<b>operon <i>trpLEDCBA</i></b>		
<i>trpA</i>	-7.69	Tryptophan synthase, alpha protein [b1260]
<i>trpB</i>	-10.78	Tryptophan synthase, beta protein [b1261]
<i>trpC</i>	-7.18	Fused indole-3-glycerolphosphate synthetase/N-anthranilate isomerase [b1262]
<i>trpD</i>	-4.57	Anthranilate synthase component II [b1263]
<i>trpE</i>	-2.64	Anthranilate synthase component I [b1264]
<b><i>rpoE-rseABC</i></b>		
<i>rpoE</i>	-1.53	RNA polymerase, sigma-E factor; heat shock and oxidative stress [b2573]
<i>rseA</i>	-1.51	sigma-E factor, negative regulatory protein [b2572]
<i>rseB</i>	-1.51	regulates activity of sigma-E factor [b2571]
<b><i>yqjCDEK</i></b>		
<i>yqjD</i>	-1.67	Orf, hypothetical protein [b3099]
<i>yqjE</i>	-1.61	Orf, hypothetical protein [b3099]
<i>yqjK</i>	-1.51	Orf, hypothetical protein [b3100]
<b>OPERONES</b>		
<b>MONOCISTRONICOS</b>		
<i>b1005</i>	-1.53	Orf, hypothetical protein [b1005]
<i>borD</i>	-2.05	Bacteriophage lambda Bor protein homolog [b0557]
<i>cysK</i>	-2.18	Cysteine synthase A [c_2948]
<i>dicC</i>	-1.51	Protein ydhR precursor [c_2059]
<i>katG</i>	-1.58	Catalase; hydroperoxidase HPI [b3942]
<i>lpp</i>	-1.91	Murein lipoprotein [b1677]
<i>lrhA</i>	-1.55	NADH dehydrogenase transcriptional regulator, LysR family [b2289]
<i>lysU</i>	-1.88	Lysine tRNA synthetase, inducible; heat shock protein [b4129]
<i>mokB</i>	-1.68	Orf, hypothetical protein [b1420]
<i>osmE</i>	-1.69	Activator of ntrL gene [b1739]
<i>osmY</i>	-1.62	Hyperosmotically inducible periplasmic protein [b4376]
<i>rbsD</i>	-1.82	D-ribose high-affinity transport system; membrane-associated protein [b3748]
<i>rmf</i>	-1.80	Ribosome modulation factor [b0953]
<i>rpoE</i>	-1.53	RNA polymerase, sigma-E factor; heat shock and oxidative stress [b2573]
<i>sodB</i>	-1.58	Superoxide dismutase [c_2050]
<i>uspB</i>	-1.52	Orf, hypothetical protein [b3494]
<i>wrbA</i>	-1.61	Trp repressor binding protein; affects association of trp repressor and operator [b1004]
<i>ybaY</i>	-1.55	Glycoprotein/polysaccharide metabolism [b0453]
<i>ydhR</i>	-1.55	Orf, hypothetical protein [b1667]

<i>yebV</i>	-1.54	Orf, hypothetical protein [b1836]
<i>ygaM</i>	-1.65	Orf, hypothetical protein [b2672]
<i>ygdI</i>	-1.58	Orf, hypothetical protein [b2809]
<i>yiaG</i>	-1.60	Orf, hypothetical protein [b3555]
<i>yjbJ</i>	-1.67	Orf, hypothetical protein [b4045]
<i>yjiY</i>	-2.14	Putative carbon starvation protein [b4354]
<i>yqjE</i>	-1.61	Orf, hypothetical protein [b3099]
<i>yqjK</i>	-1.51	Orf, hypothetical protein [b3100]
<i>Z2547</i>	-3.84	Anthranilate synthase component I [Z2547]

Para examinar más a fondo la distribución de los genes en base a su función, los genes con niveles de transcrito alterados fueron clasificados en racimos de grupos ortólogos [Keseler, I.M., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Ingraham, J., Paley, S., Paulsen, I.T., Peralta-Gil, M., Karp, P.D. (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 33 (Database issue), D334-D337, doi:10.1093/nar/gki108] (Figura 1). Hay que destacar que el operón de las fimbrias tipo I *fimAICDFGH* mostraba mayores niveles de expresión en células  $\Delta$ *glgS* que en células WT (Tabla 1). Además, *flhDC* (el operón master Tipo I), los operones de Tipo II controlados por FlhD4C2 necesarios para el ensamblaje estructural tanto del anclaje como del cuerpo basal del flagelo (*flgAMN*, *flgBCDEFGHIJ*, *fliAZY*, *fliFGHIJK*, *fliLMNOPQR*), y los operones de Tipo III controlados por FliA necesarios para la motilidad flagelar y quemotaxis (*flgKL*, *fliC*, *fliDST*, *tar-tap-cheRBYZ* y *motAB-cheAW*) y los genes *yjhH* e *ycgR* controladores de FlhD4C2 mostraban mayores niveles de expresión en células  $\Delta$ *glgS* que en células WT (Tabla 1). En conjunto estos genes suponen casi el 60% de los genes cuya expresión es superior en células  $\Delta$ *glgS* que en células WT. Análisis de la expresión de fusiones transcripcionales cromosómicas *lacZY* en células WT y  $\Delta$ *glgS* de algunos de los genes identificados en el análisis transcriptómico corroboraron los resultados obtenidos en el citado análisis (Figura 2). Los resultados del análisis transcriptómico también revelaron que los niveles de expresión de *glgBXCAP* en células  $\Delta$ *glgS* eran normales con respecto a las células WT, como posteriormente se confirmó por análisis de la expresión de fusiones transcripcionales cromosómicas *glgB::lacZY* tanto en células WT como en células  $\Delta$ *glgS* (Figura 2), lo cual indica que el efecto positivo de GlgS sobre la acumulación de glucógeno no se debe a cambios en los niveles de expresión de *glgBXCAP* en *E. coli*.

### 1.2.- GlgS ejerce un efecto negativo sobre la fimbriación de tipo I y sobre la síntesis de flagelos en *E. coli*.

El análisis del perfil de RNA descrito anteriormente indicó que la proteína GlgS ejerce un efecto negativo sobre procesos implicados en la producción de flagelos y fimbrias de tipo 1 determinantes de la colonización de huéspedes, virulencia y patogenicidad bacteriana y adhesión a superficies. [Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J.S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C.H., Hultgren, S.J. (1997) Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. Science 276, 607-611; Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C. (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environ. Microbiol. 2, 450-464; Turnbull, G.A., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M. Saunders, J.R. (2001) The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. FEMS Microbiol. Ecol. 35, 57-65; Bahraniin-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockett, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M., Donnenberg, M.S. (2002) Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are pre-eminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. Mol. Microbiol. 45, 1079-1093; Albareda, M., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megías, M., Temprano, F., Rodríguez-Navarro, D.N. (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. FEMS Microbiol. Lett. 259, 67-73; Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K. (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. Environm. Microbiol. 9, 332-346; Wright, K.J., Seed, P.C., Hultgren, S.J. (2007) Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell Microbiol. 9, 2230-2241]. Para explorar el posible efecto negativo de GlgS sobre la formación de flagelos y fimbrias de tipo 1 se analizaron por microscopía electrónica células de *E. coli* BW25113 y  $\Delta$ *glgS* entrando en la fase estacionaria. Como se muestra en la Figura 3, estos análisis revelaron que las células  $\Delta$ *glgS* eran hiperflageladas e hiperfimbriadas con respecto a células WT. Por lo tanto, todos los datos confirman que la proteína GlgS ejerce un efecto negativo sobre la producción de fimbrias de tipo I y de flagelos.

### 1.3.- GlgS ejerce un efecto negativo sobre la motilidad tipo "swarming" y la quimiotaxis en *E. coli*.

El "swarming" es un tipo de motilidad bacteriana dependiente del flagelo que facilita la migración de las bacterias en sustratos viscosos, como por ejemplo, superficies de agar semisólidas. Para que tenga lugar la motilidad tipo "swarming", primero las células han de diferenciarse en un tipo especializado de célula llamada "swarmer" que se caracteriza por un incremento en el número de flagelos y por la elongación de las células [Harshey, R.M., Matsuyama, T. (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8631-8635; Fraser, G.M., Hughes, C. (1999) Swarming motility. Curr. Opin. Microbiol. 2, 630-635]. La síntesis del flagelo y de componentes relacionados con el flagelo está controlada por 14 operones y más de 50 genes (la mayoría incluidos en la Tabla 1) cuya expresión está bajo un sistema de control jerárquico donde *flhDC* actúa como operón maestro [Kaler, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronern, M., Leibler, S., Surette, M.G., Alon, U. (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. Science 292, 2080-2083]. Recientemente, Inoue et al.

(2007) [Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., Fukui, K. (2007) Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 189, 950-957] han mostrado evidencias de que la expresión de los genes de las fimbrias tipo I también es necesaria para la motilidad tipo "swarming" en *E. coli*.

5 Los análisis transcriptómicos (Tabla 1) y de microscopía electrónica (Figura 3) indican que la proteína GlgS ejerce un efecto negativo sobre la motilidad tipo "swarming" en enterobacterias. Para confirmar este extremo, se cultivaron células WT (BW25113) y  $\Delta glgS$  en placas de agar blando suplementado con Tween y se analizó su motilidad tipo "swarming". También se analizó la motilidad tipo swarming de células  $\Delta glgS\Delta flhC$  y  $\Delta glgS\Delta fliA$  que tienen impedida la formación de flagelos debido a la ausencia de las funciones FlhC y FliA. Como se muestra en la Figura 4A, las células WT apenas mostraron motilidad tipo "swarming", lo cual es consistente con el fenotipo "low-swarming motility" previamente descrito de las células BW25113 [Wood, T.K., González Barrios, A.F., Herzberg, M., Lee, J. (2006) Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 72: 361-367]. Hay que destacar que las células  $\Delta glgS$  mostraron un fenotipo de alta motilidad tipo swarming que se revertía con la expresión ectópica de *glgS* (Figura 4A). Además, las células  $\Delta glgS\Delta flhC$  y  $\Delta glgS\Delta fliA$  no mostraron motilidad tipo "swarming". Por lo tanto, todos los datos obtenidos aportaban evidencias concluyentes de que GlgS ejerce un efecto negativo sobre la motilidad tipo "swarming". El efecto negativo de GlgS sobre la motilidad tipo "swarming" en enterobacterias se confirmó aún más analizando el efecto de la sobreexpresión de *glgS* en la motilidad de células con fenotipo de elevada motilidad tipo swarming tales como las *E. coli* W [Wood, T.K., González Barrios, A.F., Herzberg, M., Lee, J. (2006) Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 72: 361-367], diferentes cepas virulentas de *Salmonella enteritidis* tales como las 3934 y 1344 [Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Humphrey, T.J., Thorns, C.J., Gamazo, C. (1998) Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. J. Clinical Microbiol. 36, 674-678] y las cepas LT2 y 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium [Morán-Zorzano, M.T., Alonso-Casajús, N., Muñoz, F.J., Viale, A.M., Baroja-Fernández, E., Eydallin, G., Pozueta-Romero, J. (2007) Occurrence of more than one important source of ADPglucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. FEBS Lett. 581, 4423-4429; Baugh, S, Ekanayaka, A.S., Piddock, L.J.V., Webber, M.A. (2012) Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. J. Antimicrob Chemother 67, 2409-2417; Patterson, S.K., Borewicz, K., Johnson, T., Xu, W, Isaacson, R.E. (2012) Characterization and differential gene expression between two phenotypic phase variants in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. PLOS ONE 7, e43592] ya que, tal y como se muestra en las Figuras 4B-D, estos análisis revelaron que la sobreexpresión de *glgS* ejercía un efecto negativo sobre la motilidad tipo "swarming" en las células.

La quimiotaxis es un proceso por el cual las células se mueven hacia altas concentraciones de un atrayente o se separan de altas concentraciones de un repelente. El presente análisis transcriptómico indicó que los niveles de expresión de los operones de quimiotaxis *tar-tap-cheRBYZ* y *motAB-cheAW* eran superiores en células  $\Delta glgS$  que en células WT (Tabla 1), lo cual sugería que la proteína GlgS ejerce un efecto negativo sobre la quimiotaxis. Confirmando esta suposición, análisis de la quimiotaxis utilizando placas de quimiotaxis con aspartato revelaron un fenotipo de alta motilidad de células W, que era anulado con la expresión ectópica de *glgS* (Figura 4E).

#### 40 **1.4.- GlgS ejerce un efecto negativo sobre la formación de biofilm en *E. coli*.**

Los biofilmes son comunidades microbianas adheridas a una superficie que se encuentran embebidas en una matriz de EPS producido por la misma comunidad. Tales comunidades poseen propiedades fenotípicas y bioquímicas distintas a las de células que viven en estado planctónico. En *E. coli*, los flagelos y las fimbrias tipo I están implicados en la formación y diferenciación estructural del biofilm [Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C. (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environ. Microbiol. 2, 450-464; Van Houdt, R., Michiels, C.W. (2002) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Res. Microbiol. 156: 626-633; Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56: 187-209; Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P. (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Mol. Microbiol. 48, 253-267; Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., de Hoff, P.L., Hirsch, A.M. (2006) Investigations of Rhizobium biofilm formation. FEMS Microbiol. Ecol. 56, 195-206; Niba, E.T.E., Naka, Y., Nagase, M., Mori, H., Kitagawa, M. (2007) A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. DNA Res. 14, 237-246]. Teniendo en cuenta que las células  $\Delta glgS$  poseen muchos flagelos y muchas fimbrias, se razonó que este tipo de células tendrían una mayor capacidad para formar biofilm que células WT. Para explorar esta hipótesis se comparó la producción de biofilm en células WT (BW25113) y en células  $\Delta glgS$ . También se midió la formación de biofilm en células  $\Delta glgS\Delta flhC$ ,  $\Delta glgS\Delta fimA$  y  $\Delta glgS\Delta wzc$  impedidas en la síntesis de flagelos, fimbrias de tipo I, y de ácido colánico del EPS, respectivamente. Como se muestra en la Figura 5A, las células  $\Delta glgS$  acumularon mucho biofilm en comparación con células WT. Este fenotipo se revertía en gran medida con la expresión ectópica de *glgS*. Además, las células  $\Delta glgS\Delta flhC$ ,  $\Delta glgS\Delta fimA$  y  $\Delta glgS\Delta wzc$  acumularon poco biofilm en comparación con células  $\Delta glgS$ . Por lo tanto, todos los datos indicaban que GlgS ejerce un efecto negativo sobre la formación de biofilm. Tal efecto tiene lugar no solamente en *E. coli* ya que, tal y como se muestra en la Figura 5B, el incremento de *glgS* conlleva a una reducción de los niveles de biofilm en diferentes cepas de *Salmonella* tales como la LT2, 1334, 3934 y la 14028.

