

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de julio de 2014 (03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/102432 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070925

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de diciembre de 2013 (24.12.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201232017
24 de diciembre de 2012 (24.12.2012) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **POZUETA ROMERO, Javier**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES). **BAROJA FERNÁNDEZ, Edurne**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES). **MUÑOZ PÉREZ, Francisco José**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES). **RAHIMPOUR, Mehdi**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES). **MONTERO MACARRO, Manuel**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES). **ALMAGRO ZABALZA, Goizeder**; Instituto de Agrobiotecnología (IDAB), Avenida de Pamplona, 123, MUTILVA, E-31192 Aranguren (Navarra) (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: COMPOUNDS USED FOR THE TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAID COMPOUNDS, METHOD FOR IDENTIFYING SAME AND USES THEREOF

(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) Abstract: The invention relates to a series of compounds used to reduce or eliminate processes determining bacterial virulence and pathogenicity and bacterial adhesion to inert surfaces or cells, such as the production of adhesins, flagellar motility and the formation of bacterial biofilms and exopolysaccharides. Said compounds can be used for the production of antibacterial pharmaceutical compositions or antiseptic compositions for the treatment of a wide range of bacterial infections, such as, for example, *E. coli*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *L. monocytogenes*, *C. difficile* and *S. pyogenes*. The invention also relates to a series of compounds that promote the bond between beneficial rhizobacteria and cells of plant roots. Furthermore, the invention relates to a method for the identification of said compounds.

(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*. También describe una serie de compuestos que favorecen la unión entre rizobacterias beneficiosas y células de las raíces de las plantas. Además, se describe un procedimiento para la identificación de dichos compuestos.

WO 2014/102432 A1

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

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

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 y agroalimentario. 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

El glucógeno es un homopolisacárido altamente ramificado formado por unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y α -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

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 ADPglucose 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) ¹H, ¹⁵N and ¹³C 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) ¹H, ¹⁵N and ¹³C 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^{2+} 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

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, GlgA 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.

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.

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).

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.

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).

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

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.

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.

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.

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.

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.

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 biofilmes 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 $\Delta g/gS$ 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 g/gS (Ejemplo 1.3, Ejemplo 1.4 y Ejemplo 1.6). Además, en esta invención se muestra que la expresión
5 ectópica de g/gS y de g/gC 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 g/gS 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
10 células $\Delta g/gS$ (Ejemplo 1.5). Estos resultados indicaron que el déficit de glucógeno en las células $\Delta g/gS$ 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 $\Delta g/gC$ carentes de glucógeno presentan fenotipos de “elevada motilidad” (Ejemplo
15 1.5), “elevado contenido de biofilm” (Ejemplo 1.6) y “elevado contenido de EPSs” (Ejemplo 1.6), mientras que las células $\Delta g/gS\Delta flhC$, de motilidad baja, acumulan más glucógeno que las células $\Delta g/gS$ (Ejemplo 1.5). Por otra parte, en esta invención se muestra que la expresión ectópica de g/gC (Ejemplo 1.7) revierte los fenotipos “bajo glucógeno”, “elevada motilidad”, “elevado contenido de biofilm” y “elevado contenido de EPSs” de las células
20 $\Delta g/gS$ (Ejemplo 1.5 y Ejemplo 1.6). Es más, se muestra que un incremento de la expresión de g/gC 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 g/gS ejerce un efecto negativo en procesos de propulsión flagelar y de síntesis de EPSs de biofilmes que compiten con GlgC por el mismo pool de ATP y de G1P, en esta invención se
25 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 biofilmes 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
30 (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 biofilmes 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
35 bacterianos g/gS y g/gC 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.

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).

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.

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.

5 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.

10 Otra realización particular de la invención lo constituye el compuesto inhibidor de la invención donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia *agg* 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).

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

20 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.

25 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).

30 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 mamíferos, preferentemente humanos, o a la presencia de bacterias en distintos materiales, superficies o equipos asépticos.

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
- b) Gram positivas, preferentemente, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, y más preferentemente, *L. monocytogenes*, *C. difficile* y *S. pyogenes*.

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.

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.

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. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

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.

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).

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.

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.

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).

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.

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.

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, gliceraldehído 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).

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.

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 β -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 β -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 fosfotungstico al 2%. Las barras en los paneles superiores e inferiores son de 2 y 0.5 μ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta flhC$, $\Delta glgS\Delta fliA$ 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 $\Delta glgS\Delta fliA$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta flhC$, $\Delta glgS\Delta fimA$, $\Delta glgS\Delta wzc$ y $\Delta glgS$ 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 $\pm$ 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 $\Delta glgS$.

Figura 7.- Contenido de glucógeno y motilidad tipo “swarming” en bacterias

$\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta purM$ y $\Delta glgS\Delta purL$. (A) Contenido de glucógeno y (B) motilidad tipo “swarming” de células silvestres (WT) de *E. coli* BW25113, $\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta purM$ y $\Delta glgS\Delta purL$. 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 $\Delta glgS$. Los resultados en “A” son la media $\pm$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta flhC$, $\Delta glgS\Delta flhA$, $\Delta glgA$, $\Delta glgC$, células WT que sobre-expresan *glgC* y células $\Delta glgS$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgS\Delta flhC$, $\Delta glgS\Delta flhA$, $\Delta glgA$, $\Delta glgC$, células WT que sobre-expresan *glgC*, y células $\Delta glgS$ que sobre-expresan (SE) *glgC*. **(B)** Motilidad tipo “swarming” de células WT de *E. coli* BW25113, $\Delta glgS$, $\Delta glgA$, $\Delta glgC$, y células $\Delta glgS$ 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 $\pm$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgA$, $\Delta glgC$, células WT que sobre-expresan *glgC*, células $\Delta glgS$ que sobre-expresan *glgC*, $\Delta glgS\Delta purL$, $\Delta glgC\Delta galU$ y $\Delta glgS\Delta galU$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgA$, $\Delta glgC$, células WT que sobre-expresan (SE) *glgC*, células $\Delta glgS$ que sobre-expresan *glgC*, $\Delta glgS\Delta purL$, $\Delta glgC\Delta galU$ y $\Delta glgS\Delta galU$. **(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 $\Delta glgC$ y $\Delta glgS$ demostrando así que el alto contenido de biofilm de las células deficientes en glucógeno $\Delta glgS$ y las células carentes de glucógeno $\Delta glgC$ 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 $\pm$ 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, $\Delta glgS$, $\Delta glgC$, $\Delta galU$, Δwzc , $\Delta glgS\Delta galU$, $\Delta glgC\Delta galU$, $\Delta glgS\Delta wzc$,

$\Delta glgC \Delta wzc$, células $\Delta glgS$ que sobre-expresan $glgC$, células $\Delta glgC$ 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 $\Delta glgS$.

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.

Figura 14: Efecto del ión Mg^{2+} sobre el contenido de biofilm y la motilidad tipo “swarming” en células silvestres (WT) de *E. coli* W. (A) Contenido de biofilm en el control, en medio de cultivo preparado con agua corriente y en medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes (5-100 mM) de $MgCl_2$ (barras grises) o $MgSO_4$ (barras rayadas). Los resultados son la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes. (B) Motilidad tipo “swarming” en condiciones control y en medio de cultivo suplementado con 20 mM de $MgCl_2$ o 20 mM de $MgSO_4$. El frente de crecimiento del cultivo en cada condición está señalada con puntos discontinuos. El control se refiere a un medio de cultivo sin suplementar.

Figura 15: Efecto del EDTA, PLP, DTT y DTE sobre el crecimiento, contenido de biofilm y la motilidad tipo “swarming” en células silvestres (WT) de *E. coli* W. Crecimiento (A), contenido de biofilm (B) y motilidad tipo “swarming” (C, D y E) en el control y en medio de cultivo suplementado con 10 mM EDTA, 10 mM PLP, 10 mM DTT o 1 mM DTE. En (A) y (B) los resultados son la media $\pm$ ES de 5 experimentos independientes.

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).

- 5 **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> (http://www.genome.jp/) [KEGG entry]
OPERONES POLYCISTRONICOS		
operon <i>carAB</i>		
<i>carA</i>	1.63	Carbamoyl-phosphate synthetase, glutamine [b0032]
<i>carB</i>	1.77	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit [b0033]
operon <i>codBA</i>		
<i>codB</i>	1.54	Cytosine permease/transport [b0336]
<i>codA</i>	2.14	Cytosine deaminase [b0337]
operon <i>cusCFBA</i>		
<i>cusC</i>	33.35	Probable outer membrane lipoprotein cusC 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 cusA [c_0661]
operon <i>cusRS</i>		
<i>cusR</i>	6.64	Putative 2-component transcriptional regulator [b0571]
<i>cusS</i>	5.18	Putative 2-component sensor protein [b0570]
operon <i>cvpA-purF</i>		
<i>cvpA</i>	1.59	Membrane protein required for colicin V production [b2313]
<i>purF</i>	1.55	Amidophosphoribosyltransferase, purine synthesis [b2312]
operon <i>fimAICDFGH</i>		
<i>fimA</i>	2.83	Major type 1 subunit fimbrin [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]
operon <i>flgAMN</i>		
<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]
operon <i>flgBCDEFGHIJ</i>		
<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]
operon <i>flgKL</i>		
<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]
operon <i>flhBAE</i>		
<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]
operon <i>flhDC</i>		
<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]
operon <i>fliAZY</i>		
<i>fliA</i>	6.07	Flagellar biosynthesis; alternative sigma factor 28 [b1922]
<i>fliZ</i>	2.67	Orf, hypothetical protein [b1921]
operon <i>fliDST</i>		
<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]
operon <i>fliFGHIJK</i>		
<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]
operon <i>fliLMNOPQR</i>		
<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]
<i>insJK</i>		
<i>insJ</i>	4.29	IS150 hypothetical protein [b3557]
<i>insK</i>	2.30	IS150 putative transposase [b3558]
operon <i>motAB-cheAW</i>		
<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]
operon <i>cheRBYZ</i>		
<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]
operon <i>purHD</i>		
<i>purH</i>	1.55	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; purine synthesis [b4006]
<i>purD</i>	1.50	Phosphoribosylamine-glycine ligase, purine synthesis [b4005]
operon <i>purMN</i>		
<i>purM</i>	1.56	Phosphoribosyl-aminoimidazole (AIR) synthase [b2499]
<i>purN</i>	1.55	Glycinamide ribonucleotide transformylase (GART) 1, purine synthesis [b2500]
operon <i>pyrLBI</i>		
<i>pyrB</i>	2.30	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit [b4245]
<i>pyrI</i>	1.86	Aspartate carbamoyltransferase, regulatory subunit [b4244]
<i>PyrF-yciH</i>		
<i>pyr F</i>	1.52	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase; OMP decarboxylase [b1281]
<i>yciH</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b1282]
<i>YjdA-ycjZ</i>		
<i>yjdA</i>	2.49	Putative vimentin [b4109]
<i>ycjZ</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b4110]

OPERONES MONOCISTRONICOS

<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	Dihydroorotase, 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 receptor [b4355]
<i>upp</i>	1.58	Uracil phosphoribosyltransferase [b2498]
<i>ycgR</i>	4.29	Orf, hypothetical protein [b1194]
<i>yciH</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b1282]
<i>yecR</i>	1.66	Orf, hypothetical protein [b1904]
<i>yedW</i>	1.62	Putative 2-component transcriptional regulator [b1969]
<i>yhjH</i>	1.72	Orf, hypothetical protein [b3525]
<i>yjcZ</i>	1.51	Orf, hypothetical protein [b4110]
<i>yjdA</i>	2.49	Putative vimentin [b4109]
<i>yjgF</i>	1.73	Protein YjgF [c_5342]
<i>ylcB</i>	4.56	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> (http://www.genome.jp/) [KEGG entry]
OPERONES		
POLICISTRONICOS		
operon <i>cysPUWAA</i>		
<i>cysP</i>	-1.55	Thiosulfate-binding protein precursor [c_2959]
<i>cysW</i>	-1.59	Sulfate transport system permease W protein [b2423]
operon <i>trpLEDCBA</i>		
<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]
<i>rpoE-rseABC</i>		
<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]
<i>yqjCDEK</i>		
<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]
OPERONES		
MONOCISTRONICOS		
<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>lrrA</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 *fimA/CDFGH* mostraba mayores niveles de expresión en células Δ 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 quimiotaxis (*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 Δ glgS que en células WT (Tabla 1). En conjunto estos genes suponen casi el 60% de los genes cuya expresión es superior en células Δ glgS que en células WT. Análisis de la expresión de fusiones transcripcionales cromosómicas *lacZY* en células WT y Δ 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 Δ 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 Δ 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., Augustine, 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; Bahranin-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, 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 [Kalir, 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*.

