



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0622182-3 B1

(22) Data do Depósito: 03/10/2006

(45) Data de Concessão: 31/07/2018



(54) Título: PROCESSO PARA A SUBSTITUIÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA ALVO ATRAVÉS DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM CLOSTRIDIA, CEPAS RECOMBINANTES DE CLOSTRIDIUM E VETOR PARA A SUBSTITUIÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA ALVO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM CLOSTRIDIA

(51) Int.Cl.: C12N 15/74; C12N 15/90; C12R 1/145

(73) Titular(es): METABOLIC EXPLORER

(72) Inventor(es): PHILIPPE SOUCAILLE; RAINER FIGGE; CHRISTIAN CROUX

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/04/2009

PROCESSO PARA A SUBSTITUIÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA ALVO ATRAVÉS DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM *CLOSTRIDIA*, CEPA RECOMBINANTE DE *CLOSTRIDIUM* E VETOR PARA A SUBSTITUIÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE DNA ALVO POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM *CLOSTRIDIA*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Clostridia são bactérias gram positivas, anaeróbicas e de baixo Gc que são amplamente utilizadas na indústria por suas capacidades para produzir solventes, em particular, butanol, etanol e acetona, mas também dióis como 1,3 propanodiol, ácidos orgânicos tais como ácido acético, butírico ou láctico e vacinas.

A construção de *Clostridia* recombinante é uma parte importante do desenvolvimento no campo. As cepas de *Clostridium* são geneticamente modificadas para melhorar suas capacidades industriais.

Para realizar essas modificações, a recombinação homóloga é a técnica mais utilizada em todos os tipos de organismos. A transformação e a recombinação homóloga em vários microrganismos têm sido extensamente descritas no estado da técnica. Veja, por exemplo, (Datsenko e Wanner, PNAS, 2000) e (Fabret et al, Molecular Microbiology, 2002).

Clostridia não são naturalmente transformáveis e os métodos atualmente disponíveis para sua transformação são ineficientes e não permitem a introdução de múltiplas

mutações. Isso tem impedido desenvolvimentos industriais nesse campo.

Clostridia comumente produzem DNases extracelulares e enzimas de restrição que degradam DNA estranho antes e após
5 introdução nas células para transformação. Métodos clássicos baseados na introdução de fragmentos de PCR que funcionam bem em muitos microorganismos tais como *E. coli* ou levedura, não são viáveis nesses organismos, uma vez que a meia-vida extracelular e intracelular da estrutura de DNA
10 a ser recombinada é muito curta e a eficiência de recombinação geralmente é baixa. Em outros organismos, essas dificuldades têm sido superadas usando vetores que se replicam no hospedeiro, aumentando assim a probabilidade do evento de recombinação. Todavia, após o evento de
15 recombinação, o vetor que agora traz a sequência de DNA alvo intacta tem de ser eliminado. Esse problema foi resolvido em *Lactococcus lactis* (Biswas e colaboradores, J Bacteriol., 1993) usando unidades de replicação (*replicons*) sensíveis à temperatura que podem ser eliminados na
20 temperatura não-permissiva. Nenhum vetor com essas características está atualmente disponível para *Clostridia*. Portanto, a construção de mutantes em *Clostridia* tem sido, até hoje, muito trabalhosa e freqüentemente sem sucesso.

A inativação de genes em *Clostridia* foram reportadas nos seguintes artigos (veja Tabela 1).

Tabela 1

Cepa	Genótipo	Referência
<i>Clostridium acetobutylicum</i> PJC4BK	<i>buk</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^R	Green e colaboradores, 1996
<i>Clostridium acetobutylicum</i> PJC4PTA	<i>pta</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^R	Green e colaboradores, 1996
<i>Clostridium acetobutylicum</i> PJC4AAD	<i>aad</i> ⁻ , <i>MLS</i> ^R	Green e Bennett, 1996
<i>Clostridium perfringens</i> <i>SM101</i> e <i>F4969</i>	Δ <i>cpe</i> , <i>CatP</i>	Sarker e colaboradores., 1999
<i>Clostridium perfringens</i> <i>Cepa 13</i>	Δ <i>luxS</i>	Ohtani e colaboradores, 2002
<i>Clostridium acetobutylicum</i> SK01	Δ <i>spoA</i> , <i>MLS</i> ^R	Harris e colaboradores, 2002
<i>Clostridium perfringens</i> <i>Tipo A</i>	Δ <i>spo0A</i>	Huang e colaboradores,