65

### 1.5.- La biosíntesis de glucógeno y la motilidad tipo “swarming” compiten por el mismo pool de ATP en mutantes $\Delta$ glgS.

5 Los estudios genéticos a gran escala generan el conocimiento necesario para definir las funciones génicas y la arquitectura de las rutas metabólicas. En esta invención se investigó cómo GlgS afecta a la acumulación de glucógeno llevando a cabo estudios genéticos a gran escala de interacción basados en la conjugación mediada por plásmido F. Para ello se cruzaron células de *E. coli*  $\Delta$ glgS con todos los mutantes de genes no-esenciales de la colección Keio; los dobles mutantes así obtenidos fueron objeto de un screening para determinar su contenido en glucógeno. El análisis de nuestra colección de mutantes mostró 32 dobles mutantes con fenotipo “alto-glucógeno” comparado con el fenotipo de las células  $\Delta$ glgS (Tabla 3), mientras que 36 dobles mutantes mostraron un fenotipo “bajo/sin glucógeno” comparados con las células  $\Delta$ glgS (Tabla 4).

**Tabla 3:** Genes cuya delección incrementa el contenido de glucógeno en células  $\Delta$ glgS

Gen	Función en <i>E. coli</i> ( <a href="http://www.genome.jp">http://www.genome.jp</a> )
<i>clpX</i>	ATPase subunit of the two-component ClpXP protease
<i>cpxA</i>	CpxA periplasmic stress sensor histidine kinase
<i>fliA</i>	Transcription factor sigma 28 for class III flagellar operons
<i>flhC</i>	Transcriptional activator of flagellar class II operons; forms heterotetramer with FlhD
<i>flhD</i>	Transcriptional activator of flagellar class II operons; forms heterotetramer with FlhC
<i>fruR</i>	Catabolite repressor-activator Cra
<i>gcvR</i>	Required for repression of <i>gcv</i> operon by GcvA
<i>glgP</i>	Glycogen phosphorylase
<i>glgX</i>	Glycogen phosphorylase-limit dextrin $\alpha$ -1,6-glucohydrolase
<i>lysS</i>	Lysyl-tRNA synthetase, constitutive
<i>metL</i>	Aspartate kinase / homoserine dehydrogenase
<i>pdxH</i>	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase / pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase
<i>purC</i>	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
<i>purD</i>	phosphoribosylamine-glycine ligase
<i>purE</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase
<i>purF</i>	amidophosphoribosyl transferase
<i>purH</i>	AICAR transformylase / IMP cyclohydrolase
<i>purK</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthetase
<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase
<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
<i>serA</i>	$\alpha$ -ketoglutarate reductase / D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
<i>serB</i>	Phosphoserine phosphatase
<i>serC</i>	Phosphohydroxythreonine aminotransferase / 3-phosphoserine aminotransferase
<i>wzxE</i>	O-antigen translocase; involved in the cross-membrane translocation of the UDP-linked ECA trisaccharide repeat unit of cyclic enterobacterial common antigen ECA(CYC)
<i>ycfR</i>	Protein involved in stress resistance and biofilm formation
<i>ydaF</i>	Rac prophage; predicted protein
<i>yehQ</i>	Predicted protein
<i>yfdG</i>	Bactoprenol-linked glucose translocase
<i>ynfB</i>	Predicted protein
<i>yqiJ</i>	Inner membrane protein, function unknown



*yqiK*

PHB family inner membrane protein, function unknown

**Tabla 4:** Genes cuya delección conlleva a una reducción de los niveles de glucógeno en células  $\Delta$ *glgS*

Gene	Function in <i>E. coli</i> ( <a href="http://www.genome.jp">http://www.genome.jp</a> )
<i>aspC</i>	Aspartate aminotransferase
<i>Dam</i>	DNA adenine methyltransferase
<i>ddlB</i>	D-alanine:D-alanine ligase
<i>dksA</i>	RNA-polymerase-binding protein modulating ppGpp and iNTP regulation
<i>dsrA</i>	Sulfite reductase, dissimilatory-type alpha subunit
<i>essQ</i>	Qin prophage; predicted S lysis protein
<i>fis</i>	Transcriptional activator for rRNA operons
<i>gcvA</i>	Transcriptional repressor for the <i>gcv</i> operon
<i>gidA</i>	uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme
<i>glgA</i>	Glycogen synthase
<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme
<i>glgC</i>	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase
<i>glnP</i>	Glutamine transport system permease
<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase
<i>had</i>	Regulator of DnaA that prevents premature reinitiation of DNA replication
<i>hdhA</i>	7- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase
<i>hfq</i>	Host factor-I protein
<i>mhpT</i>	3-hydroxyphenylpropionic acid transporter
<i>miaA</i>	tRNA dimethylallyltransferase
<i>minC</i>	Inhibition of FtsZ ring polymerization
<i>moaE</i>	Molybdopterin synthase catalytic subunit
<i>pgm</i>	Phosphoglucomutase
<i>prfC</i>	Peptide chain release factor RF-3
<i>prmB</i>	Putative adenine-specific DNA-methyltransferase
<i>puuP</i>	Putrescine importer
<i>relA</i>	(p)ppGpp synthase
<i>rpoS</i>	General stress response sigma factor
<i>sufC</i>	Fe-S cluster assembly ATP-binding protein
<i>trmE</i>	tRNA modification GTPase
<i>trmU</i>	tRNA-specific 2-thiouridylase
<i>ydaT</i>	Required for swarming phenotype, function unknown
<i>ydcQ</i>	Mutational suppressor of null <i>rpoE</i> lethality
<i>yeaD</i>	Glucose-6-phosphate 1-epimerase
<i>ymfT</i>	Cro-like repressor
<i>ymgA</i>	Connector protein for RcsB regulation of biofilm formation
<i>ynjA</i>	Function unknown

Consistente con estudios previos de identificación de genes que afectan a la acumulación del glucógeno [Eydallin, G., Viale, A. M., Moran-Zorzano, M. T., Munoz, F. J., Montero, M., Baroja-Fernandez, E., Pozueta-Romero, J. (2007) Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. FEBS Lett. 581, 2947-2953; Montero, M., Eydallin, G., Almagro, G., Muñoz, F. J., Viale, A. M., Rahimpour, M., Sesma, M.T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2009) *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. Biochem. J. 424, 129-141] la pérdida de las funciones codificadas por *pgm*, *glgA*, *glgC*, *glgB*, *gcvA*, *hfq*, *rpoS*, *prfC*, *relA*, *dksA*, *fis*, *trmE*, *trmU* o *ycdQ* remarcó aún más el fenotipo “bajo glucógeno” de las células  $\Delta glgS$  (Tabla 4). Además, la eliminación de genes involucrados en la degradación del glucógeno, tales como *glgX* y *glgP*, o en la síntesis de aminoácidos tales como *serA*, *serB* y *serC*, o la eliminación de genes cuya delección provoca una fuerte represión de la motilidad tipo swarming tales como *cpxA*, *metL*, *flhC*, *flhD*, *fliA* and *wzxE* [Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., Fukui, K. (2007) Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 189, 950-957] revirtieron el fenotipo “bajo glucógeno” de las células  $\Delta glgS$  (Tabla 3). Hay que destacar que nueve de los dobles mutantes “alto glucógeno” presentaban delecciones en genes que codifican para enzimas implicados en la síntesis de novo de purinas tales como *purL*, *purH*, *purA*, *purM*, *purD*, *purF*, *purK*, *purE* y *purC* (Figura 6) (Tabla 3) (Figura 7A).

Las delecciones de los genes *pur* no solo dieron lugar a un incremento de los niveles de glucógeno en las células  $\Delta glgS$ , sino que además revirtieron el fenotipo de hipermotilidad tipo “swarming” de las células  $\Delta glgS$  (Figura 7B). Debido a que la motilidad tipo “swarming” y la producción de purinas son procesos que consumen elevadas cantidades de ATP [Macnab, R.M. (1996) Flagella and motility. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edn. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.L., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 123-145.; Průb, B.M. (2000) FlhD, a transcriptional regulator in bacteria. Recent Res. Dev. Microbiol. 4, 31-42; Terashima, H., Kojima, S., Homma, M. (2008) Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 270: 39-85; Cho, B.K., Federowicz, S.A., Embree, M., Park, Y.S., Kim, D. and Palsson. B.Ø. (2011) The PurR regulon in *Escherichia coli* K-12 MG1655. Nucl. Acids Res. 39: 6456-6464], se razonó que la deficiencia de glucógeno en las células hipermotiles  $\Delta glgS$  y el contenido elevado de glucógeno en las células de baja movilidad  $\Delta glgS\Delta pur$  (Tabla 4, Figura 7A) sugerían la existencia de una fuerte competencia por el mismo pool de ATP entre los mecanismos que definen la motilidad tipo “swarming” y la producción de purinas controlados por GlgS y la ruta de biosíntesis de glucógeno controlada por GlgC. Así, cuando el consumo de ATP para la motilidad flagelar es elevado (algo que ocurre en las células hipermotiles  $\Delta glgS$ ) la producción de glucógeno se verá reducida como consecuencia de la baja actividad GlgC resultante tanto del acceso restringido al ATP como del incremento del AMP procedente del metabolismo del ATP. Por el contrario, cuando la síntesis *de novo* de purinas es reducida (algo que ocurre en células  $\Delta glgS\Delta pur$ ) GlgC será muy activa y competirá con los mecanismos de motilidad flagelar por el mismo pool de ATP. Para comprobar esta hipótesis se analizó la motilidad tipo “swarming” de las células  $\Delta glgC$  no acumuladoras de glucógeno. También se analizó el efecto de la sobreexpresión de *glgC* sobre el contenido de glucógeno y sobre la motilidad tipo “swarming” tanto en las células silvestres como en las hipermotiles BW25113  $\Delta glgS$ . Además, se comparó los niveles de glucógeno de las células hipermotiles  $\Delta glgS$  con los niveles de las células de baja motilidad  $\Delta glgS\Delta flhC$  y  $\Delta glgS\Delta fliA$ . Estos análisis revelaron que las células  $\Delta glgC$  no acumulan glucógeno, mientras que las células silvestres sobreexpresantes de *glgC* o las células  $\Delta glgS$  sobreexpresantes de *glgC* mostraron un fenotipo de “alto glucógeno” cuando se las compara con las células silvestres y  $\Delta glgS$  respectivamente (Figura 8A). Además, el contenido de glucógeno de las células de baja motilidad  $\Delta glgS\Delta flhC$  y  $\Delta glgS\Delta fliA$  fue mayor que el presentado por las células hipermotiles  $\Delta glgS$  (Figura 8A). Es importante destacar que las células no acumuladoras de glucógeno  $\Delta glgC$  presentaron alta motilidad tipo “swarming” y que el fenotipo de alta movilidad tipo “swarming” de las células  $\Delta glgS$  fue revertido por la expresión ectópica de *glgC* (Figura 8B). El incremento de la expresión de *glgC* no solo ejerce un efecto negativo en la motilidad de *E. coli* sino también en otras enterobacterias tales como las cepas 3934 y 14028 de *Salmonella* (Figura 8C y Figura 8D, respectivamente). Por tanto, el conjunto de los resultados indica que los mecanismos implicados en la biosíntesis del glucógeno y en la motilidad tipo “swarming” compiten por el mismo pool de ATP en las células  $\Delta glgS$ , pudiendo achacar (al menos en parte) el bajo contenido en glucógeno de estas células hipermotiles a (a) bajos niveles de actividad GlgC, consumidora de ATP, como consecuencia del elevado contenido intracelular de AMP, y (b) elevado consumo de ATP asociado a la síntesis de flagelos, la propulsión celular y la síntesis de purinas. Alternativamente, sería posible que los niveles bajos de glucógeno pudiesen provocar de forma indirecta el fenotipo hipermotil de las células  $\Delta glgS$  y  $\Delta glgC$ . Para investigar esta hipótesis se analizó la motilidad de las células  $\Delta glgA$ . Estas células no acumulan glucógeno debido a la ausencia total de glucógeno sintasa [Montero, M., Eydallin, G., Almagro, G., Muñoz, F. J., Viale, A. M., Rahimpour, M., Sesma, M.T., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2009) *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. Biochem. J. 424, 129-141] (Figura 8A), pero todavía poseen GlgC, que consume ATP. Como se muestra en la Figura 8B las células  $\Delta glgA$  mostraron un fenotipo de motilidad tipo “swarming” muy similar al de las células silvestres, descartando la posibilidad de que la alta motilidad tipo “swarming” presentada por células  $\Delta glgC$  y  $\Delta glgS$  sea debido a sus bajos niveles de glucógeno.