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 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 Δ *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).

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 Δ *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 Δ *glgS*. También se midió la formación de biofilm en células Δ *glgS* Δ *flhC*, Δ *glgS* Δ *fimA* y Δ *glgS* Δ *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 la expresión 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.

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

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> (http://www.genome.jp)
<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 α -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>purI</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthetase
<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
<i>serA</i>	α -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
<i>yqiK</i>	PHB family inner membrane protein, function unknown

Tabla 4: Genes cuya delección conlleva a una reducción de los niveles de glucógeno en células Δ glgS

Gene	Function in <i>E. coli</i> (http://www.genome.jp)
<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- α -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- α -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>ycdQ</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; 5 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 Mg²⁺ concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. Biochem. J. 424, 129-141] la pérdida de las funciones codificadas por 10 *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, 2nd 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.; Prüß, 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 hipermóviles BW25113 $\Delta glgS$. Además, se comparó los niveles de glucógeno de las células hipermóviles $\Delta glgS$ con los niveles de las células de baja motilidad $\Delta glgS\Delta fliH$ 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 la células silvestres y $\Delta glgS$ respectivamente (Figura 8A). Además, el contenido de glucógeno de las células de baja motilidad $\Delta glgS\Delta fliH$ y $\Delta glgS\Delta fliA$ fue mayor que el presentado por las células hipermóviles $\Delta glgS$ (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 hipermóviles 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 hipermóvil 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 Δwzc 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 Δwzc 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.

Alternativamente, es posible que la deficiencia de glucógeno promueva indirectamente el fenotipo de alto biofilm de las células $\Delta glgS$ y $\Delta glgC$. Para comprobar esta hipótesis analizamos el contenido de biofilm en células carentes de glucógeno $\Delta glgA$ las cuales conservan la GlgC consumidora de G1P. Como se muestra en la **Figura 9** las células $\Delta glgA$ acumulan casi el mismo biofilm que la cepa silvestre. Este resultado es consistente con los obtenidos por Niba et al. (2007) quienes tampoco observaron una reducción de biofilm en células $\Delta glgA$ y difieren de los resultados obtenidos en un estudio anterior (Jackson et al. 2002) en el cual los autores proponen que el glucógeno sirve como fuente de carbono y energía para la formación de biofilm en *Enterobacteriaceae*. De acuerdo a Jackson et al. (2002), la biosíntesis de glucógeno y su posterior formación de G1P GlgP-dependiente, son absolutamente necesarias para la formación de biofilm dado que (a) células $\Delta glgA$ carentes de glucógeno presentan un fenotipo “bajo biofilm”, y (b) células que expresan ectópicamente *glgA* y *glgP* presentan un fenotipo “alto biofilm”. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 8**, células $\Delta glgC$ carentes de glucógeno muestran un fenotipo “alto biofilm”, descartando la posibilidad de que los productos de la degradación de glucógeno (G1P producida por GlgP) sean necesarios para la formación de biofilm.

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 biofilmes 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 biofilmes 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.

Ejemplo 2.- Reducción de la producción de biofilm y de la motilidad mediante sustancias que incrementan la actividad GlgC

2.1.- Ión Mg^{2+}

El Mg^{2+} es el catión divalente más abundante en las células vivas, siendo un factor estabilizador de membranas, tRNA, ribosomas, etc., que además determina fuertemente el estado metabólico y energético de las células [Smith, R. L. and Maguire, M. E. (1998) Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. Mol. Microbiol. 28, 217-226]. Además, el Mg^{2+} ha sido descrito como un importante determinante de la acumulación de glucógeno debido al impacto que éste tiene en los niveles intracelulares de

Mg²⁺ unido a ATP necesario para la actividad GlgC [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 Mg²⁺ concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. Biochem. J. 424, 129-141]. El incremento de la actividad GlgC inducida por Mg²⁺ conllevaría por tanto a una reducción de G1P necesaria para la producción de EPSs necesarios para la formación de biofilm y una menor disponibilidad de ATP para la motilidad bacteriana. Para explorar esta hipótesis, se midió la producción de biofilm en células silvestres (*E. coli* W) suplementando el medio de cultivo con concentraciones crecientes (5-100 mM) de MgCl₂. Como se muestra en la **Figura 14A**, el MgCl₂ ejerce un efecto negativo en la producción de biofilm en *E. coli*, reduciéndose hasta un 80% al suplementar el medio de cultivo con concentraciones de MgCl₂ superiores a 25 mM. Además, la adición de MgCl₂ al medio de cultivo ejerce un efecto negativo en la motilidad de tipo “swarming” en *E. coli* (**Figura 14B**). Para comprobar que el efecto observado era debido al ión Mg²⁺ y no al ión Cl⁻ se midió la producción de biofilm en un medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes (5-100 mM) de MgSO₄. Además, se analizó la motilidad tipo “swarming” en un medio suplementado con 20 mM de MgSO₄. También se midió la producción de biofilm en un medio preparado con agua corriente, la cual contiene hipocloritos y sustancias necesarias para los tratamientos de potabilización, en lugar de agua desionizada, utilizada rutinariamente para la elaboración de los medio de cultivo. Tal y como se muestra en la **Figura 14A** el MgSO₄ tiene el mismo efecto tanto en la producción de biofilm como en la motilidad tipo “swarming” que el MgCl₂ y los niveles de biofilm en la preparación con agua corriente no varían respecto a los niveles en la preparación con agua desionizada. Por tanto, todos los datos indican que el ión Mg²⁺ tiene un efecto negativo tanto en la formación de biofilm como en la motilidad bacteriana.

2.2- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Durante el hambre de nutrientes las bacterias desencadenan la denominada respuesta estricta que cambia a las células de un estado de crecimiento a un estado de mantenimiento/supervivencia [Dennis, P.P., Ehrenberg, M., Bremer, H. (2004) Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. Microbiol Mol Biol R. 68, 639-668; Potrykus, K., Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: still magical? Annu Rev Microbiol. 62, 35–51]. Esta respuesta fisiológica se caracteriza por un incremento en los niveles intracelulares de la alarmona (p)ppGpp [Potrykus, K. and Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: still

magical? Annu Rev Microbiol. 62, 35–51]. Diferentes evidencias *in vivo* e *in vitro* han demostrado la relación entre la acumulación de ppGpp en *E. coli* y la estimulación tanto de la acumulación de glucógeno [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] como de la expresión del operón *glgBXCAP* [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]. Esta estimulación de la síntesis de glucógeno durante la respuesta estricta conllevaría a un mayor gasto de G1P y ATP por la GlgC y por tanto una menor disponibilidad de esas sustratos para la producción de EPSs y para la motilidad bacteriana. Para comprobar esta hipótesis simulamos un hambreado del ión Mg^{2+} añadiendo al medio de cultivo 10 mM del agente quelante EDTA y medimos tanto la producción de biofilm como la motilidad tipo “swarming” en células WT de *E. coli* W. En estas condiciones las bacterias crecieron normalmente (**Figura 15A**). Aunque trabajos previos han mostrado que la reducción del Mg^{2+} extracelular mediante la adición de 5 mM EDTA conlleva un incremento del biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* [Mulcahy, H., Lewenza, S. (2011) Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. PLoS One. 6, e23307], nuestros resultados mostraron que la adición de 10 mM EDTA claramente reduce la producción *de novo* de biofilm (**Figura 15B**). También se observa un efecto inhibitor del EDTA en la motilidad tipo “swarming” (**Figura 15C**). Este resultado es consistente con la idea de que la estimulación de la actividad GlgC durante la respuesta estricta tiene un efecto negativo en la producción de biofilm y en la motilidad. Hay que destacar que aunque se ha descrito que el EDTA causa una dispersión de los biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* previamente formados [Banin, E., Brady, K.M., Greenberg, E.P. (2006) Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. Appl. Environ. Microbiol.; 72, 2064–2069], la presente invención se caracteriza por evitar la aparición *de novo* de biofilm suplementando el medio de cultivo con EDTA.

2.3.- Piridoxal fosfato (PLP)

El piridoxal fosfato (PLP) es el cofactor orgánico más versátil en la biología y es utilizado por una gran variedad de enzimas en todos los organismos [Helmreich, E.J., Klein, H.W. (1980) The role of pyridoxal phosphate in the catalysis of glycogen

phosphorylases. *Angew Chem Int Ed Engl.* 19, 441–445; John, R.A. (1995) Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1248, 81–96; Jansonius, J.N. (1998) Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 759–769; Mehta, P.K., Christen, P. (2000) The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* 74, 129–184; Schneider, G., Kack, H., Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure Fold. Des.* 8, R1–R6; Christen, P., Mehta, P.K. (2001) From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.* 1, 436–447]. Además, el PLP es un activador secundario de GlgC de *E. coli* [Parsons, T.F., Preiss, J. (1978) Biosynthesis of bacterial glycogen. Isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose-protected pyridoxal-P binding site of *Escherichia coli* B ADP-glucose synthase. *J. Biol. Chem.* 253, 7638–7645; Preiss, J. (1996) ADPglucose pyrophosphorylase: Basic science and applications in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2, 259–279]. Para investigar si la estimulación de la actividad GlgC mediante la adición de PLP conllevaría a una reducción de G1P y ATP necesarios para la formación de biofilm y la motilidad bacteriana, se midió tanto la producción de biofilm como la motilidad tipo “swarming” de células silvestres de *E. coli W* en un medio de cultivo suplementado con 10 mM PLP. En estas condiciones las bacterias crecieron normalmente (**Figura 15A**). Como se muestra en las **Figuras 15B y D** el PLP provoca una reducción tanto en la producción de biofilm como en la motilidad tipo “swarming”. Este resultado sugiere que la estimulación de la actividad GlgC mediante la adición de un activador provoca una menor disponibilidad de G1P y ATP para la producción biofilm y la motilidad respectivamente.