		2004
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	<i>ccpA</i> -, <i>CatP</i>	Varga e colaboradores., 2004
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 buk-	Δ <i>SpoIIE</i> , <i>buk</i> -, <i>CatP</i>	WO 2006/007530

Inativação de gene foi até o momento realizada em *Clostridia* através da transformação com DNA circular que não pode se replicar nas cepas alvo. Uma vez que DNases e endonucleases de restrição de DNA presentes em *Clostridia* degradam rapidamente o DNA introduzido, e geralmente a frequência de recombinação nesse gênero não é muito alta, a obtenção de mutantes tem sido muito trabalhosa.

Além disso, as cepas recombinantes descritas até o momento (veja acima) são todas resistentes ao MLS ou cloranfenicol e os genes marcadores correspondentes não podem ser removidos após o evento de recombinação ter ocorrido. Isso limita o número de possíveis recombinações ao número de marcadores de resistência disponíveis nessas bactérias para um máximo de 3. Além disso, para o uso industrial dessas bactérias, poderia ser útil ter cepas

sem marcadores de forma a evitar a liberação de genes de resistência a antibiótico no meio de fermentação.

Além disso, algumas dessas cepas que têm sido obtidas através de eventos de recombinação únicos têm a
5 desvantagem de que elas não são estáveis se cultivadas sem qualquer pressão de seleção.

Conseqüentemente, há ainda uma necessidade no estado da técnica por um método para a transformação de *Clostridia* com alta eficiência, com uma etapa fácil de
10 seleção de cepas recombinantes que permita substituições de sequência de DNA sucessivas na mesma cepa, levando à *Clostridia* recombinantes que são geneticamente estáveis e sem marcadores.

A presente invenção está relacionada a um novo método
15 para substituição ou deleção de sequências de DNA em *Clostridia*, fácil de realizar e aplicável a nível industrial. Esse método é útil para modificar vários loci genéticos em *Clostridia* de uma maneira rotineira.

Esse método é baseado em um vetor replicativo útil
20 para a transformação de *Clostridia* com alta eficiência.

Um número ilimitado de mutações podem ser introduzidas no genoma com esse novo método, através da eliminação de cassetes de resistência do genoma e reutilização dos

mesmos em sucessivos ciclos de substituição de sequência de DNA.

A introdução eficiente de múltiplas mutações em *Clostridia* deverá permitir que a indústria aprimore as
5 cepas industriais existentes e desenvolva novos processos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona um processo para a substituição de uma sequência de DNA alvo através de recombinação homóloga em *Clostridia*, compreendendo:

10 - Transformação da referida cepa com um vetor compreendendo:

- uma origem de replicação que permite sua replicação em *Clostridia*, e

- um cassete de substituição compreendendo um
15 primeiro gene marcador envolvido por duas sequências homólogas às regiões selecionadas em torno da sequência de DNA alvo, permitindo a recombinação do cassete, e

- um segundo gene marcador,

- seleção de cepas, tendo integrado em seu genoma o
20 referido cassete, que expressam o primeiro gene marcador,

- seleção de cepas, tendo eliminado o referido vetor, que não expressam o segundo gene marcador.

Todas as técnicas de biologia molecular usadas para realização da invenção estão totalmente descritas em

"Molecular cloning : a laboratory manual", 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, por Sambrook, Fritsch e Maniatis.

Usado no contexto da presente invenção, o termo
5 "substituição" de uma sequência de DNA alvo significa que uma sequência diferente da original é introduzida no locus da sequência de DNA alvo.

De acordo com a invenção, uma sequência de DNA é definida como um gene ou uma sequência intergênica. Ambos
10 podem compreender sequências promotoras ou regulatórias.

A expressão "sequência de DNA alvo" significa qualquer gene, região intergênica, sequência promotora ou regulatória de interesse escolhida por aqueles habilitados na técnica. Ela significa, em particular, genes que
15 codificam proteínas de interesse, por exemplo, enzimas envolvidas no metabolismo celular.