#### 1.6.- La biosíntesis de glucógeno y la biosíntesis de EPSs de biofilmes compiten por el mismo pool de G1P en mutantes $\Delta glgS$ .

Los EPSs son componentes fundamentales de la mayoría de las matrices de biofilms cuya síntesis depende de la conversión de la G1P y el UTP en UDPglucosa (UDPG) por acción del enzima UDPG pirofosforilasa (GalU). La delección de los genes *pur* no solo revirtió los fenotipos de hipermotilidad y bajo glucógeno de las células  $\Delta glgS$  (ver Figura 7), sino que también revirtió el fenotipo de elevada producción de biofilm (Figura 9). Puesto que tanto la síntesis de glucógeno (dependiente de GlgC) como la síntesis de los EPSs del biofilm (dependiente de GalU) necesitan G1P, se razonó que el bajo contenido de glucógeno de las células  $\Delta glgS$  (productoras de gran cantidad de biofilm), y el alto contenido de glucógeno de las células  $\Delta glgS\Delta pur$  (poco productoras de biofilm) (Figura 7A) apuntaban a la existencia en células  $\Delta glgS$  de una fuerte competencia por el mismo pool de G1P entre los mecanismos "GlgS-dependientes" "GalU-dependientes" implicados en la biosíntesis de los EPSs y los mecanismos "GlgC-dependientes" implicados en la biosíntesis de glucógeno. Así, en condiciones de baja actividad GlgC debidas al elevado contenido de AMP y al elevado consumo de ATP para la motilidad flagelar que ocurren en las células  $\Delta glgS$  con elevado contenido de biofilm la producción de glucógeno se verá reducida como consecuencia de la baja actividad GlgC, de modo que la G1P "sobrante" o "excedente" se usará para la síntesis de los EPSs tales como el ácido colánico. Para comprobar esta hipótesis se comparó el contenido de biofilm de células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113 con el de las células no acumuladoras de glucógeno  $\Delta glgC$ . También se analizó el efecto de la sobreexpresión de *glgC* sobre la producción de biofilm en las células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, en células  $\Delta glgS$  acumuladoras de biofilm y en diferentes cepas de *Salmonella*. Finalmente, se analizó el contenido de ácido colánico en células silvestres, células  $\Delta wzc$  y células  $\Delta galU$  impedidas en la ruta de síntesis de ácido colánico (Figura 10), células  $\Delta glgS$ , células  $\Delta glgC$ , células  $\Delta glgS$  que sobre-expresan *glgC*, células  $\Delta glgC$  que expresan ectópicamente *glgC*, células  $\Delta glgS\Delta wzc$  y células  $\Delta glgC\Delta wzc$ . Tal y como se muestra en la Figura 9A las células  $\Delta glgC$  y  $\Delta glgS$  de *E. coli* mostraron un fenotipo de alta producción de biofilm que fue revertido mediante la expresión ectópica de *glgC* y mediante eliminación de la función *galU* en las células  $\Delta glgS\Delta galU$  y  $\Delta glgC\Delta galU$  (Figura 9A). Finalmente, el incremento de la expresión de *glgC* conllevó a una reducción del contenido de biofilm en las cepas LT2, 1334, 3934 y 14028 de *Salmonella* (Figura 9B). Tal y como se muestra en la Figura 11, las células  $\Delta wzc$  y  $\Delta galU$  de *E. coli* acumularon muy poco (o nulo) ácido colánico, mientras que las células  $\Delta glgS$  y  $\Delta glgC$  mostraron un fenotipo de alto contenido de ácido colánico que fue revertido mediante expresión ectópica de *glgC* y mediante eliminación de la función *galU* en las células  $\Delta glgS\Delta galU$  y  $\Delta glgC\Delta galU$ . Además, las células  $\Delta glgS\Delta wzc$  y  $\Delta glgC\Delta wzc$  acumularon poco ácido colánico. Por tanto, el conjunto de los resultados muestra que los mecanismos implicados en la síntesis de glucógeno y de los EPSs de biofilm compiten por el mismo pool de G1P en células  $\Delta glgS$ . Aparentemente, por tanto, el bajo contenido de glucógeno de las células  $\Delta glgS$  es debido a la baja actividad GlgC como consecuencia de los elevados niveles de AMP y/o a la competencia por el ATP con los activos mecanismos de motilidad flagelar y de síntesis de purinas, de modo que el "exceso" de G1P (no utilizado para la producción de glucógeno) se desvía hacia la producción de EPSs.

Tal y como se muestra en la Tabla 1, los niveles de expresión de cinco de los seis operones implicados en la síntesis de novo de UMP (*carAB*, *pyrBI*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrE* and *pyrF*) (Figura 12), y de los dos operones (*codBA* y *upp*) implicados en la ruta de rescate de síntesis de UMP a partir de bases pirimidínicas y nucleósidos, son elevados en células  $\Delta glgS$ . El UMP es el precursor para la síntesis de UTP [Turnbough, C.L., Switzer, R.L. (2008) Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. Microbiol. Mol. Biol. Reviews 72, 266-300], que a su vez es el sustrato para la producción de UDPG, el cual a su vez está implicado en la biosíntesis de EPSs. Hay que destacar que la inactivación de los genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de novo de UMP impide la producción de polisacáridos de biofilm [Garavaglia, M., Rossi, E., Landini, P. (2012) The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in *Escherichia coli*. Plos one 7: e31252].

Por lo tanto, los resultados son globalmente consistentes con la visión de que, tal y como se ilustra en el modelo metabólico de la Figura 13, GlgS ejerce un efecto negativo sobre la producción de biofilms bacterianos ya que reprime la expresión de genes implicados en la producción de flagelos, fimbrias y EPSs. Altos niveles de GlgS (existentes durante el estado estacionario) conllevan a una reducción del consumo de ATP necesario para la motilidad bacteriana y la síntesis de purinas y pirimidinas. En este estado, el ATP y la G1P excedentes (no utilizados para la propulsión flagelar ni para la producción de EPSs, respectivamente) son utilizados por GlgC para producir ADPG necesario para la biosíntesis de glucógeno. Bajos niveles de GlgS (existentes durante la fase exponencial de crecimiento) conllevan a un elevado consumo de ATP necesario para la motilidad bacteriana y para la síntesis de purinas y pirimidinas, y a un elevado consumo de G1P necesario para la producción de EPSs. En ese estado, la disponibilidad de ATP y G1P para la producción de glucógeno es reducida. Hay que destacar que, si bien los resultados muestran que el efecto de GlgS sobre la motilidad y la producción de biofilms es directo (control transcripcional), su efecto sobre el metabolismo del glucógeno es indirecto. Debido a que GlgS es un determinante principal de la composición de la superficie de *E. coli*, y que su efecto en el metabolismo del glucógeno parece ser solo indirecto, la proteína ha sido renombrada como Regulador de la Composición de Superficie (ScoR: Surface COmposition Regulator). Los resultados presentados en la presente invención son también consistentes con la idea de que GlgC regula fuertemente la motilidad y la producción de EPSs. Una actividad GlgC elevada conlleva a un elevado consumo de ATP y G1P para la producción de glucógeno. Esta situación conlleva a su vez una reducción de los niveles de ATP necesarios para la motilidad flagelar y una reducción de G1P necesarios para la producción de EPSs.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

**Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo:**

Las cepas bacterianas, mutantes, y plásmidos usadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5.

5 **Tabla 5:** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta invención. Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance; Km<sup>R</sup>, kanamycin resistance; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistance

Bacteria	Descripción	Fuente/referencia
W	ATCC 9637	Lee et al. (1997)
BW25113	<i>lacI<sup>r</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub></i>	Keio collection (Baba et al. 2006)
Δ <i>glgS</i>	BW25113 Complete <i>glgS</i> replaced by a Km <sup>R</sup> cassette	Keio collection (Baba et al. 2006)
Δ <i>glgA</i>	BW25113 Complete <i>glgA</i> replaced by a Km <sup>R</sup> cassette	Keio collection (Baba et al. 2006)
Δ <i>glgC</i>	BW25113 Complete <i>glgC</i> reemplazado por un casete de resistencia a kanamicina (Km <sup>R</sup> )	Keio collection (Baba et al. 2006)
<i>glgB::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>glgB::lacZY</i>	Montero et al. (2009)
<i>lrhA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>lrhA::lacZY</i>	Este trabajo
<i>fliA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fliA::lacZY</i>	Este trabajo
<i>flhC::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flhC::lacZY</i>	Este trabajo
<i>fimA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fimA::lacZY</i>	Este trabajo
<i>ycgR::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>ycgR::lacZY</i>	Este trabajo
<i>trpE::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>trpE::lacZY</i>	Este trabajo
<i>flgB::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flgB::lacZY</i>	Este trabajo
<i>motA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>motA::lacZY</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS glgB::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>glgB::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS lrhA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>lrhA::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS fliA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fliA::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS flhC::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flhC::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS fimA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fimA::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS ycgR::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>ycgR::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS trpE::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>trpE::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS flgB::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flgB::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo
Δ <i>glgS motA::lacZY</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>motA::lacZY</i> en Δ <i>glgS</i>	Este trabajo

**Tabla 6:**

10

Plásmido	Descripción	Fuente
pCP20	Plásmido que expresa la FLP recombinasa, Amp <sup>R</sup> , usado para eliminar cassettes Km <sup>R</sup>	Datsenko and Wanner (2000)
pKG137	Plasmido que incluye el gen <i>lacZY</i> y el casete Km <sup>R</sup> , usado para la construcción de fusions transcripcionales	Montero et al. (2011)
pCA24N <i>glgC</i>	Plásmido usado para la sobre-expresión de <i>glgC</i> , Cm <sup>R</sup>	ASKA collection (Kitagawa et al. 2005)

pCA24N*glgS* Plásmido usado para la sobre-expresión de *glgS*, ASKA collection (Kitagawa et al. 2005)  
Cm<sup>R</sup>

Los mutantes por delección sencillos de la cepa BW25113 derivada de *E. coli* K-12 se obtuvieron de la colección Keio [Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008]. Los mutantes por delección dobles se construyeron a partir de los mutantes sencillos de la colección Keio, los cuales poseen un casete de resistencia a kanamicina en el sitio de la delección génica. El casete de kanamicina de la célula receptora fue eliminado mediante el uso del plásmido termosensible pCP20, que provoca la expresión de la recombinasa FLP en *E. coli*. [Cherepanov, P.P., Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of FLP-catalized excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene 158: 9-14]. A continuación, la delección presente en la cepa donadora fue transducida a la cepa receptora usando el fago P1 [Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Se usaron placas de LB suplementadas con kanamicina para la selección de los doble mutantes, cuyas delecciones fueron posteriormente comprobadas mediante PCR. La expresión de *glgC* y *glgS* en trans se realizó transformando la células con los vectores pCA24N-*glgC* y pCA24N-*glgS* obtenidos de la colección ASKA [Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ilka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., Mori, H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. DNA Res. 12: 291-299]. Las células fueron crecidas a 37° C en agitador orbital con fuerte agitación (200 rpm) y en medio líquido Kornberg (1.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.85% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6% extracto de levadura Difco) suplementado con glucosa 50 mM y en caso necesario el antibiótico de selección apropiado, inoculando con 1 volumen de precultivo crecido durante 16 horas por cada 50 volúmenes de medio fresco.

#### Fusiones transcripcionales *lacZY*

El casete de kanamicina insertado en el lugar del gen deleccionado de los mutantes de la colección Keio [Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008] fue eliminado utilizando el plásmido termosensible pCP20, que expresa la recombinasa FLP [Cherepanov, P.P. and Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of FLP-catalized excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene 158: 9-14]. La cicatriz dejada tras eliminar el casete de resistencia a kanamicina incluye un sitio FRT de 34 nucleótidos [Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2: 2006.0008], el cual fue utilizado para construir las fusiones transcripcionales *lacZY* tal y como detalla en Ellermeier et al. [Ellermeier, C.D., Janakiraman, A., Schlauch, J.M. (2002) Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. Gene 290, 153-161]. Brevemente, los mutantes de la colección Keio transformados con el plásmido pCP20 fueron nuevamente transformados con el plásmido pKG137, el cual tiene un casete *lacZY* y Km<sup>R</sup> funcional que se integró en la orientación correcta en el sitio FRT por acción de la recombinasa FLP dando lugar a fusiones transcripcionales *lacZY* donde previamente se encontraba localizado el casete de resistencia a kanamicina.

#### Seguimiento del crecimiento, medición de la actividad b-galactosidasa y medición de los niveles de proteína, glucógeno y ácido colánico

El crecimiento bacteriano fue seguido espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nm. Los cultivos se recogieron a la entrada de la fase estacionaria, fueron centrifugados a 4400 g durante 15 min, lavados con medio Kornberg fresco, resuspendidos en Tris/HCl 40mM pH 7,5 y sonicados antes de llevar a cabo las medidas de contenido en proteína y glucógeno. La actividad β-galactosidasa fue medida y representada tal y como se describe en [Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor]. La proteína total de los extractos crudos fue medida mediante el método de Bradford usando un reactivo comercial de Bio-Rad. El análisis cualitativo de la presencia de glucógeno fue llevado a cabo usando la técnica de la tinción bajo vapores de yodo [Govons, S., Vinopal, R., Ingraham, J., Preiss, J. (1969) Isolation of mutants of *Escherichia coli* B altered in their ability to synthesize glycogen. J. Bacteriol. 97, 970-972]. Las medidas cuantitativas de glucógeno fueron realizadas usando un kit (Boehringer Mannheim) basado en la degradación del glucógeno por amiloglucosidasa. La medición del contenido de ácido colánico se llevó a cabo según el método descrito en [Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H., Cozzone, A.J., Grangeasse, C. (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. J. Mol. Biol. 367, 42-53].