2.4- Ditiotreititol (DTT) y ditioeritritol (DTE)

Diferentes trabajos han demostrado que las AGP están reguladas a nivel de su estado redox, siendo más activas en estado reducido [Hendriks, J.H.M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., Geigenberger, P. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol.* 133, 838–849; Michalska, J., Zaubert, H., Buchanan, B.B., Cejudo, F.J., Geigenberger, P. (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 106, 9908–9913; Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C. and Lloyd, J.R. (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 321–329; Geigenberger, P. (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating

environment. Plant Physiol. 155, 1566–1577]. La adición en el medio de cultivo de 10 mM ditiotreitól (DTT) o 1 mM ditioeritritól (DTE), ambos agentes muy reductores, provoca un descenso tanto en la producción de biofilm (**Figura 15B**) como en la motilidad tipo “swarming” (**Figura 15E**) en células silvestres (*E. coli* W). En estas condiciones las bacterias crecieron normalmente (**Figura 15A**). El resultado obtenido sugiere que la estimulación de la actividad GlgC (AGP bacteriana) como consecuencia del incremento de su estado reducido provoca una menor disponibilidad de G1P y ATP para la producción de biofilm y la motilidad respectivamente. Hay que destacar que aunque trabajos previos han mostrado que el DTT causa una disrupción del biofilm previamente formado en *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli* [Drago, L., Romanò, C.L., Mattina, R., Signori, V., De Vecchi, E. (2012) Does dithiothreitol improve bacterial detection from infected prostheses? A pilot study. Clin. Orthop. Relat. Res. 470, 2915-25], la presente invención se caracteriza por evitar la aparición *de novo* de biofilm mediante la adición de DTT en el medio de cultivo.

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.

Tabla 5: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta invención. Amp^R, ampicillin resistance; Km^R, kanamycin resistance; Cm^R, chloramphenicol resistance

Bacteria	Descripción	Fuente/referencia
W	ATCC 9637	Lee et al. (1997)
BW25113	<i>lacI^f rmB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	Keio collection (Baba et al. 2006)
Δ <i>glgS</i>	BW25113 Complete <i>glgS</i> replaced by a Km ^R cassette	Keio collection (Baba et al. 2006)
Δ <i>glgA</i>	BW25113 Complete <i>glgA</i> replaced by a Km ^R 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 ^R)	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</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>glgB::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>glgB::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>lrhA::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>lrhA::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fliA::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>fliA::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flhC::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>flhC::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>fimA::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>fimA::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>ycgR::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>ycgR::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>trpE::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>trpE::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>flgB::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>flgB::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	
Δ <i>glgS</i>	BW25113 fusión transcripcional <i>motA::lacZY</i> en	Este trabajo
<i>motA::lacZY</i>	Δ <i>glgS</i>	

Tabla 6:

Plásmido	Descripción	Fuente
pCP20	Plásmido que expresa la FLP recombinasa, Amp ^R , usado para eliminar cassettes Km ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKG137	Plásmido que incluye el gen <i>lacZY</i> y el casete Km ^R , usado para la construcción de fusiones transcripcionales	Montero et al. (2011)
pCA24Ng/gC	Plásmido usado para la sobre-expresión de <i>glgC</i> , Cm ^R	ASKA collection (Kitagawa et al. 2005)
pCA24Ng/gS	Plásmido usado para la sobre-expresión de <i>glgS</i> , Cm ^R	ASKA collection (Kitagawa et al. 2005)

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^R and Km^R 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 las 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% K₂HPO₄, 0.85% KH₂PO₄, 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^R and Km^R 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., Slauch, 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^R 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
5 previamente se encontraba localizado el casete de resistencia a kanamicina.

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

El crecimiento bacteriano fue seguido espectrofotométricamente midiendo la
10 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
15 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 yodina [Govons, S., Vinopal, R., Ingraham, J., Preiss, J. (1969) Isolation of mutants of *Escherichia coli* B altered in their
20 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
25 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
30 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.

Microarrays

Se crecieron los cultivos de células $\Delta g/gS$ 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
5 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 μ g 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
10 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 $\Delta g/gS$ y para la cepa silvestre. Las imágenes de los canales Cy3 e Hyper5
25 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 estandar 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 $\Delta g/gS$ 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⁺-fosfato (pH 7.0), 1 mM (NH₄)₂SO₄, 1mM MgSO₄, 0.3% Bacto agar (Difco), 20 µg ml⁻¹ de L-treonina, L-leucina, L-histidina, L-metionina y 1 µg ml⁻¹ 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 $\Delta glgS$

La generación de una colección de dobles mutantes $\Delta glgS$ 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 aquéllos

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. 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

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:

- una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno bacteriano fomentando el consumo de ATP y/o G1P intracelular, o una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, donde la proteína se selecciona 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, y donde la secuencia de nucleótidos se selecciona entre una secuencia *agp*, 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;
- un regulador alostérico o una sustancia capaz de activar a una proteína o péptido con actividad AGP, o la expresión de secuencias nucleotídicas codificantes para AGP o GlgS, 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 (Mg²⁺), NADH, NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2), fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2), 3-fosfoglicerato (3PGA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), piridoxal fosfato (PLP), ditiotreitól (DTT) y ditioeritritol (DTE).

2.- 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:

- 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;
- una secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona entre una secuencia *agp*, 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;
- 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, gliceraldehido 3-P, 2-fosfoglicerato, eritrosa-4-fosfato, fosfoenolpiruvato, fosfoketodeoxigluconato, magnesio (Mg²⁺), 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).

3.- Compuesto según la reivindicación 1 ó 2 para uso en la prevención y tratamiento de una contaminación bacteriana.

4.- Compuesto según la reivindicación 3 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.

5.- Uso del compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o para la limpieza antiséptica.

6.- Uso del compuesto según la reivindicación 5 caracterizado porque la bacteria pertenece 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. dysenteriae*, *Y. pestis*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*, *B. bacilliformis*, *N.gonorrhoeae*, *B. pertusis*; y

b) Gram positivas, preferentemente, *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*,
5 *Streptococcus*, *Actinomyces*, y más preferentemente, *L. monocytogenes*, *C. difficile* y *S. pyogenes*.

7.- Composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas o como
antiséptico caracterizada porque comprende al menos un compuesto según una cualquiera
10 de las reivindicaciones 1 a la 4 en cantidad farmacéuticamente efectiva junto con,
opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

8.- Composición farmacéutica según la reivindicación 7 caracterizada porque el compuesto
es una proteína que regula positivamente la ruta metabólica de producción de glucógeno
15 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.

9.- Composición farmacéutica según la reivindicación 7 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 *agp*, que codifica
25 para una proteína o péptido con actividad AGP, y que comprende SEQ ID NO 1 ó SEQ ID
NO5; o una secuencia *g/gS*, que codifica para una proteína o péptido GlgS, y comprende la
secuencia SEQ ID NO 3.

10.- Composición farmacéutica según la reivindicación 7 caracterizada porque el
compuesto inhibidor es un regulador alostérico capaz de activar a una proteína o péptido
30 con actividad AGP seleccionado del 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 (Mg²⁺), NADH,
NADPH, piridoxal-fosfato, ácido pirúvico, fructosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato (F1,6P2),
35 fructosa-2,6-bifosfato (F2,6P2) o 3-fosfoglicerato (3PGA).

11.- Uso de la composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 7 a la 10 para la limpieza antiséptica de entornos o materiales contaminados por bacterias.

5 12.- 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 13.- 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.

25 14.- Uso de un compuesto definido en la reivindicación 13 para favorecer la unión de rizobacterias beneficiosas a las raíces de las plantas.