#### Microscopía electrónica para el análisis de flagelos y fimbrias tipo I

Se recogieron los cultivos bacterianos a la entrada de la fase estacionaria mediante centrifugación a 4400 g durante 15 minutos. Las células fueron lavadas dos veces utilizando tampon fosfato salino y fueron fijadas durante 15

minutos en tetróxido de osmio al 1% antes de ser colocadas sobre unas rejillas de cobre recubiertas de Formvar. Estas preparaciones fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% (p/v) antes de ser analizadas en un microscopio de transmisión de electrones EFTEM Zeiss Libra 120.

## 5 **Microarrays**

Se crecieron los cultivos de células *ΔglgS* y de la cepa silvestre en 20 mL de medio Kornberg suplementado con glucosa al 1% bajo fuerte agitación y a 37°C. Los cultivos fueron recogidos a la entrada del estado estacionario mediante centrifugación. Las células fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C hasta su uso. El RNA total fue extraído usando el reactivo TRIzol según el protocolo descrito en [Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.A., Soubigou, G., Régnault, B., Coppée, J.Y., Lecuit, M., Johansson, J., Cossart, P. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459: 950-956]. El cDNA marcado por fluorescencia para las hibridaciones de los microarray fue obtenido utilizando el kit cDNA Labelling System (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 20 µg de RNA total fue convertido en cDNA con la transcriptasa reversa Superscript III usando hexámeros aleatorios como cebadores, e incluyendo nucleótidos modificados en la mezcla de reacción. Después de purificar el cDNA, se unieron los marcadores fluorescentes Cy3 o Hyper5 (GE Healthcare) al cDNA usando los nucleótidos modificados. La eficiencia del marcaje se analizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Se mezclaron y secaron en Speed-Vac cantidades iguales de cDNA marcado con Cy3 o Hyper5, uno de ellos correspondiente al control y el otro a la muestra a ser analizada. La hibridación se realizó con el *E. coli* microarray 8×15K (G4813A-020097, Agilent). Las condiciones concretas para el marcaje e hibridación son los descritos en el manual de instrucciones "The manual two color microarray based gene expression Analysis" de Agilent Technologies. Se realizaron tres réplicas independientes para las células *ΔglgS* y para la cepa silvestre. Las imágenes de los canales Cy3 e Hyper5 fueron capturadas con un escáner GenePix 4000B (Axon, Union City, CA, EEUU). Cada uno de los puntos fue cuantificado con el programa GenPix (Axon) y normalizado por el método Lowess. La media de las intensidades log-ratio de las tres réplicas y su desviación estándar fueron calculadas y los valores de expresión fueron analizados estadísticamente usando el programa LIMMA Package [Smyth, G.K., Speed, T. (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273]. Se realizó la selección de los genes que estadísticamente se expresaban de manera diferencial en base a su valor *p* (<0.05, *t de Student*) y al número de veces que se expresaban en células *ΔglgS* comparadas con la cepa silvestre. La caracterización funcional de los genes que se expresaban diferencialmente se llevó a cabo usando los sitios web KEGG y regulonDB.

### **Análisis de motilidad y quimiotaxis en *E.coli*:**

Las placas para los ensayos de motilidad tipo "swarming" se prepararon como se describe en [Niu, C., Graves, J.D., Mokuolu, F.O., Gilbert, S.E., Gilbert, E.S. (2005) Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *J. Microbiol. Methods* 62: 129-132]. Los ensayos de quimiotaxis se llevaron a cabo tal y como se describe en [Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwithz, B., Wendisch, V.F., Uden, G. (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45: 521-532]. El medio mínimo utilizado para los ensayos de motilidad tipo "swarming" incluía 10 mM K<sup>+</sup>-fosfato (pH 7.0), 1 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3% Bacto agar (Difco), 20 µg ml<sup>-1</sup> de L-treonina, L-leucina, L-histidina, L-metionina y 1 µg ml<sup>-1</sup> de tiamina. Para el ensayo de quimiotaxis para aspartato, las placas fueron además suplementadas con 100 mM aspartato, 0.5% NaCl y 1 mM glicerol.

### **Ensayo de biofilm con cristal violeta**

Este ensayo es una modificación del descrito originalmente en [Pratt, L.A., Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-93]. Los cultivos se llevaron a cabo en medio Kornberg-glucosa en microplacas de 96 pocillos de poliestireno (No 82.1581.001, SARSTEDT) a 28°C y durante 48 h sin agitación. Las placas multipocillo fueron lavadas cuidadosamente con agua, teñidas con 1% cristal violeta durante 20 min, lavadas de nuevo con agua, y finalmente se añadió a cada uno de los pocillos 100 µl de una solución 70% etanol y 30% acetona. La tinción por cristal violeta fue cuantificada por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm.

### **Generación de colecciones a gran escala de dobles mutantes para la identificación de genes cuya delección afecta al contenido de glucógeno de las células *ΔglgS***

La generación de una colección de dobles mutantes *ΔglgS* cruzados con los mutantes sencillos de genes no esenciales presentes en la colección Keio se llevó a cabo esencialmente como se describe en [Typas, A., Nichols, R.J., Siegele, D.A., Shales, M., Collins, S., Lim, B., Braberg, H., Yamamoto, N., Takeuchi, R., Wanner, B.L., Mori, H., Weissman, J.S., Krogan, N.J. Gross, C.A. (2008) A tool-kit for high-throughput, quantitative analyses of genetic interaction in *E. coli*. *Nat. Methods* 5, 781-787]. Este método permite la generación sistemática y la ordenación de dobles mutantes directamente sobre medio sólido, en arrays de alta densidad. La colección de mutantes así obtenida fue sometida a un screening en medio Kornberg sólido suplementado con glucosa para identificar aquellos con niveles de glucógeno alterados, usando la técnica de tinción bajo vapores de yodina [Govons, S., Vinopal, R., Ingraham, J., Preiss, J. (1969) Isolation of mutants of *Escherichia coli* B altered in their ability to synthesize glycogen.

## ES 2 483 116 A2

J. Bacteriol. 97, 970-972]. En presencia de vapores de yodina los mutantes con contenido elevado de glucógeno se tiñen de color marrón más oscuro que su mutante parental, mientras que los mutantes con bajo contenido en glucógeno tiñen de color amarillo.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Compuesto útil para reducir o anular procesos determinantes de la patogenicidad y virulencia bacterianas y de la adherencia bacteriana a superficies tales como la producción de fimbrias de tipo 1, la motilidad flagelar y la formación de EPSs y biofilms bacterianos, caracterizado porque regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la estimulación de GlgS y/o GlgC o cualquier otra función que conlleve un gasto de ATP y G1P para la producción de ADPG necesario para la síntesis de glucógeno, y porque se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 - una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular seleccionada entre una proteína con actividad AGP que comprende una secuencia perteneciente al siguiente grupo: la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 6; o una proteína GlgS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4;
- 15 - una secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona entre una secuencia *agg*, que codifica para una proteína o péptido con actividad AGP, y que comprende SEQ ID NO 1 ó SEQ ID NO5; o una secuencia *glgS*, que codifica para una proteína o péptido GlgS, y comprende la secuencia SEQ ID NO 3;
- 20 - un regulador alostérico capaz de activar a una proteína o péptido con actividad AGP perteneciente al siguiente grupo: sedoheptulosa 1,7-difosfato, D-arabinitol 1,5-difosfato, glucosa 1,6-difosfato, gliceraldehído 3-P, 2-fosfoglicerato, eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato, fosfoketodeoxigluconato, magnesio (Mg<sup>2+</sup>), NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2) o 3-fosfoglicerato (3PGA).
- 25 2.- Compuesto según la reivindicación 1 para uso en la prevención y tratamiento de una contaminación bacteriana.
- 3.- Compuesto según la reivindicación 2 caracterizado porque la contaminación bacteriana se refiere a una infección bacteriana en mamíferos, preferentemente humanos, o a la presencia de bacterias en distintos materiales, superficies o equipos asépticos.
- 30 4.- Uso del compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o para la limpieza antiséptica.
- 35 5.- Uso del compuesto según la reivindicación 4 caracterizado porque la bacteria pertenece al siguiente grupo:
- 40 a) Gram negativas, preferentemente, *Escherichia*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bartonella*, *Neisseria* y *Bordetella*, y más preferentemente, *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *C. jejuni*, *S. dysenteriae*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *B. bacilliformis*, *N.gonorrhoeae*, *B. pertusis*; y
- b) Gram positivas, preferentemente, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, y más preferentemente, *L. monocytogenes*, *C. difficile* y *S. pyogenes*.
- 45 6.- Composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como antiséptico caracterizada porque comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 en cantidad farmacéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 50 7.- Composición farmacéutica según la reivindicación 6 caracterizada porque el compuesto es una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular, dicha proteína seleccionada entre una proteína con actividad AGP que comprende una secuencia perteneciente al siguiente grupo: la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 6; o una proteína GlgS que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 4.
- 55 8.- Composición farmacéutica según la reivindicación 6 caracterizada porque el compuesto es una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular, dicha secuencia seleccionada entre una secuencia *agg*, que codifica para una proteína o péptido con actividad AGP, y que comprende SEQ ID NO 1 ó SEQ ID NO5; o una secuencia *glgS*, que codifica para una proteína o péptido GlgS, y comprende la secuencia SEQ ID NO 3.
- 60 9.- Composición farmacéutica según la reivindicación 6 caracterizada porque el compuesto inhibidor es un regulador alostérico capaz de activar a una proteína o péptido con actividad AGP seleccionado del siguiente grupo: sedoheptulosa 1,7-difosfato, D-arabinitol 1,5-difosfato, glucosa 1,6-difosfato, gliceraldehído 3-P, 2-fosfoglicerato, eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato, fosfoketodeoxigluconato, ión magnesio (Mg<sup>2+</sup>), NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2) o 3-fosfoglicerato (3PGA).
- 65



10.- Uso de la composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 6 a la 9 para la limpieza antiséptica de entornos o materiales contaminados por bacterias.

5 11.- Procedimiento para la identificación de un compuesto inhibidor de la motilidad, formación de EPSs y biofilms determinantes de la patogenicidad y virulencia bacteriana, así como de la capacidad de adherencia de las bacterias a superficies, preferentemente, mediante un ensayo de alta capacidad caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- 10 a) crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo suplementado con el compuesto candidato,
- b) análisis cualitativo-visual de los niveles de glucógeno bacteriano producidos en las bacterias de a), preferentemente, mediante tinción del glucógeno con vapores de yodo, y
- 15 c) selección de un compuesto inhibidor cuando dicho compuesto incrementa la cantidad de glucógeno bacteriano detectado según el método de b) con respecto a sus niveles basales.

20 12.- Compuesto útil para incrementar la producción de fimbrias de tipo 1, la motilidad, la formación de EPSs y/o biofilms bacterianos caracterizado porque regula negativamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano a través de la inhibición de GlgC y/o GlgS, es un regulador alostérico capaz de inhibir a GlgC u otra AGP de origen microbiano cuya secuencia es diferente a GlgC, y se selecciona del siguiente grupo: AMP, ADP, ortofosfato y pirofosfato.

Figura 1

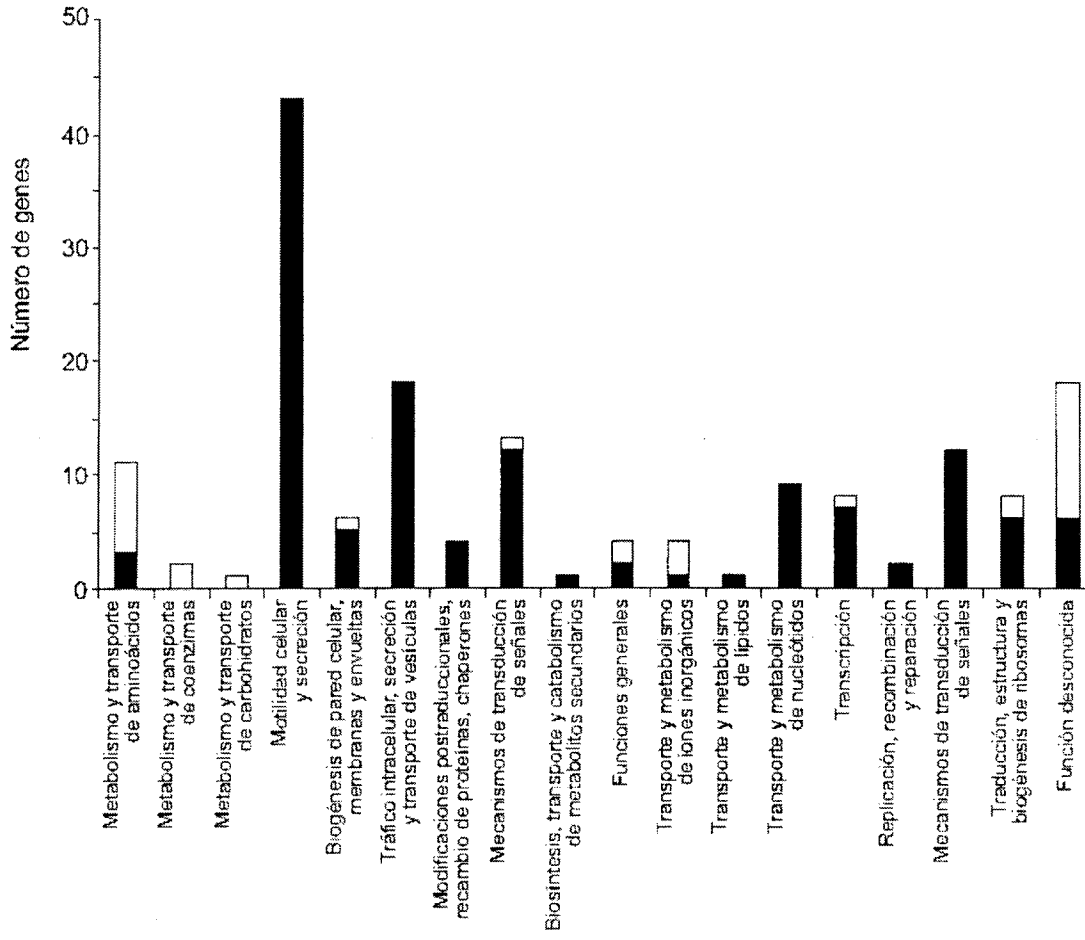


Figura 2

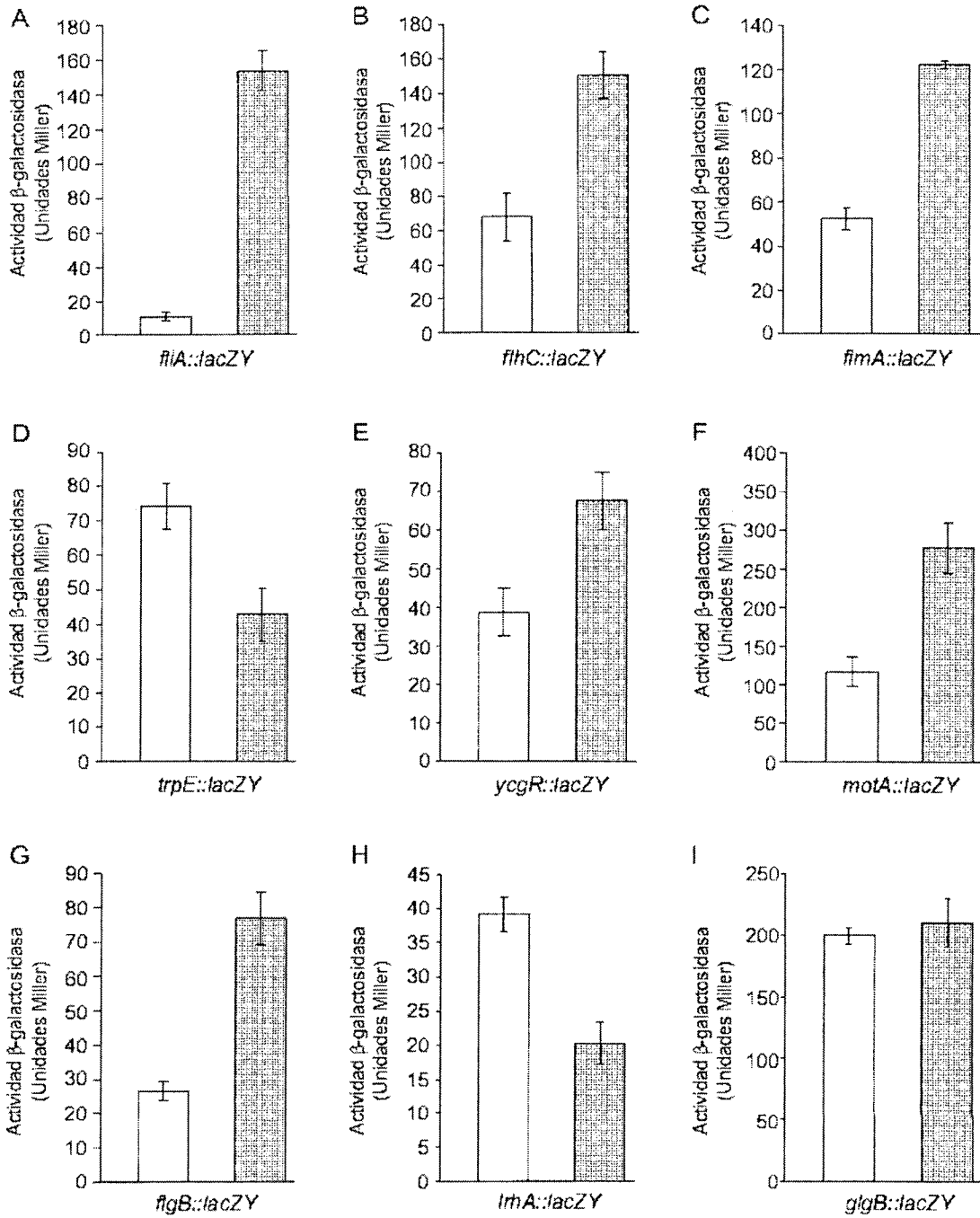


Figura 3

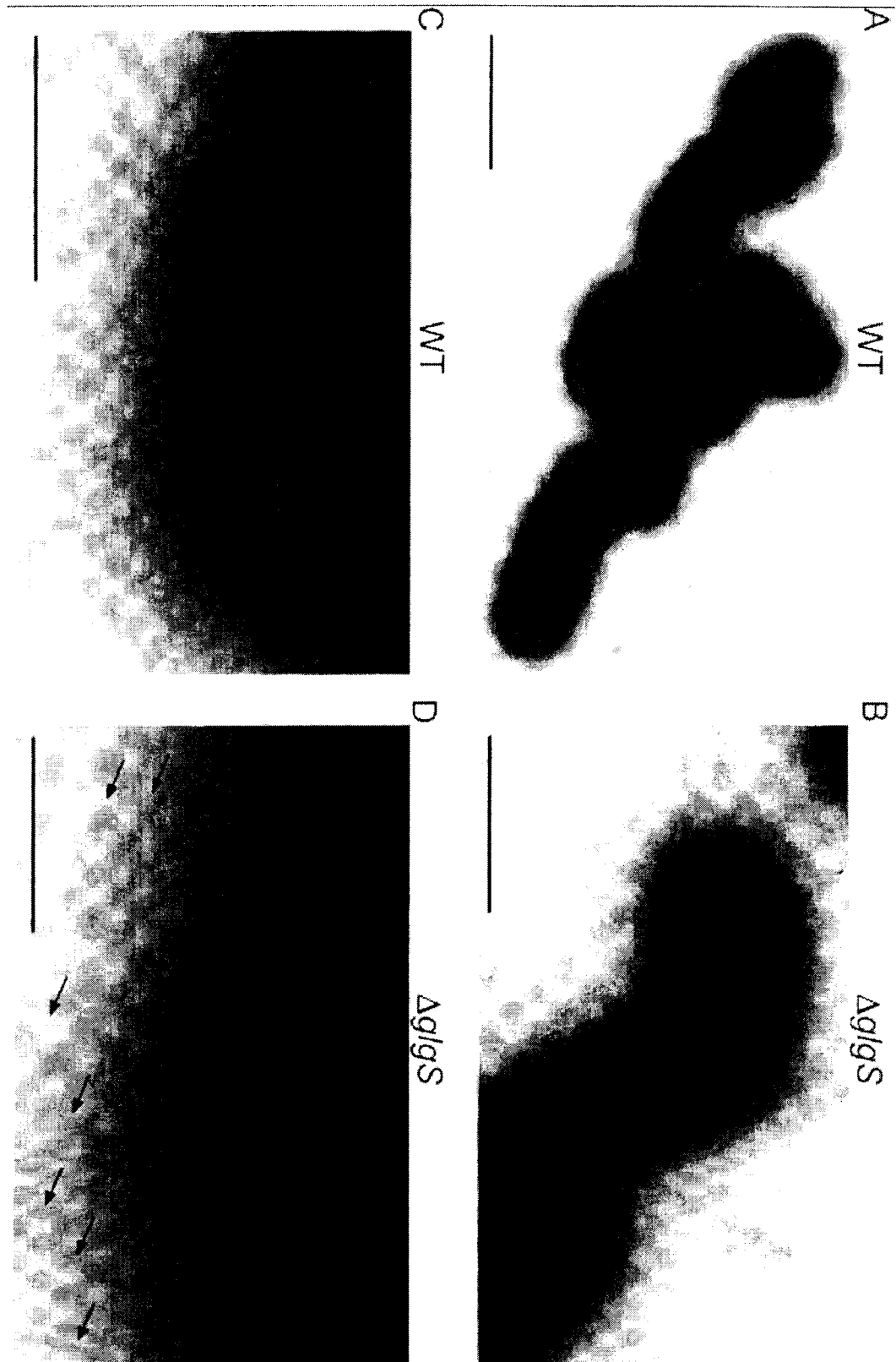


Figura 4

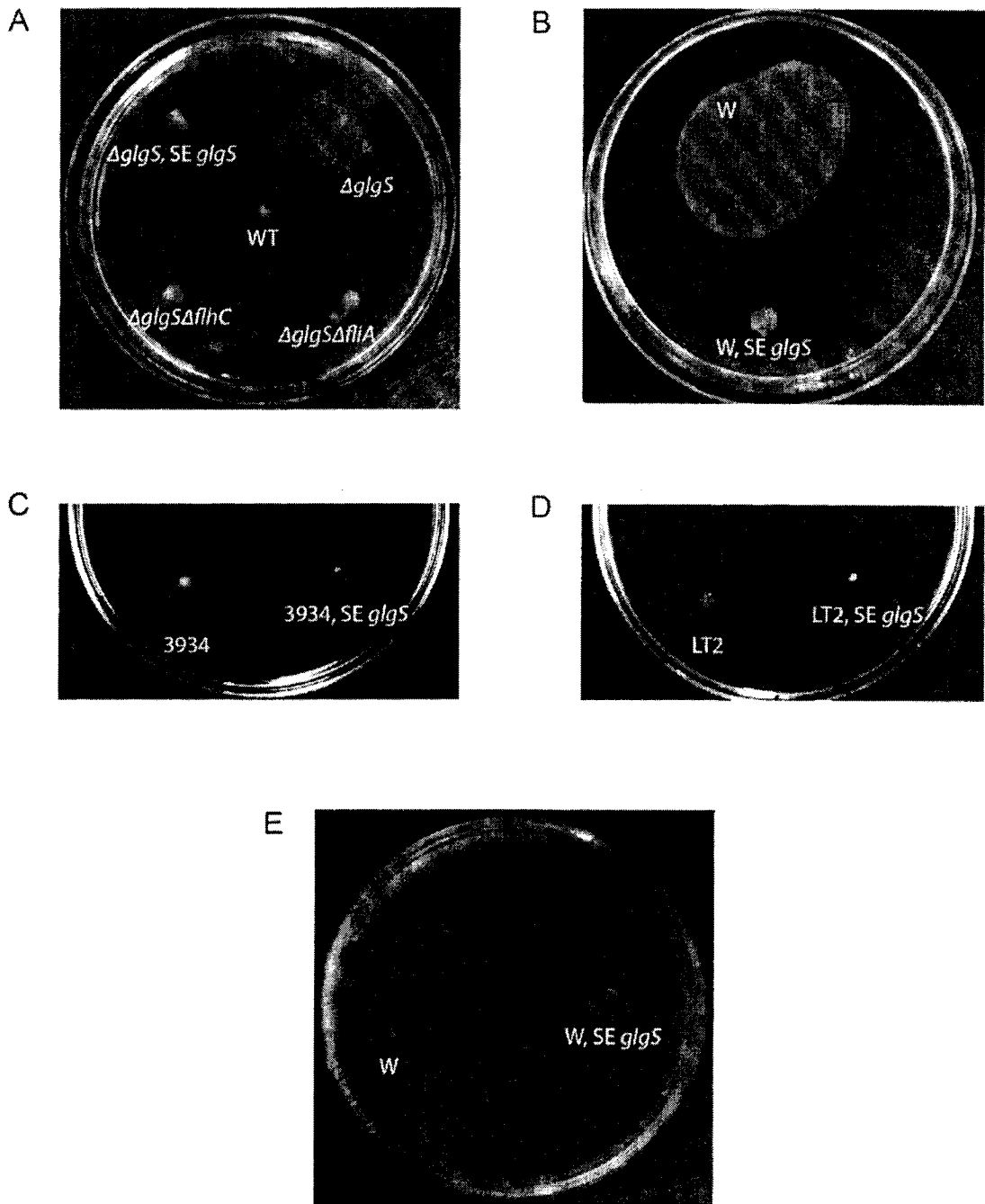


Figura 5

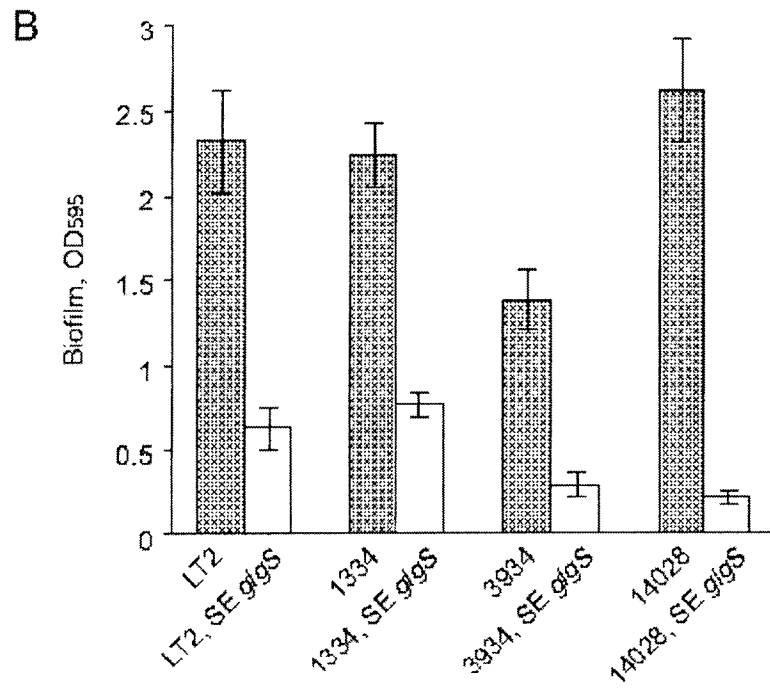
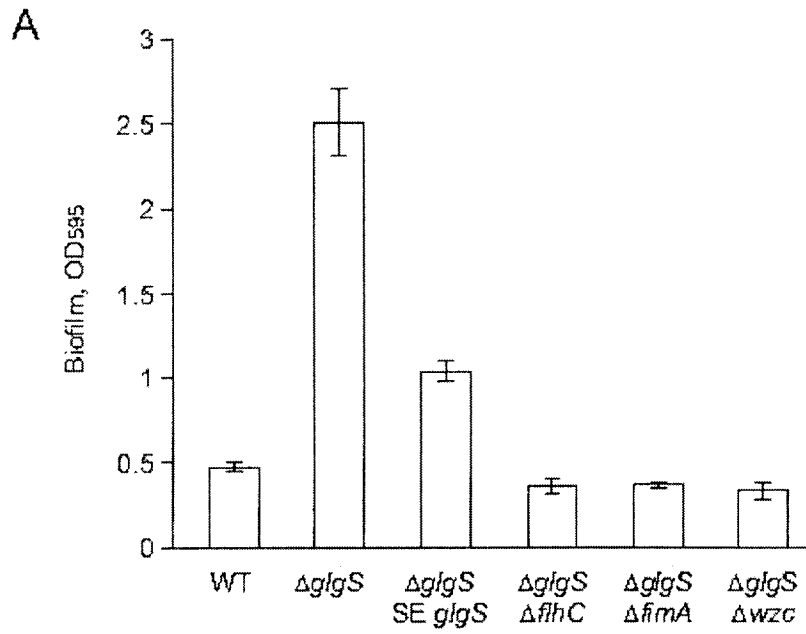