1/15

FIGURAS

Figura 1

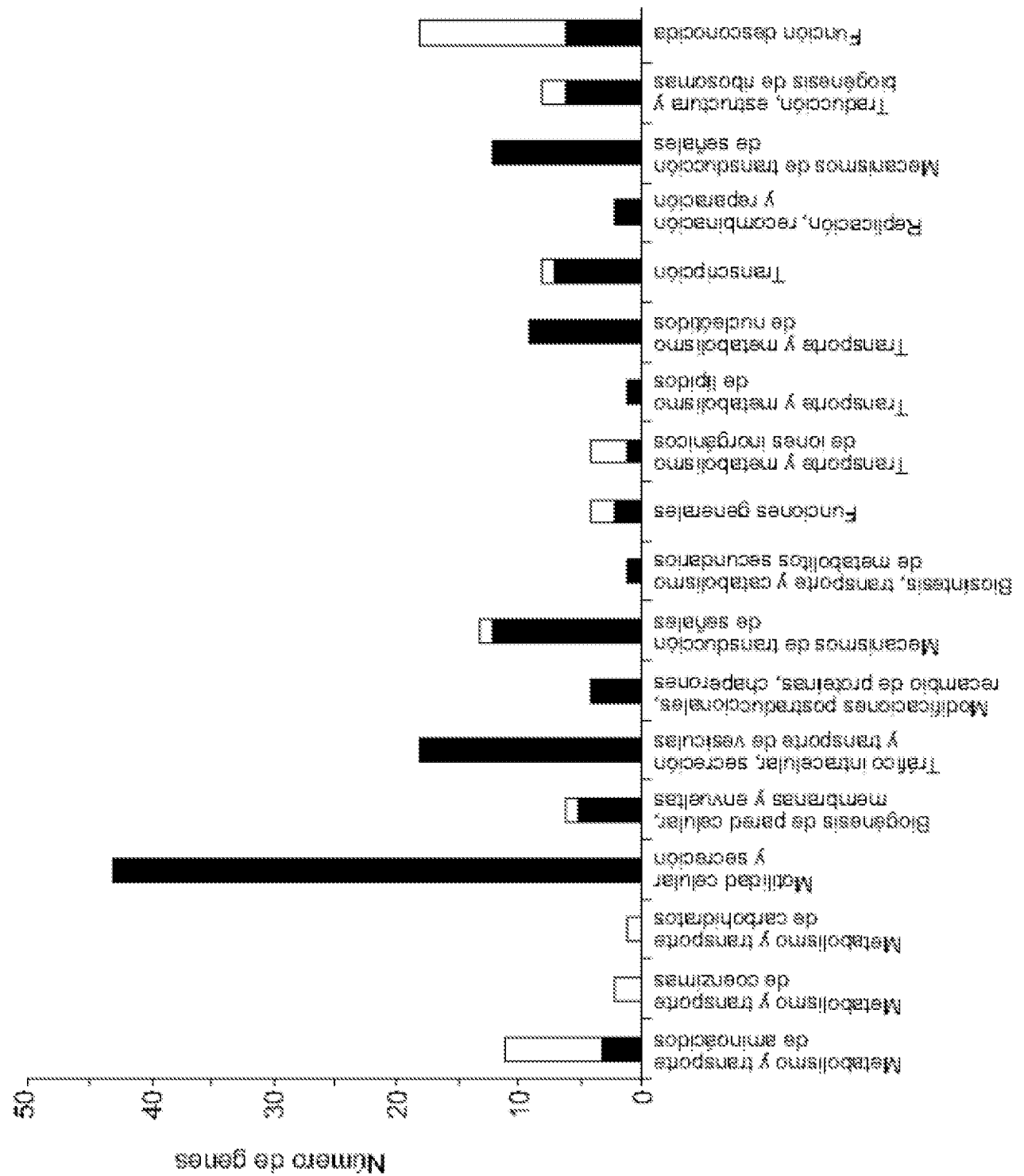


Figura 2

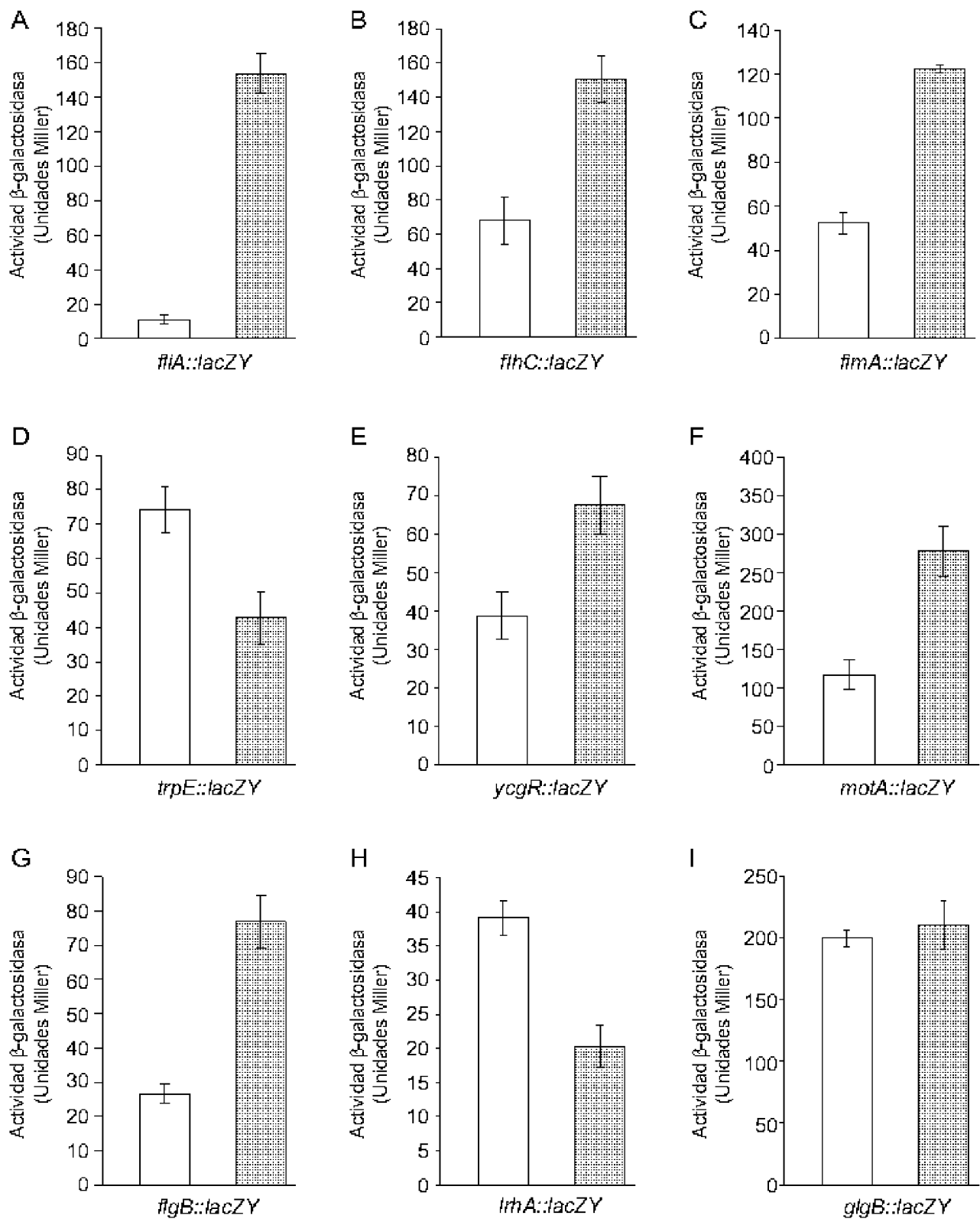
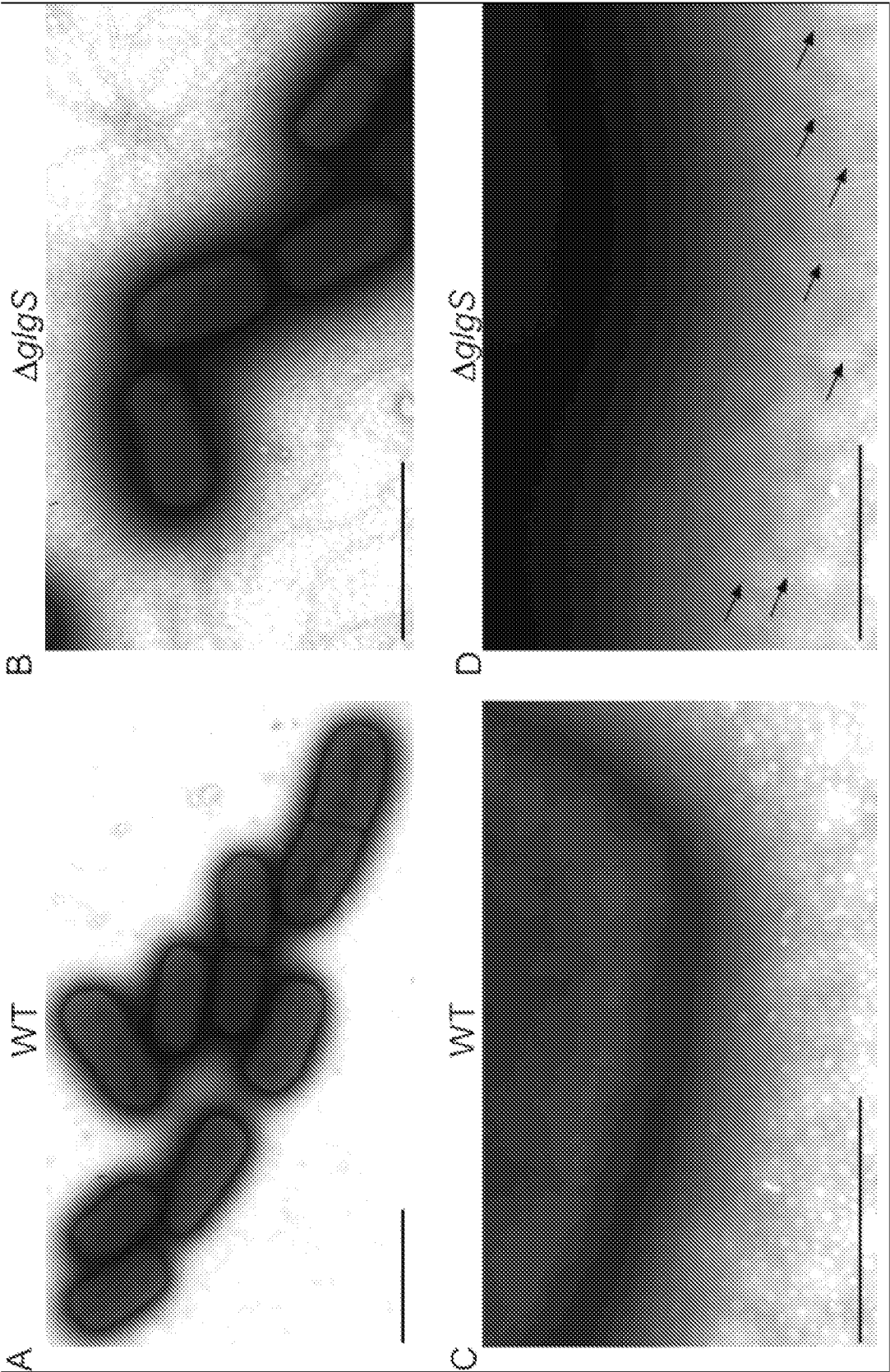