Figura 6

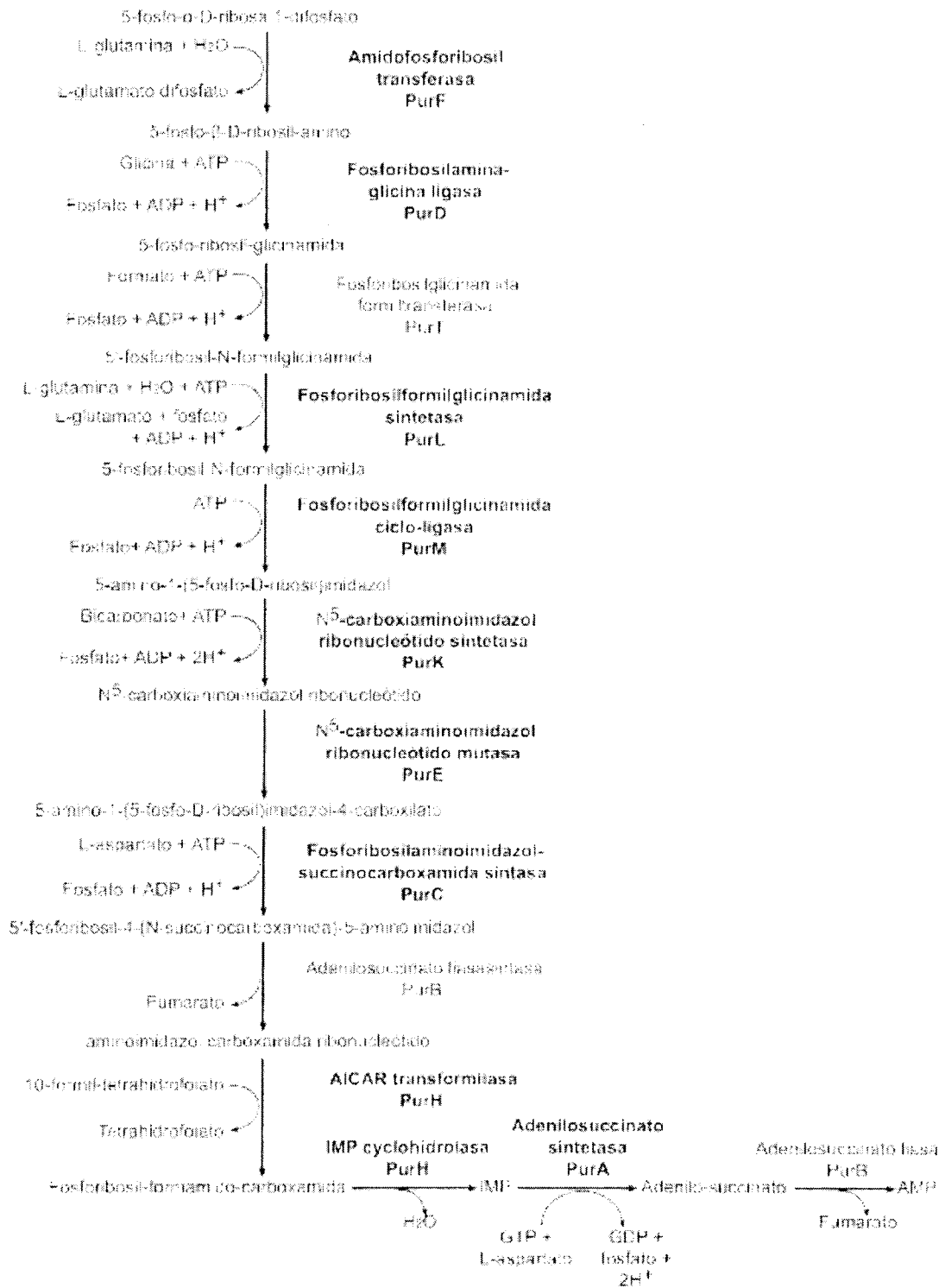
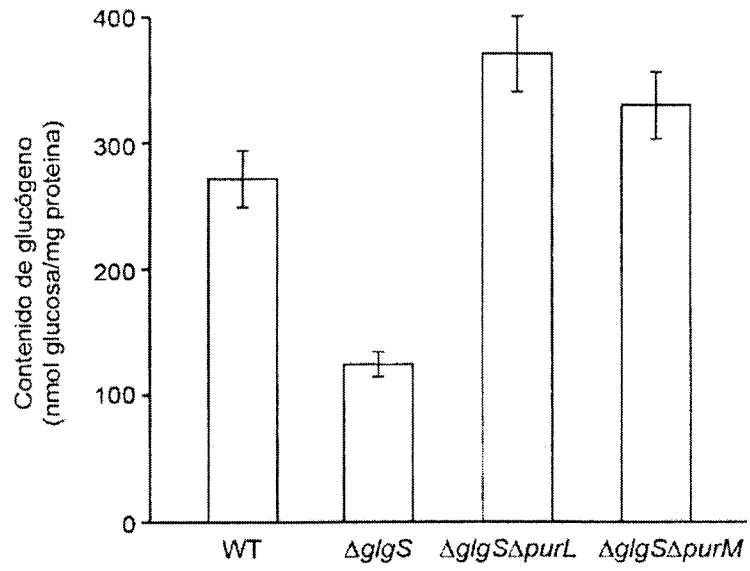


Figura 7

A



B

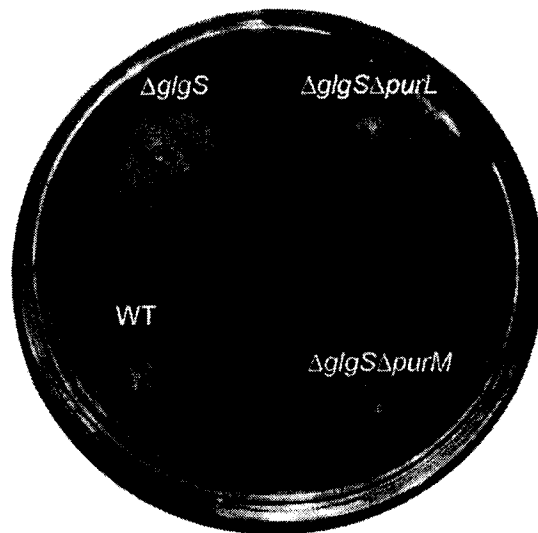




Figura 8

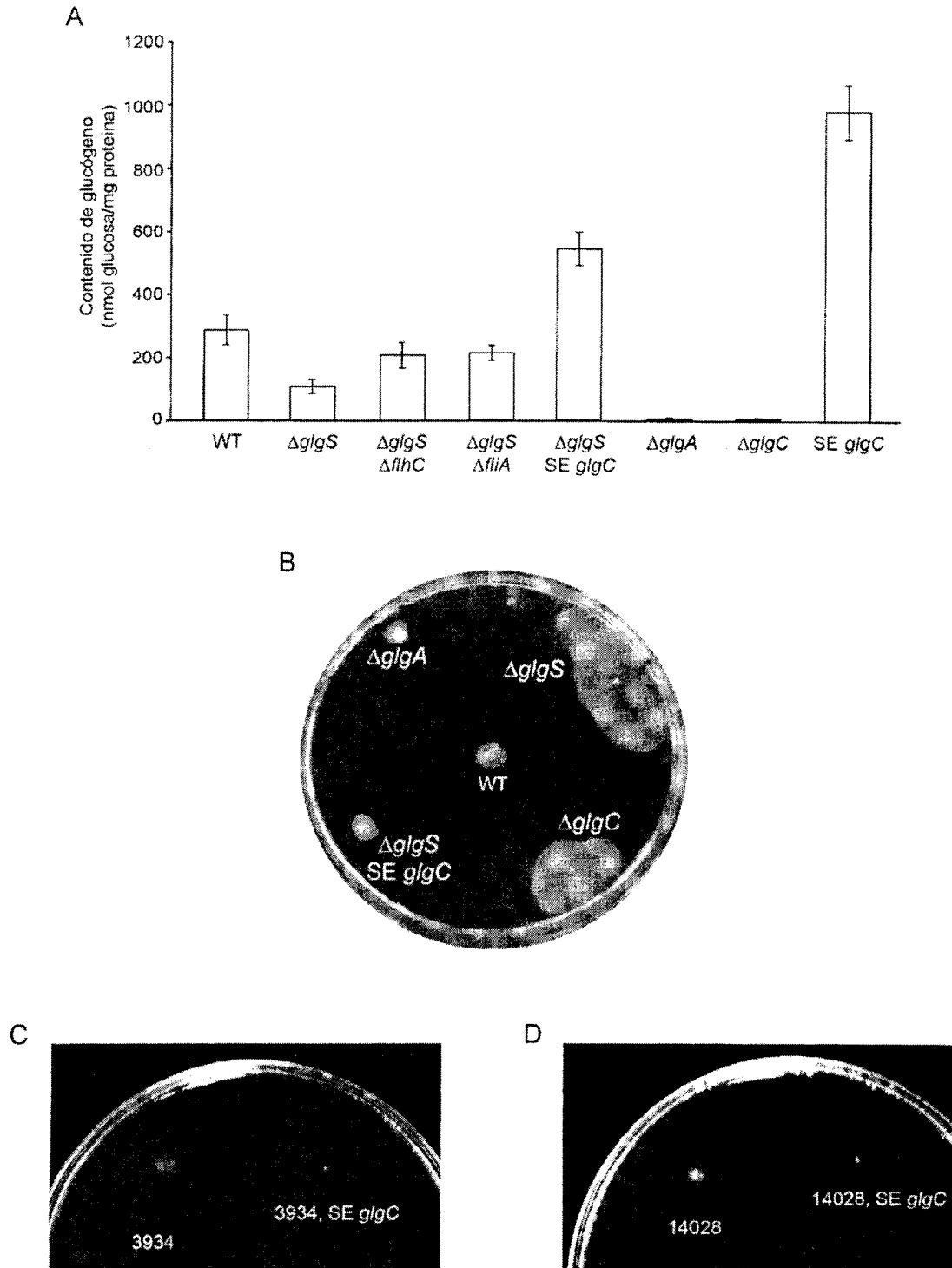


Figura 9

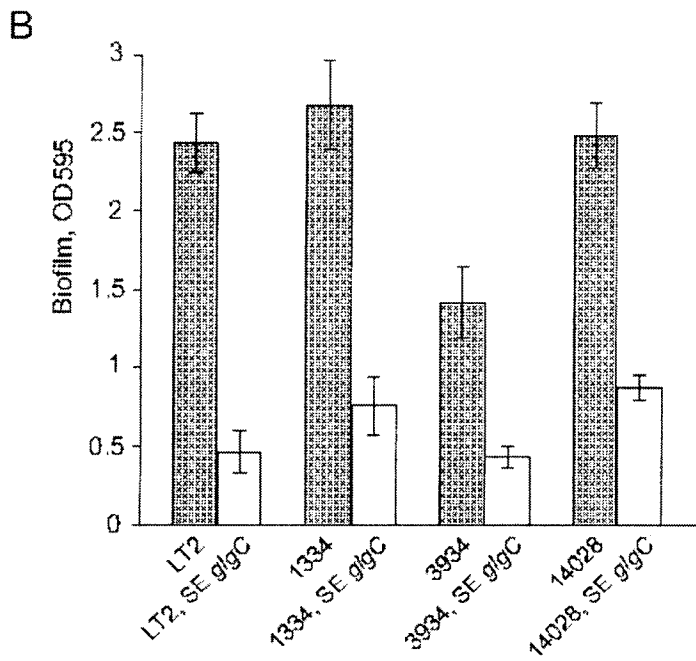
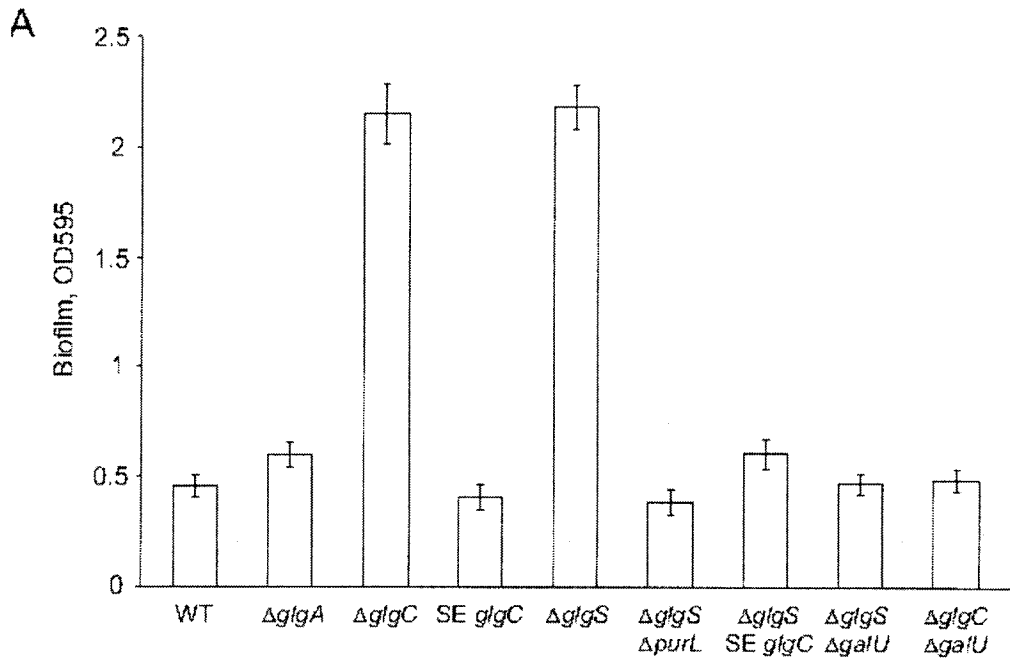