Figura 3



4/15

Figura 4

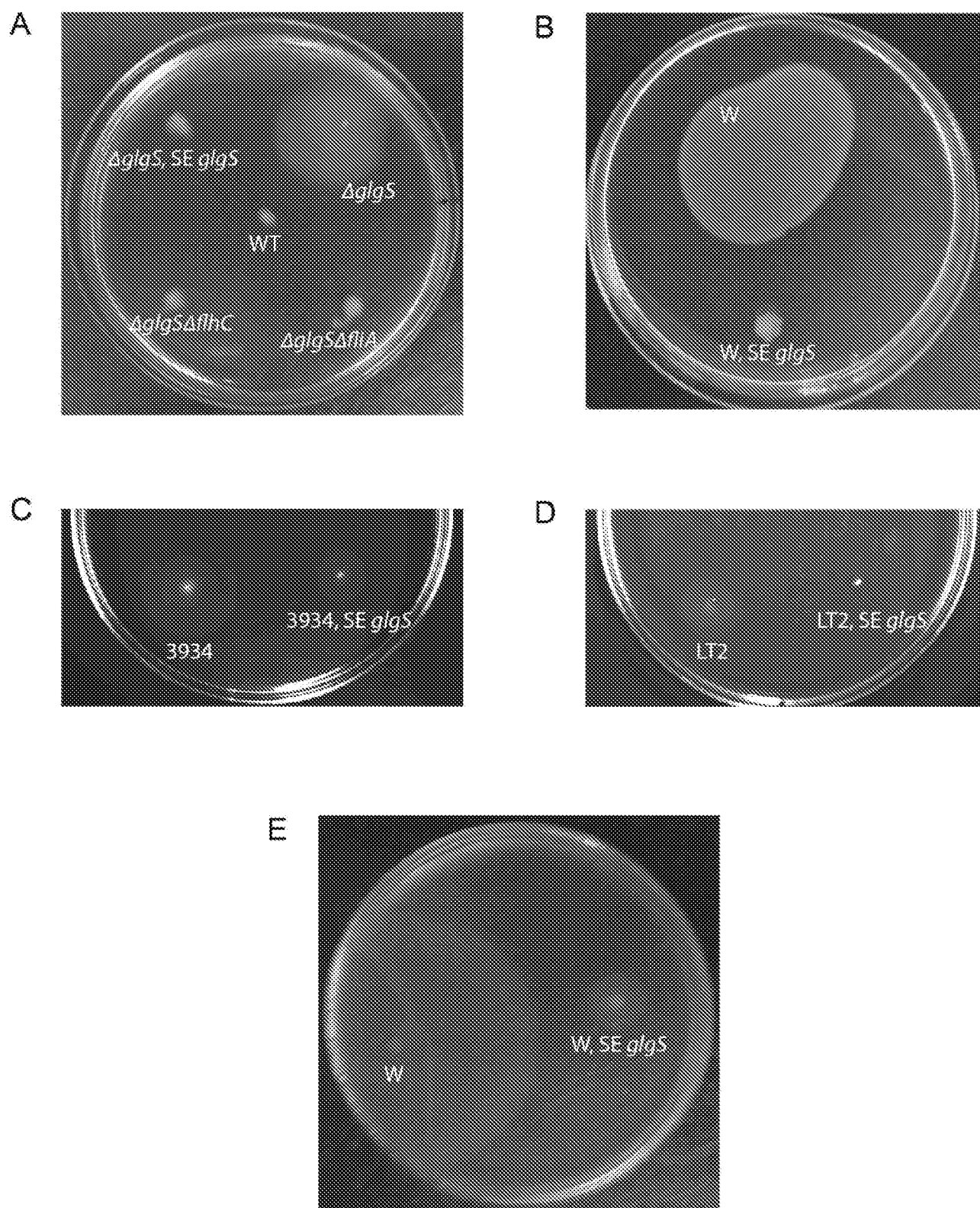
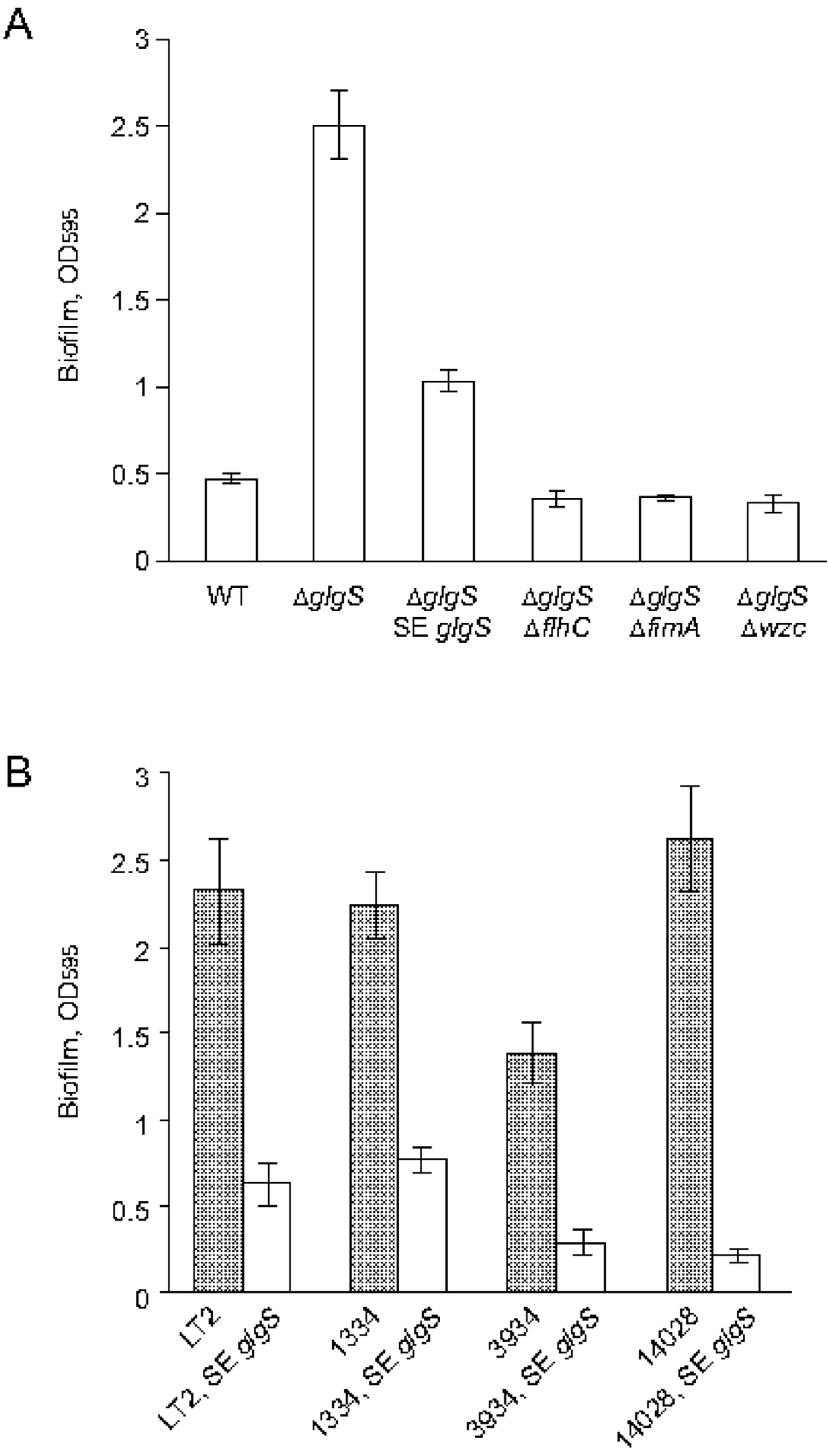
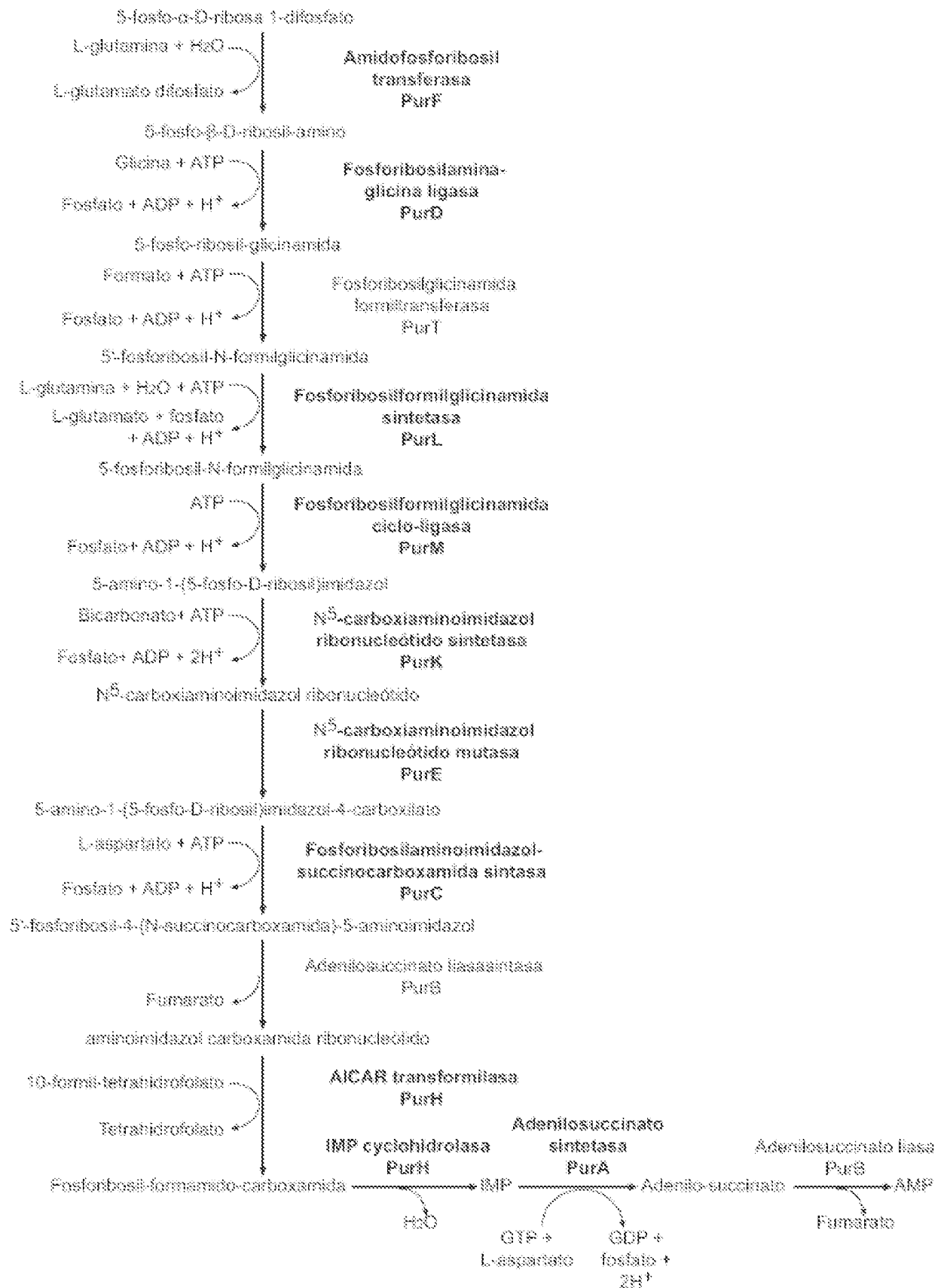