Figura 10

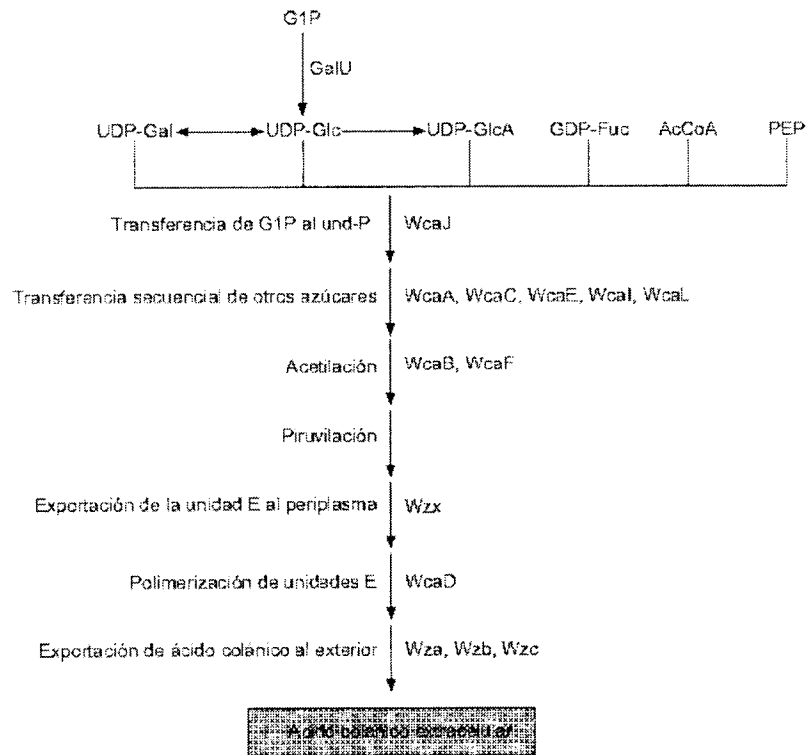


Figura 11

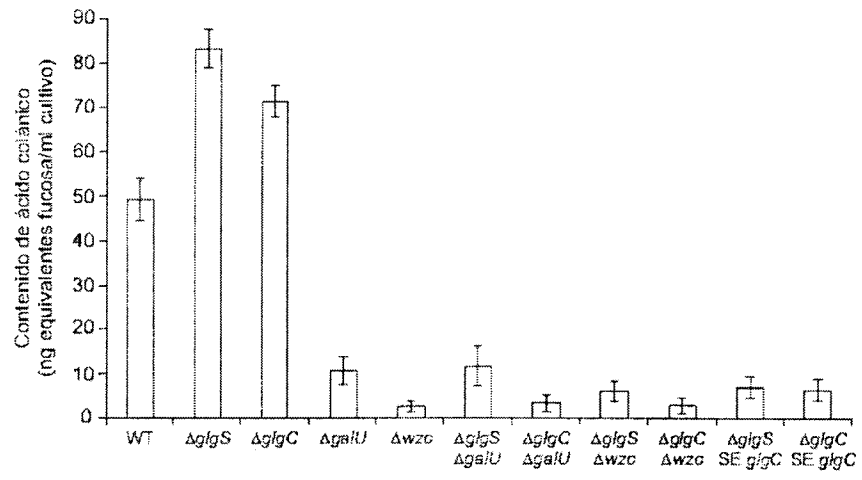


Figura 12

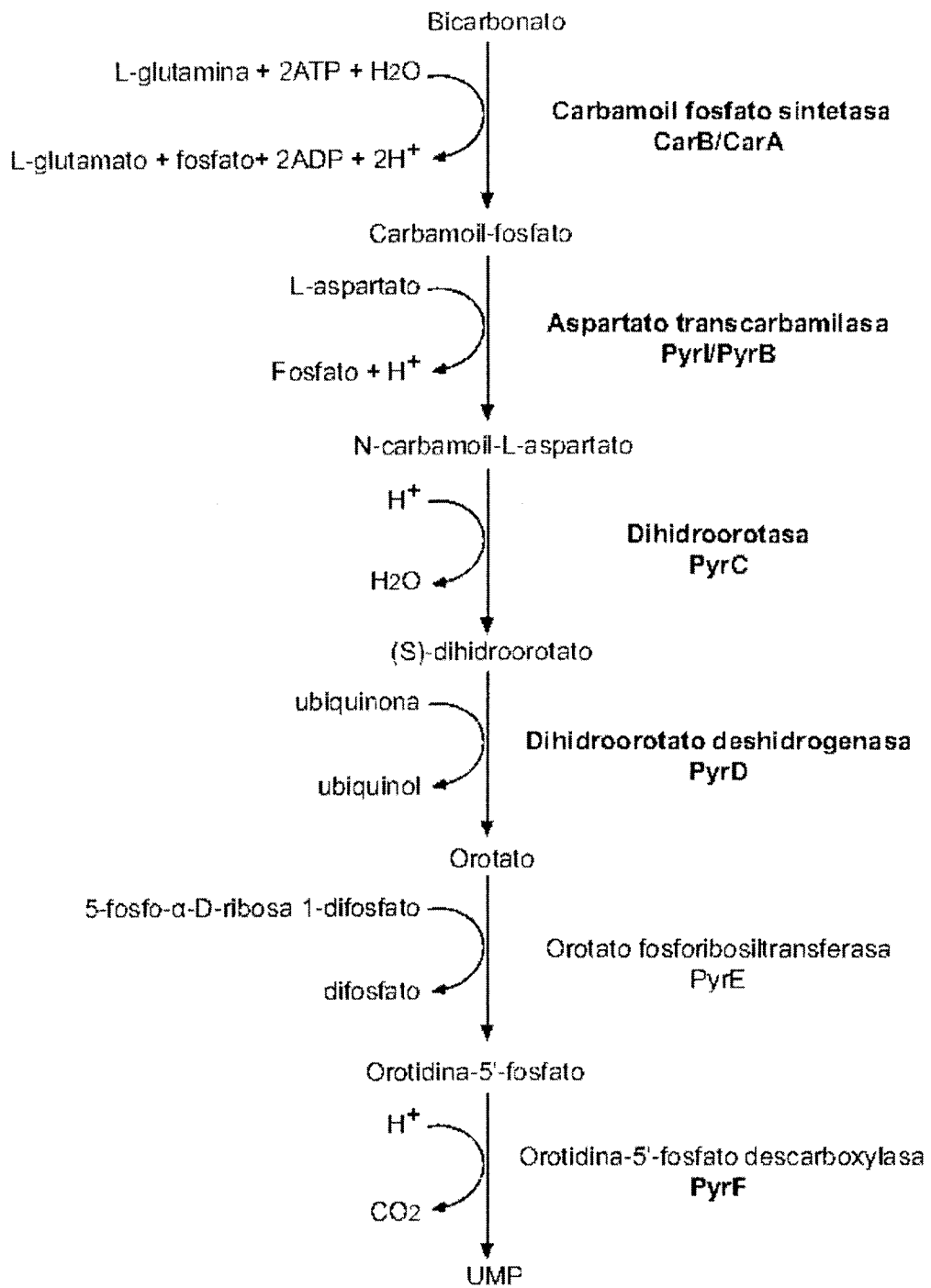
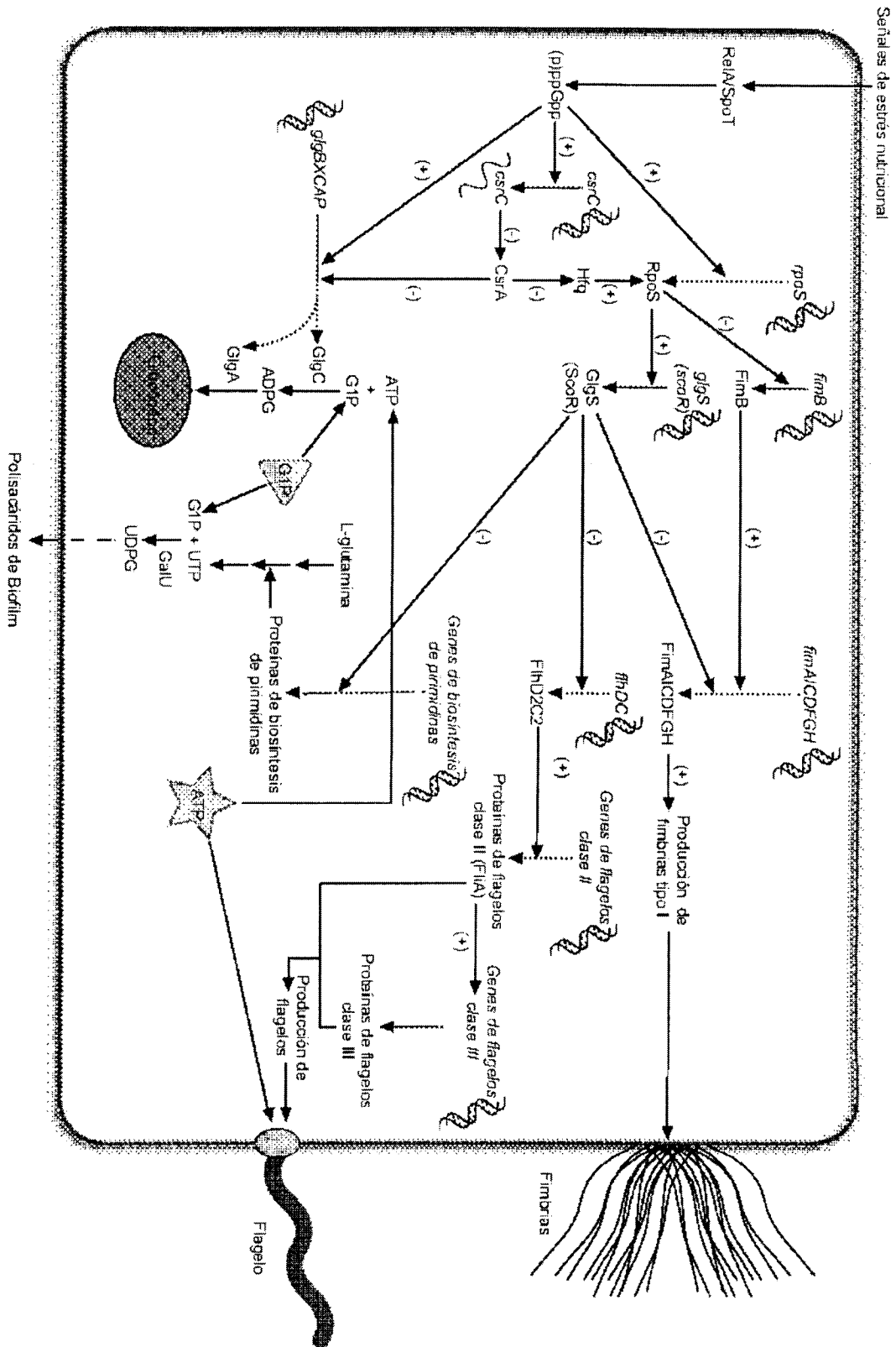


Figura 13



# ES 2 483 116 A2

## SEQUENCE LISTING

<110> Consejo Superior de Investigaciones Cientificas  
Universidad Publica de Navarra

<120> Compuestos utiles para el tratamiento de infecciones bacterianas,  
composiciones farmaceuticas que los contienen, procedimiento de identificacion  
de los mismos y sus aplicaciones

<130> Pozueta\_Seq

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1296

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

```
atggttagtt tagagaagaa cgatcactta atgttggcgc gccagctgcc attgaaatct      60
gttgccctga tactggcggg aggacgtggt acccgctga aggatttaac caataagcga      120
gcaaaaccgg ccgtacactt cggcggtaag ttccgcatta tcgactttgc gctgtctaac      180
tgcatacaact ccgggatccg tcgtatgggc gtgatcacc agtaccagtc ccacactctg      240
gtgcagcaca tccagcgcgg ctggtcattc ttcaatgaag aatgaacga gtttgtcgat      300
ctgctgccag cacagcagag aatgaaagg gaaaactggt atcgcggcac cgcagatgcg      360
gtcacccaaa acctcgacat tatccgccgt tataaagcgg aatacgtggt gatcctggcg      420
ggcgaccata tctacaagca agactactcg cgtatgctta tcgaccacgt cgaaaaaggc      480
gcacgttgca ccgttgcttg tatgccagta ccgattgaag aagcctccgc gtttggcggt      540
atggcggttg atgagaacga taaaattatc gaattcgttg aaaaaccagc taaccgccg      600
tcaatgccga acgatccgag caaatctctg gcgagtatgg gtatttacgt ctttgacgcc      660
gactatctgt atgaactgct ggaagaagac gatcgcgatg agaactccag ccacgacttt      720
ggcaaagatt tgattcccaa gatcaccgaa gccggtctgg cctatgcgca cccgttcccg      780
ctctcttgcg tacaatccga cccggatgcc gagccgtact ggcgcatgt gggtagcgtg      840
gaagcttact ggaaagcga cctcgcgatc gcctctgtgg tgccggaact ggatatgtac      900
gatcgcgaatt ggccaattcg cacctacaat gaatcattac cgccagcga attcgtgcag      960
gatcgcctcc gtagccacgg gatgaccctt aactcactgg tatccggcgg ttgtgtgatc     1020
tccggttcgg tggtggtgca gtccgttctg ttctcgcgcg ttcgcgtgaa ttcattctgc     1080
aacattgatt ccgccgtatt gttaccggaa gtatgggtag gtcgctcgtg ccgtctgcgc     1140
cgctgcgtca tcgatcgtgc ttgtgttatt ccggaaggca tgggtgattgg tgaaaacgca     1200
gaggaagatg cacgtcgttt ctatcgttca gaagaaggca tcgtgctggt aacgcgcgaa     1260
atgctacgga agttagggca taaacaggag cgataa                                  1296
```

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> Escherichia coli

ES 2 483 116 A2

<400> 2

Met Val Ser Leu Glu Lys Asn Asp His Leu Met Leu Ala Arg Gln Leu  
1 5 10 15

Pro Leu Lys Ser Val Ala Leu Ile Leu Ala Gly Gly Arg Gly Thr Arg  
20 25 30

Leu Lys Asp Leu Thr Asn Lys Arg Ala Lys Pro Ala Val His Phe Gly  
35 40 45

Gly Lys Phe Arg Ile Ile Asp Phe Ala Leu Ser Asn Cys Ile Asn Ser  
50 55 60

Gly Ile Arg Arg Met Gly Val Ile Thr Gln Tyr Gln Ser His Thr Leu  
65 70 75 80

Val Gln His Ile Gln Arg Gly Trp Ser Phe Phe Asn Glu Glu Met Asn  
85 90 95

Glu Phe Val Asp Leu Leu Pro Ala Gln Gln Arg Met Lys Gly Glu Asn  
100 105 110

Trp Tyr Arg Gly Thr Ala Asp Ala Val Thr Gln Asn Leu Asp Ile Ile  
115 120 125

Arg Arg Tyr Lys Ala Glu Tyr Val Val Ile Leu Ala Gly Asp His Ile  
130 135 140

Tyr Lys Gln Asp Tyr Ser Arg Met Leu Ile Asp His Val Glu Lys Gly  
145 150 155 160

Ala Arg Cys Thr Val Ala Cys Met Pro Val Pro Ile Glu Glu Ala Ser  
165 170 175

Ala Phe Gly Val Met Ala Val Asp Glu Asn Asp Lys Ile Ile Glu Phe  
180 185 190

Val Glu Lys Pro Ala Asn Pro Pro Ser Met Pro Asn Asp Pro Ser Lys  
195 200 205

Ser Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Asp Ala Asp Tyr Leu Tyr  
210 215 220

Glu Leu Leu Glu Glu Asp Asp Arg Asp Glu Asn Ser Ser His Asp Phe  
225 230 235 240

Gly Lys Asp Leu Ile Pro Lys Ile Thr Glu Ala Gly Leu Ala Tyr Ala  
245 250 255

His Pro Phe Pro Leu Ser Cys Val Gln Ser Asp Pro Asp Ala Glu Pro  
260 265 270



ES 2 483 116 A2

Tyr Trp Arg Asp Val Gly Thr Leu Glu Ala Tyr Trp Lys Ala Asn Leu  
 275 280 285

Asp Leu Ala Ser Val Val Pro Glu Leu Asp Met Tyr Asp Arg Asn Trp  
 290 295 300

Pro Ile Arg Thr Tyr Asn Glu Ser Leu Pro Pro Ala Lys Phe Val Gln  
 305 310 315 320

Asp Arg Ser Gly Ser His Gly Met Thr Leu Asn Ser Leu Val Ser Gly  
 325 330 335

Gly Cys Val Ile Ser Gly Ser Val Val Val Gln Ser Val Leu Phe Ser  
 340 345 350

Arg Val Arg Val Asn Ser Phe Cys Asn Ile Asp Ser Ala Val Leu Leu  
 355 360 365

Pro Glu Val Trp Val Gly Arg Ser Cys Arg Leu Arg Arg Cys Val Ile  
 370 375 380

Asp Arg Ala Cys Val Ile Pro Glu Gly Met Val Ile Gly Glu Asn Ala  
 385 390 395 400

Glu Glu Asp Ala Arg Arg Phe Tyr Arg Ser Glu Glu Gly Ile Val Leu  
 405 410 415

Val Thr Arg Glu Met Leu Arg Lys Leu Gly His Lys Gln Glu Arg  
 420 425 430

<210> 3  
 <211> 201  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 3  
 atggatcata gtcttaattc tttaaataat ttcgatttcc tggcgcgtag ttttgccaga 60  
 atgcacgcag aaggtcgccc ggtcgaatatt ctggccggtta ctggtaacat ggatgaagaa 120  
 catagaacct ggttttgcgc acgttatgcc tggatttgtc aacagatgat gcaggcaaga 180  
 gagctggagt tagagcactg a 201

<210> 4  
 <211> 66  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 4  
 Met Asp His Ser Leu Asn Ser Leu Asn Asn Phe Asp Phe Leu Ala Arg  
 1 5 10 15

Ser Phe Ala Arg Met His Ala Glu Gly Arg Pro Val Asp Ile Leu Ala  
 20 25 30

ES 2 483 116 A2

Val Thr Gly Asn Met Asp Glu Glu His Arg Thr Trp Phe Cys Ala Arg  
 35 40 45

Tyr Ala Trp Tyr Cys Gln Gln Met Met Gln Ala Arg Glu Leu Glu Leu  
 50 55 60

Glu His  
 65

<210> 5  
 <211> 1563  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5  
 atggcgtctg tatctgcaat tggagttctc aaggtacctc ctgcttcgac ttccaattcc 60  
 accggaaaag ccacggaggc ggttcccacg aggactcttt ctttctcctc ctctgttact 120  
 tcatccgacg acaagatttc actcaaatcc accgtctccc gtctttgtaa atctgttggt 180  
 cgcaggaatc cgatcatcgt ctctcccaa gccgtctcag attctcaaaa ctctcaaact 240  
 tgtctcgatc ctgatgctag cagcagtgtt ttggggataa tcttaggagg tggagctgga 300  
 actcgtcttt atccacttac gaagaagaga gcgaaaccag ctgtgcctct tgggtgctaac 360  
 tataggctta ttgatattcc tgtgagcaac tgtttgaata gcaacatatc caagatctat 420  
 gttcttactc agttcaattc cgcgtctttg aatcgtcatc tttcacgagc ttatgctagt 480  
 aacatgggag gttataagaa tgaaggattc gttgaagttc tcgctgctca acagagtcct 540  
 gaaaaccca actggttcca ggggacagct gatgccgtca ggcaataactt gtggttgttc 600  
 gaggagcata atgtcttggg gtatctcatt cttgctgggg atcatttgta tagaatggac 660  
 tatgagaagt ttattcaagc acataggagg actgatgctg atatcacagt agctgcatta 720  
 ccaatggacg agcaacgagc cactgctttt gggctgatga agattgatga ggaaggacgt 780  
 attattgaat ttgctgaaaa accaaaaggg gagcacctaa aggccatgaa ggttgacaca 840  
 acaattctag gtcttgatga tcagagagcc aaggagatgc ctttcattgc tagtatgggt 900  
 atttatgttg taagcagaga tgtaatgcta gacttactac ggaatcagtt tcctggagct 960  
 aatgactttg gaagtgaagt cattccccgg gccacttccc ttggactgag ggtgcaagct 1020  
 tacctatatg atggttactg ggaagacatt ggtactatag aggcatttta taacgctaata 1080  
 cttggaatca ccaagaaacc agttcctgat tttagtttct atgaccgttc tgctccgatc 1140  
 tacacacagc cgcgttattt accaccgtct aagatgcttg atgctgatgt tactgacagt 1200  
 gtcacgagc agggtgtgt tatcaagaac tgcaaaattc atcactctgt ggttgactc 1260  
 cgttctgca tatcagaagg tgctattatt gaagattcgt tattaatggg agctgattat 1320  
 tacgagactg ctacggaaaa gagcctctta agcgcgaaag gaagtgtacc cataggtatt 1380  
 gggaaaaact cgcacatcaa aagggccatc atcgacaaaa acgcacgtat cggtgacaat 1440  
 gtcaagatca taaacagcga caacgtgcaa gaggcagcga gagagactga tggatatttc 1500  
 ataaagagcg gaattgtaac ggttatcaaa gacgccttaa tccaaccgg cactgtcatc 1560

ES 2 483 116 A2

tga

1563

<210> 6  
 <211> 520  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Ser Val Ser Ala Ile Gly Val Leu Lys Val Pro Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Thr Ser Asn Ser Thr Gly Lys Ala Thr Glu Ala Val Pro Thr Arg Thr  
 20 25 30

Leu Ser Phe Ser Ser Ser Val Thr Ser Ser Asp Asp Lys Ile Ser Leu  
 35 40 45

Lys Ser Thr Val Ser Arg Leu Cys Lys Ser Val Val Arg Arg Asn Pro  
 50 55 60

Ile Ile Val Ser Pro Lys Ala Val Ser Asp Ser Gln Asn Ser Gln Thr  
 65 70 75 80

Cys Leu Asp Pro Asp Ala Ser Ser Ser Val Leu Gly Ile Ile Leu Gly  
 85 90 95

Gly Gly Ala Gly Thr Arg Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Lys Arg Ala Lys  
 100 105 110

Pro Ala Val Pro Leu Gly Ala Asn Tyr Arg Leu Ile Asp Ile Pro Val  
 115 120 125

Ser Asn Cys Leu Asn Ser Asn Ile Ser Lys Ile Tyr Val Leu Thr Gln  
 130 135 140

Phe Asn Ser Ala Ser Leu Asn Arg His Leu Ser Arg Ala Tyr Ala Ser  
 145 150 155 160

Asn Met Gly Gly Tyr Lys Asn Glu Gly Phe Val Glu Val Leu Ala Ala  
 165 170 175

Gln Gln Ser Pro Glu Asn Pro Asn Trp Phe Gln Gly Thr Ala Asp Ala  
 180 185 190

Val Arg Gln Tyr Leu Trp Leu Phe Glu Glu His Asn Val Leu Glu Tyr  
 195 200 205

Leu Ile Leu Ala Gly Asp His Leu Tyr Arg Met Asp Tyr Glu Lys Phe  
 210 215 220

Ile Gln Ala His Arg Glu Thr Asp Ala Asp Ile Thr Val Ala Ala Leu  
 225 230 235 240

ES 2 483 116 A2

Pro Met Asp Glu Gln Arg Ala Thr Ala Phe Gly Leu Met Lys Ile Asp  
 245 250 255

Glu Glu Gly Arg Ile Ile Glu Phe Ala Glu Lys Pro Lys Gly Glu His  
 260 265 270

Leu Lys Ala Met Lys Val Asp Thr Thr Ile Leu Gly Leu Asp Asp Gln  
 275 280 285

Arg Ala Lys Glu Met Pro Phe Ile Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Val  
 290 295 300

Ser Arg Asp Val Met Leu Asp Leu Leu Arg Asn Gln Phe Pro Gly Ala  
 305 310 315 320

Asn Asp Phe Gly Ser Glu Val Ile Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Leu  
 325 330 335

Arg Val Gln Ala Tyr Leu Tyr Asp Gly Tyr Trp Glu Asp Ile Gly Thr  
 340 345 350

Ile Glu Ala Phe Tyr Asn Ala Asn Leu Gly Ile Thr Lys Lys Pro Val  
 355 360 365

Pro Asp Phe Ser Phe Tyr Asp Arg Ser Ala Pro Ile Tyr Thr Gln Pro  
 370 375 380

Arg Tyr Leu Pro Pro Ser Lys Met Leu Asp Ala Asp Val Thr Asp Ser  
 385 390 395 400

Val Ile Gly Glu Gly Cys Val Ile Lys Asn Cys Lys Ile His His Ser  
 405 410 415

Val Val Gly Leu Arg Ser Cys Ile Ser Glu Gly Ala Ile Ile Glu Asp  
 420 425 430

Ser Leu Leu Met Gly Ala Asp Tyr Tyr Glu Thr Ala Thr Glu Lys Ser  
 435 440 445

Leu Leu Ser Ala Lys Gly Ser Val Pro Ile Gly Ile Gly Lys Asn Ser  
 450 455 460

His Ile Lys Arg Ala Ile Ile Asp Lys Asn Ala Arg Ile Gly Asp Asn  
 465 470 475 480

Val Lys Ile Ile Asn Ser Asp Asn Val Gln Glu Ala Ala Arg Glu Thr  
 485 490 495

Asp Gly Tyr Phe Ile Lys Ser Gly Ile Val Thr Val Ile Lys Asp Ala  
 500 505 510

Leu Ile Pro Thr Gly Thr Val Ile

515

520