Figura 5



6/15

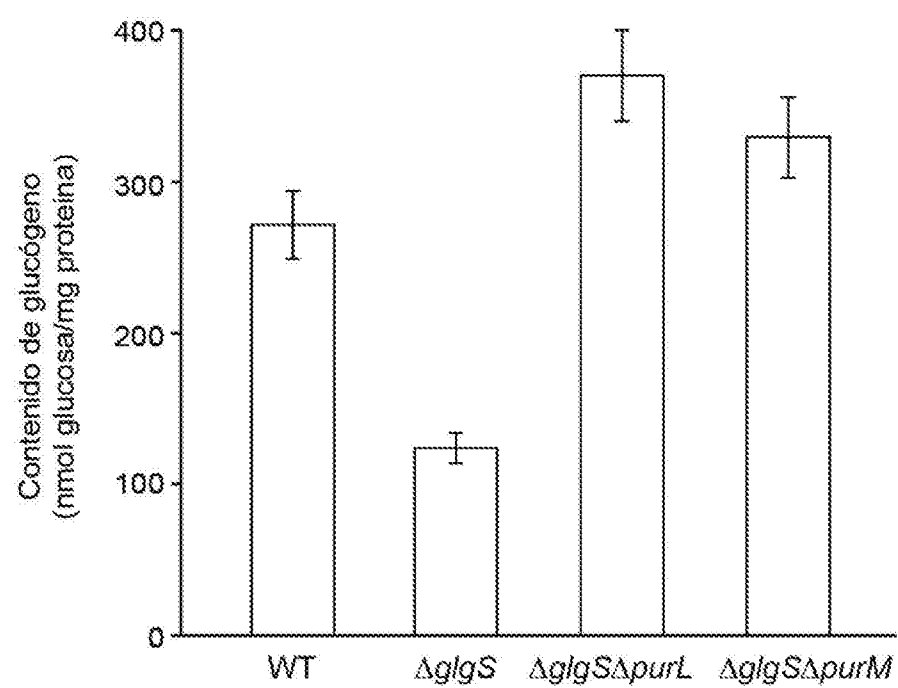
Figura 6



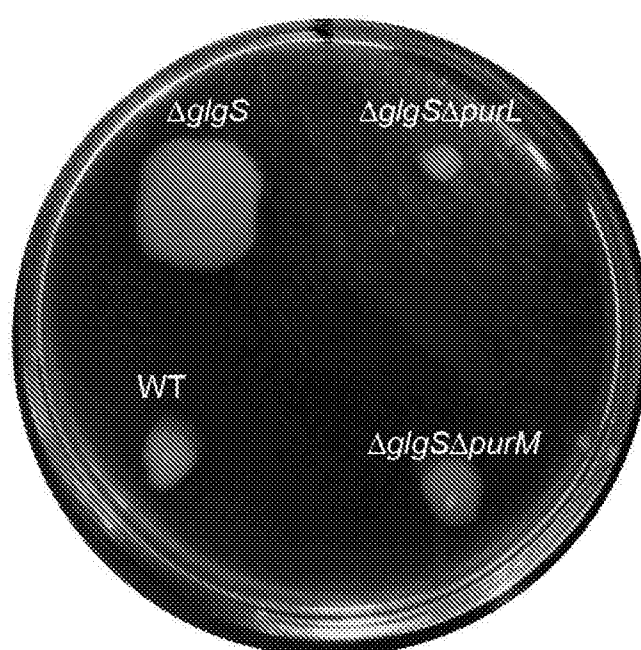
7/15

Figura 7

A

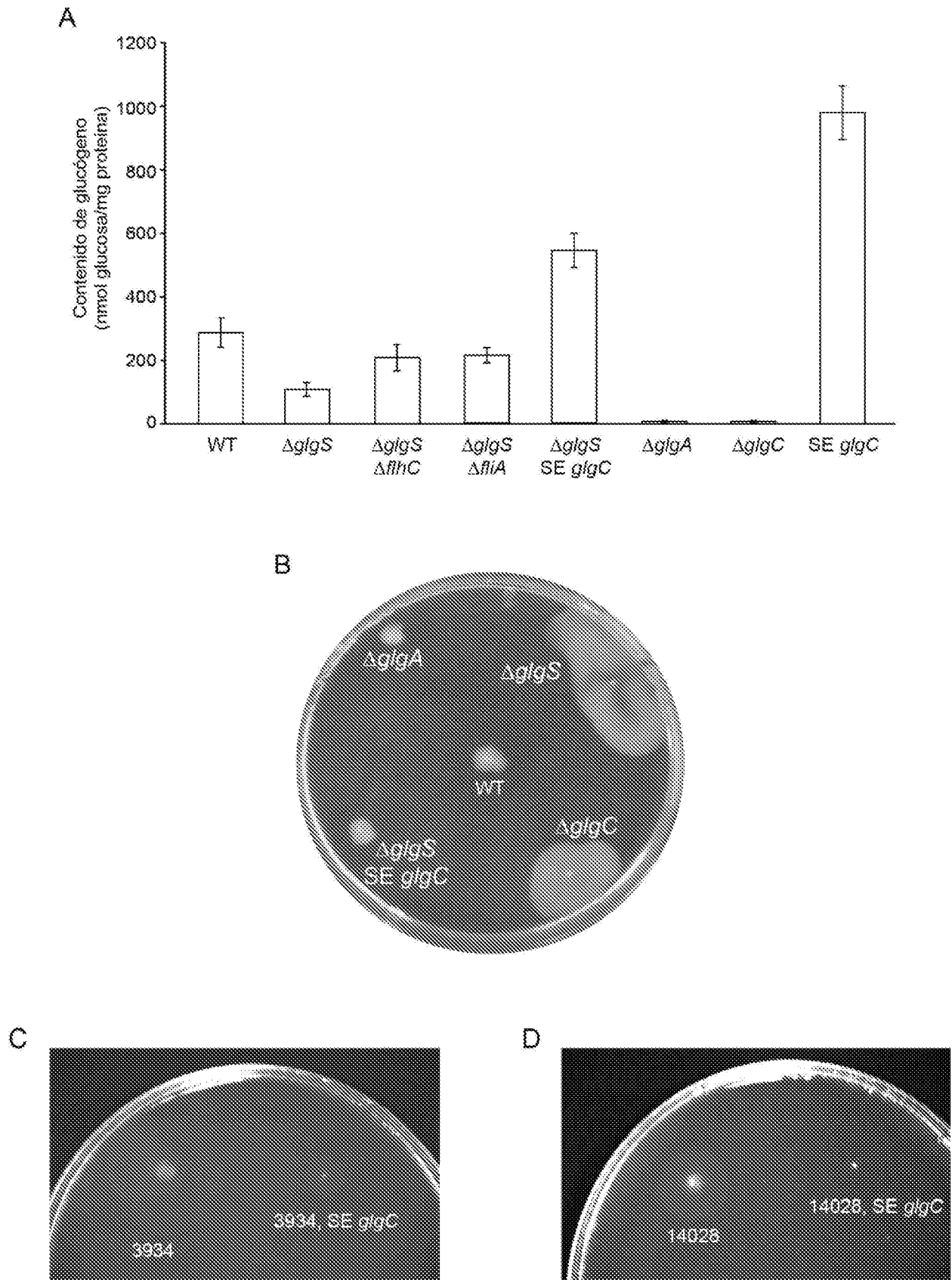


B



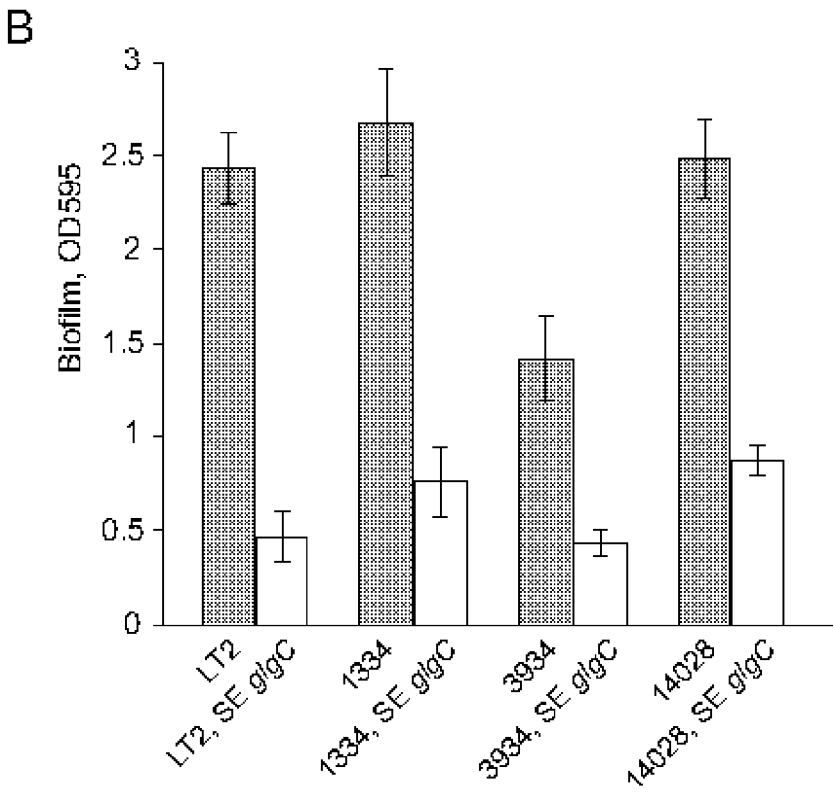
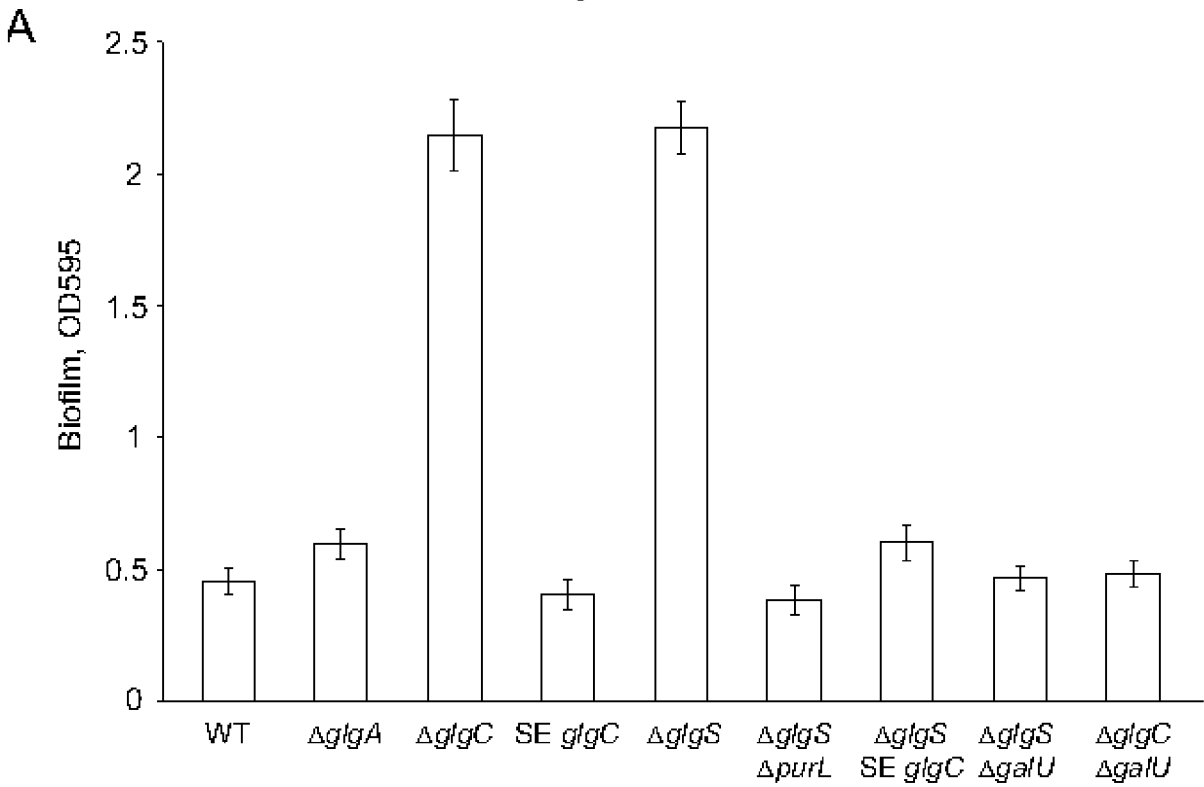
8/15

Figura 8



9/15

Figura 9



10/15

Figura 10

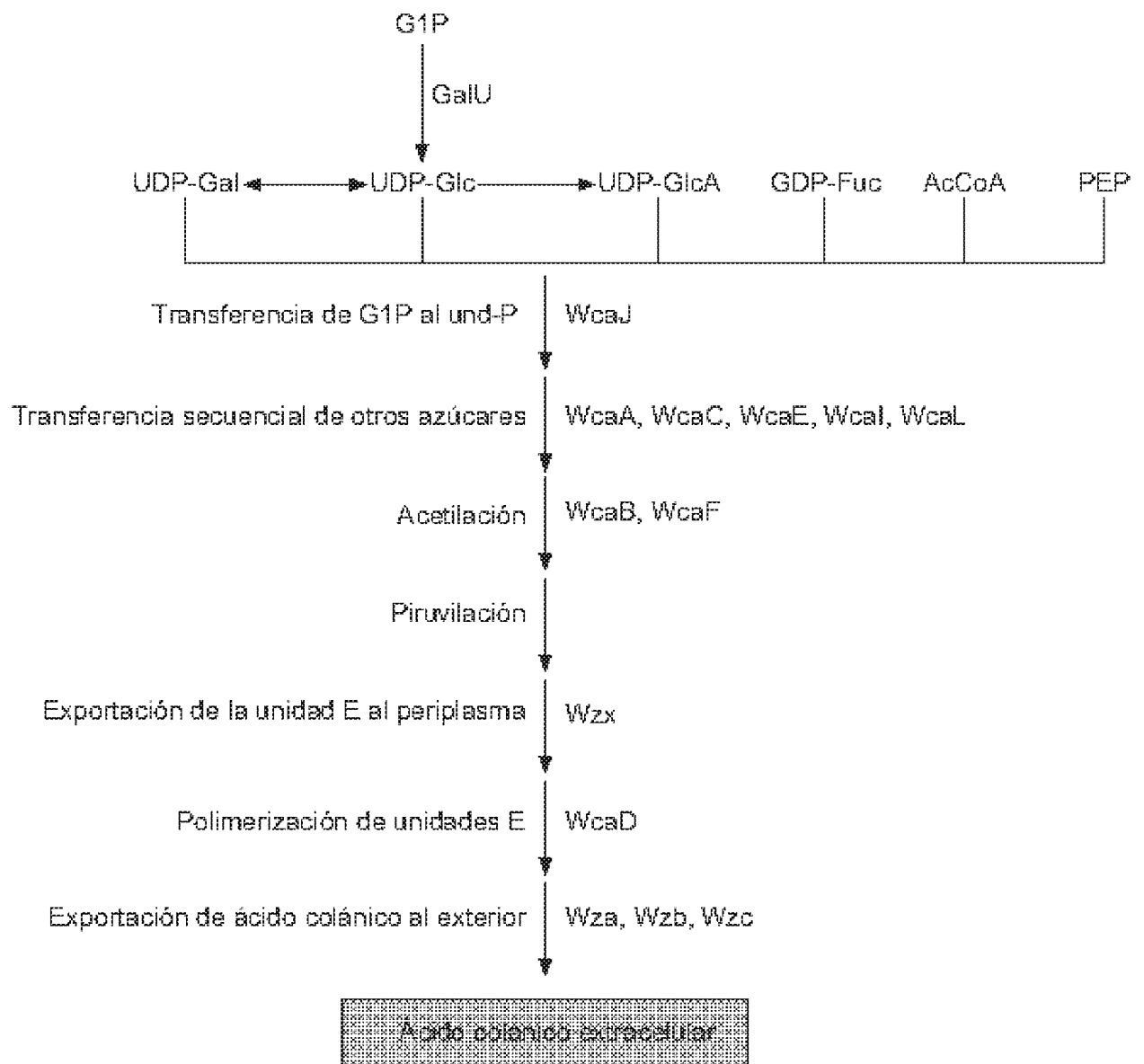
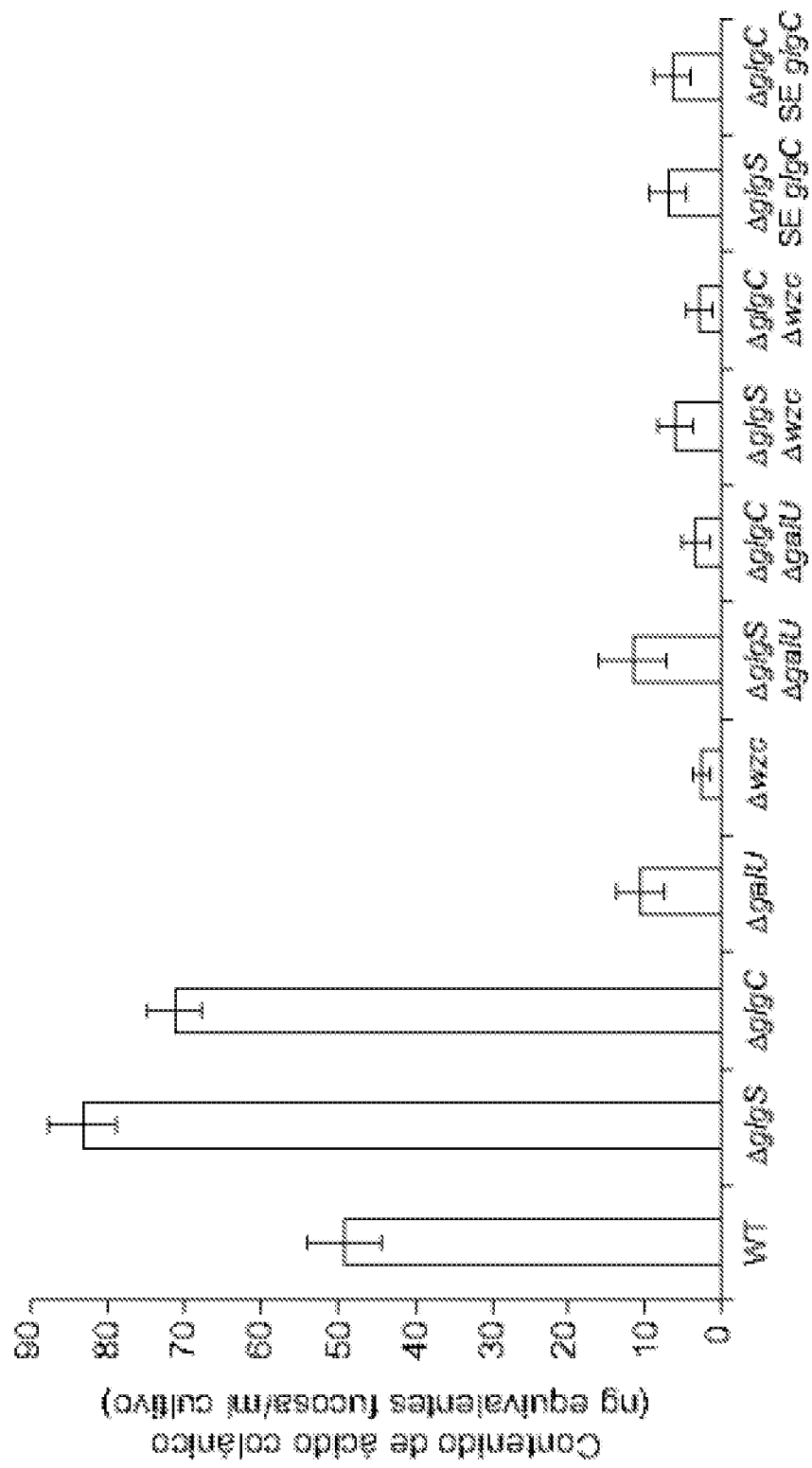
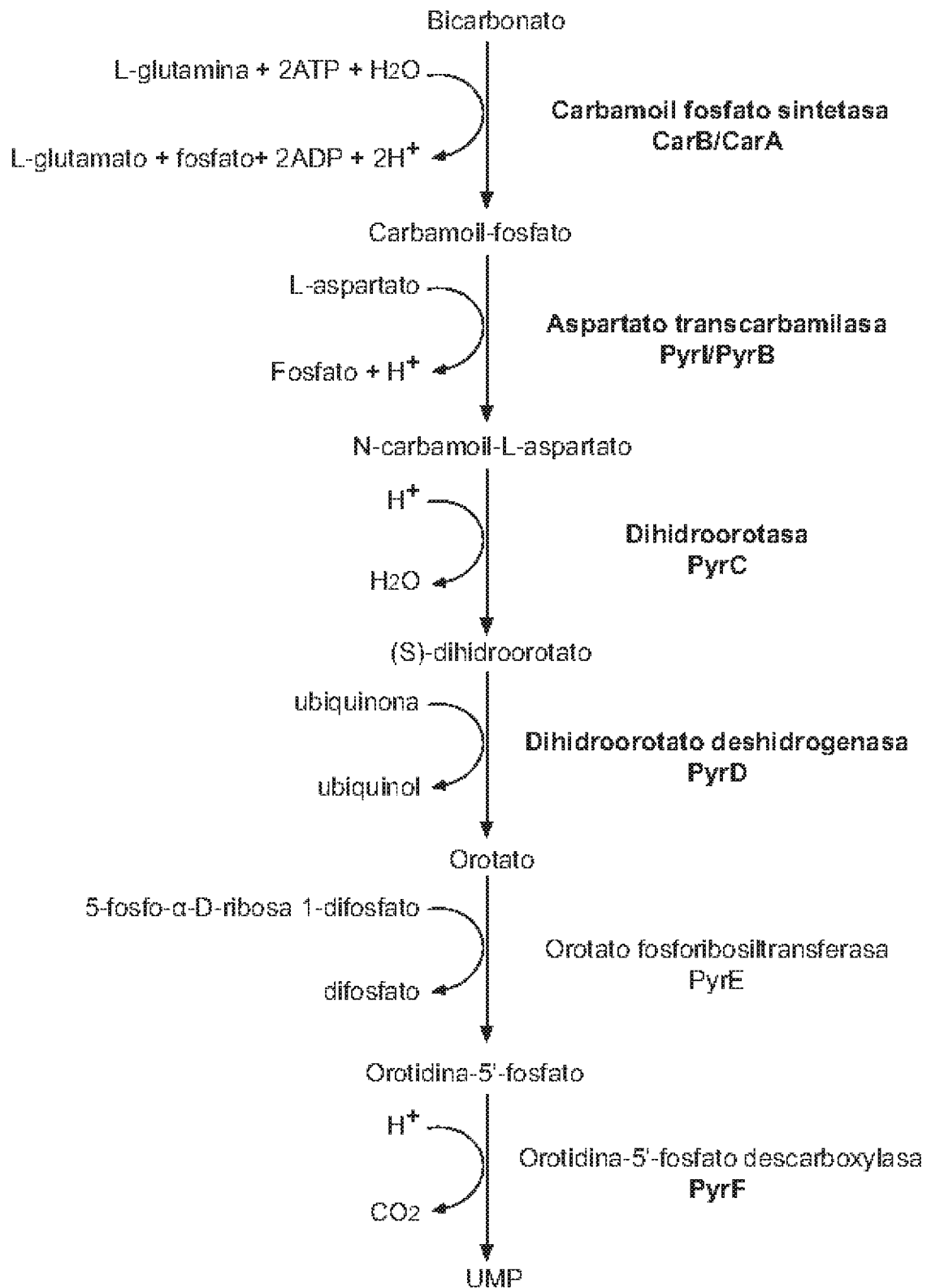


Figura 11



12/15

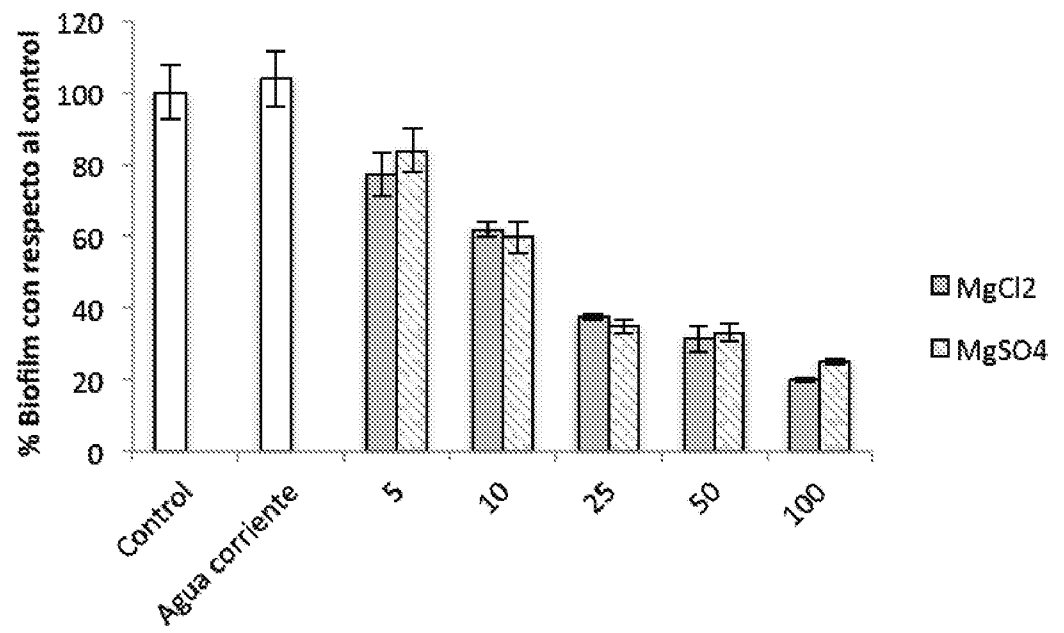
Figura 12



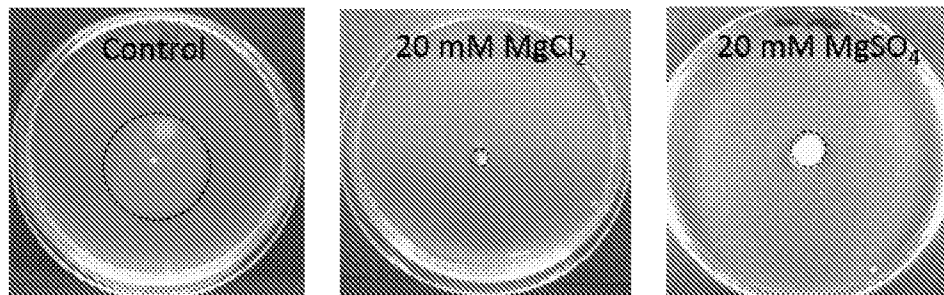
14/15

Figura 14

A



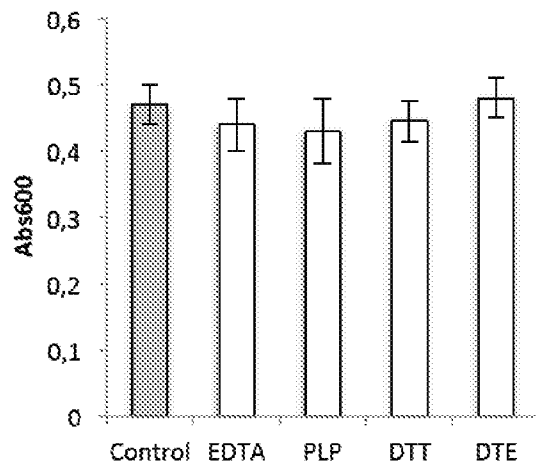
B



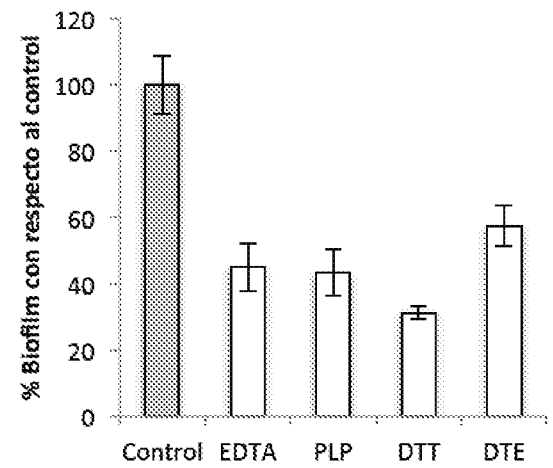
15/15

Figura 15

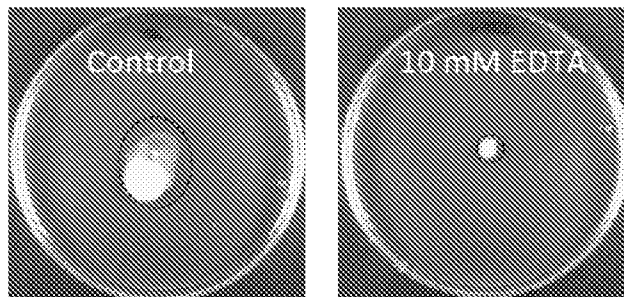
A



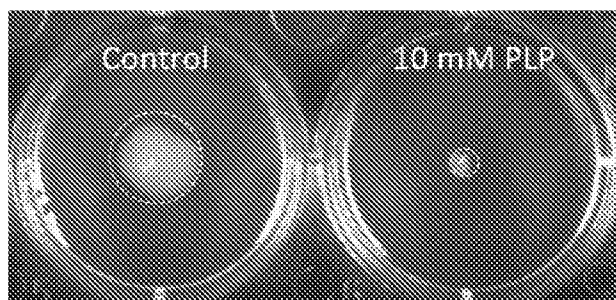
B



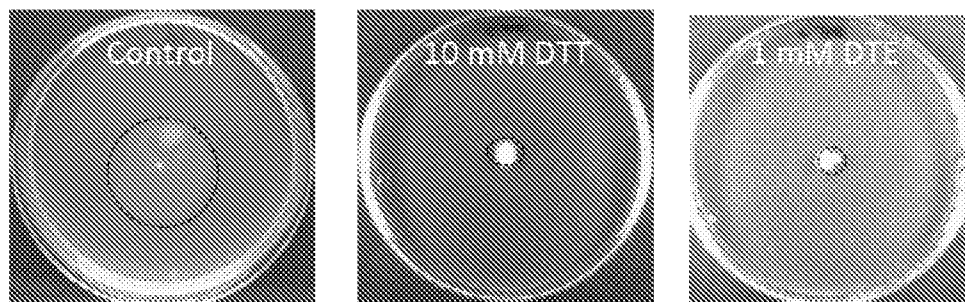
C



D



E



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, wpi, search-sequence, embase, biosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DataBase EMBL-EBI. "Online". (16-08-2012)."Proteins and nucleic acids from meningitis/sepsis-associated <i>Escherichia coli</i> ". JP-2012116975-A (NOVARTIS VACCINES). Database accession no. HW283808. Esta secuencia muestra un 99.7% of identidad con SEQ. ID. N° 1 in un solapamiento of 1296nt.	1-4,7-9,11,13
X	DataBase EMBL-EBI. "Online". (27-03-2008). (METANOMICS GMBH). Sequence 31234 from Patent WO2008034648. Database accession no. FB811961 Esta secuencia muestra un 100% of identidad con SEQ. ID. N° 5 in un solapamiento of 1563nt.	1-4, 7-9, 11,13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06/05/2014

Date of mailing of the international search report
(09/05/2014)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. Manso Tomico

Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070925

C (continuation).			DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	DataBase UniProt-EMBL-EBI. "Online".(28-11-2012). "Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Escherichiacoli KTE68 GN=glgC PE=3 SV=1". Database accessionno. K3RGT0_ECOLX Esta secuencia muestra un 100%of identidad con SEQ. ID. N° 2 in un solapamiento de 431 aa.	1-4, 7-9, 11, 13	
X	DataBase EMBL-EBI."Online". (09-07-2007).AJINOMOTO KK. WO2006078050A2 (27.07.2006). Sequence19 from Patent WO2006078050. Database accessionno. CS682295. Esta secuencia muestra un 100%of indentidad con SEQ. ID. N° 3 in un solapamientode 201 nt.	1-4, 7-9, 11, 13	
X	DataBase UniProt-EMBL-EBI. "Online". (01-10-1996). "Glucose-1-phosphate adenylyltransferase smallsubunit, chloroplastic OS=Arabidopsis thalianaGN=APS1 PE=2 SV=2". Database accession no. GLGS_ARATHEsta secuencia muestra un 100% of indentidadcon SEQ. ID. N° 6 in un solapamiento of 520aa.	1-4, 7-9, 11, 13	
X	DataBase UniProt-EMBL-EBI. "Online". (05-09-2012). "Glycogen synthesis protein GlgS OS=Escherichiacoli EPECa12 GN=glgS PE=3 SV=1. Database accessionno. I6FYR8_ECOLX. Esta secuencia muestra un100% of identidad con SEQ. ID. N° 4 in un solapamientode 66 aa.	1-4, 7-9, 11, 13	
A	22/06/2006, US 2006134640 A1	5,6	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/070925

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-9,11,13 (all partially)**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ADDITIONAL SHEET, CONTINUATION OF BOX III

- Invention 1: Claims 1-9, 11, 13 (all in part)

Compound comprising a protein with AGP activity, GLgS having a sequence of SEQ. ID. No. 2, 3, 4 or 6, with a nucleotide sequence of SEQ. ID. No. 1 or 5, useful for reducing or eliminating pathogenicity and bacterial virulence or bacterial adhesion. Use of the compound for preparing a pharmaceutical composition for the treatment of an infectious disease or for antiseptic cleaning.

- Inventions 2-21: Claims 1, 10, 11 (all in part)

Compound comprising each of the allosteric regulators or activators of a protein with AGP activity. Each of the inventions comprises one of the 19 compounds listed in claim 1 (paragraph 3).

- Invention 22: Claim 12

Method for identifying a compound that inhibits motility, EPS and biofilm formation, as well as bacterial adhesion, by means of a high-performance assay.

- Inventions 23-25: Claims 13, 14

Compound that inhibits GlgC and is a GlgC allosteric regulator, each invention comprising one of the three compounds listed in claim 13. Use of each of these compounds to facilitate the union of rhizobacteria to plant roots.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070925

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2006134640A1	22.06.2006	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070925

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, wpi, search-sequence, embase, biosis

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	Base de datos EMBL-EBI. "Online". (16-08-2012)."Proteins and nucleic acids from meningitis/sepsis-associated <i>Escherichia coli</i> ". JP-2012116975-A (NOVARTIS VACCINES). Database accession no. HW283808. Esta secuencia muestra un 99.7% de identidad con SEQ. ID. Nº 1 en un solapamiento de 1296 nt.	1-4, 7-9, 11, 13
X	Base de datos EMBL-EBI. "Online". (27-03-2008). (METANOMICS GMBH). Sequence 31234 from Patent WO2008034648. Database accession no. FB811961. Esta secuencia muestra un 100% de identidad con SEQ. ID. Nº 5 en un solapamiento de 1563 nt.	1-4, 7-9, 11, 13

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
06/05/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
09 de mayo de 2014 (09/05/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico
Nº de teléfono 91 349 5583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070925

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	Base de datos UniProt-EMBL-EBI. "Online".(28-11-2012).“Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Escherichiacoli KTE68 GN=glgC PE=3 SV=1”. Database accessionno. K3RGT0_ECOLX Esta secuencia muestra un 100%de identidad con SEQ. ID. Nº 2 en un solapamientode 431 aa.	1-4, 7-9, 11, 13
X	Base de datos EMBL-EBI.“Online”. (09-07-2007).AJINOMOTO KK. WO2006078050A2 (27.07.2006). Sequence19 from Patent WO2006078050. Database accessionno. CS682295. Esta secuencia muestra un 100%de indentidad con SEQ. ID. Nº 3 en un solapamientode 201 nt.	1-4, 7-9, 11, 13
X	Base de datos UniProt-EMBL-EBI. "Online". (01-10-1996).“Glucose-1-phosphate adenylyltransferase smallsubunit, chloroplastic OS=Arabidopsis thalianaGN=APS1 PE=2 SV=2”. Database accession no. GLGS_ARATHEsta secuencia muestra un 100% de indentidadcon SEQ. ID. Nº 6 en un solapamiento de 520aa.	1-4, 7-9, 11, 13
X	Base de datos UniProt-EMBL-EBI. "Online". (05-09-2012).“Glycogen synthesis protein GlgS OS=Escherichiacoli EPECa12 GN=glgS PE=3 SV=1. Database accessionno. I6FYR8_ECOLX. Esta secuencia muestra un100% de identidad con SEQ. ID. Nº 4 en un solapamientode 66 aa.	1-4, 7-9, 11, 13
A	22/06/2006, US 2006134640 A1	5,6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070925

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver Recuadro Suplementario.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s: **1-9,11,13 (todas parcialmente)**

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

SUPLEMENTARIO DE REC. III**- Invención 1: (reivindicaciones 1-,9, 11, 13 (todas parcialmente))**

Compuesto comprendiendo una proteína con actividad AGP, GLgS de secuencia SEQ. ID.Nº 2, 3, 4 o 6 y cuya secuencia nucleotídica son SEQ. ID. Nº 1 o 5, útil para reducir o anular la patogenicidad y virulencia bacteriana o adherencia bacteriana. Uso del compuesto para la elaboración de una composición farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad infecciosa o para la limpieza antiséptica.

- Invenciones 2- 21: (reivindicaciones 1, 10 ,11 (todas parcialmente))

Compuesto comprendiendo cada uno de los reguladores alostéricos o activadores de una proteína con actividad AGP. Cada invención comprendiendo uno de los 19 compuestos que aparecen en la reivindicación 1 (tercer apartado).

- Invención 22: (reivindicación 12)

Procedimiento de identificación de un compuesto inhibidor de la motilidad, formación de EPSs y biofilms, así como de la capacidad de adherencia de bacterias, mediante un ensayo de alta capacidad.

- Invenciones 23-25: (reivindicaciones 13, 14)

Compuesto que inhibe GlgC y es un regulador alostérico de GlgC , cada invención comprendiendo a uno de los tres compuestos que aparecen en la reivindicación 13. Uso de cada uno de esos compuestos para favorecer la unión de rizobacterias a las raíces de las plantas.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070925

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2006134640A1 -----	22.06.2006 -----	NINGUNO -----	-----