A sequência de DNA substituída/inserida pode ser de codificação ou não. Ela pode ser uma sequência mutante do gene alvo, sequência promotora ou regulatória e/ou um
20 marcador, tal como um gene de resistência a antibiótico ou uma enzima que gera cor. Ela pode ser mais longa ou mais curta do que a sequência substituída, dependendo da distância que separa as duas regiões homólogas.

Em virtude da inserção, a expressão do gene alvo é usualmente perturbada, parcialmente ou completamente suprimida ou aumentada. A substituição da sequência de DNA alvo por uma sequência próxima da original, mas compreendendo mutações, leva à expressão real de uma proteína, sequência promotora ou regulatória mutante.

Se a substituição da sequência de DNA alvo proporciona, como um resultado, uma eliminação total da referida sequência de DNA, o gene é qualificado como "deletado".

A expressão "recombinação homóloga" se refere ao evento de substituição de um segmento de DNA por outro que possui regiões idênticas (homólogas) ou próximas disso. Esse evento é também denominado "crossover" de DNA.

O termo "transformação" se refere à incorporação de ácido nucléico exógeno por uma célula, essa aquisição de novos genes sendo transitória (se o vetor que traz os genes é curado) ou permanente (no caso em que o DNA exógeno é integrado cromossomicamente).

O termo "vetor" se refere a um elemento extra-cromossomal trazendo genes ou cassetes, que está usualmente na forma de moléculas de DNA fita dupla circular, mas pode ser uma molécula de DNA fita simples também. Ambos os termos "vetor" e "plasmídeo" são usados indiferentemente.

O vetor de acordo com a invenção é um vetor replicativo. Ele compreende pelo menos uma origem de replicação e, preferencialmente, várias origens de replicação, permitindo que o mesmo seja funcional em
5 diferentes espécies.

Em particular, um vetor preferido pode compreender duas origens de replicação:

- Ori, funcional em *E. coli*
- RepL de pIM13 derivado de *B. subtilis*, funcional em
10 *Clostridia* (Mermelstein e colaboradores, *Biotechnology*, 1992).

A expressão "seqüências homólogas a uma seqüência de DNA alvo" se refere às seqüências com alta similaridade de seqüência às regiões selecionadas da seqüência alvo.

15 O termo "gene marcador" se refere a uma seqüência que codifica uma proteína marcadora sob o controle de elementos regulatórios funcionais em *Clostridia*. Tais proteínas são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, aqueles habilitados na técnica podem usar um gene de
20 resistência a antibiótico, um marcador fluorescente ou colorido ou um marcador de auxotrofia. Exemplos de genes marcadores úteis serão fornecidos abaixo.

Após o evento de recombinação ter ocorrido, o vetor agora traz a seqüência de DNA alvo intacta e,

conseqüentemente, tem de ser eliminado. A eliminação de um vetor replicativo geralmente acontece com sucessivas culturas de clones, seguido por seleção negativa ou positiva de clones tendo eliminado esse vetor. A
5 eliminação do vetor também pode ser uma etapa ativa do processo, com o uso de endonucleases que clivam especificamente seqüências de DNA presentes no vetor. Uma vez que o vetor é curado, as cepas não expressam mais o segundo gene marcador e podem ser selecionadas com base
10 nessa característica.

Em uma modalidade particular da invenção, o segundo gene marcador é um gene de resistência a antibiótico. Dentre os genes de resistência a antibiótico úteis, aqueles habilitados na técnica saberiam qual é o mais
15 apropriado. Por exemplo, os seguintes genes podem ser usados: gene CatP, que proporciona resistência ao cloranfenicol e tianfenicol ou gene MLS^R, que proporciona resistência à eritromicina.

Em uma modalidade preferida da invenção, o segundo
20 gene marcador é um gene marcador contra-selecionável.

Um marcador contra-selecionável é um gene cuja presença é letal para o organismo hospedeiro sob determinadas circunstâncias, tal como a presença de seu substrato cognato. Marcadores contra-selecionáveis podem

ser usados como uma seleção positiva para a perda do plasmídeo.

De preferência, o gene marcador contra-selecionável é um gene que restaura a atividade de um gene endógeno não essencial ausente ou deletado. Os marcadores contra-selecionáveis mais usados são os genes que conferem sensibilidade à sacarose, estreptomicina ou ácido fusárico. Eles têm sido usados para construir cepas mutantes ou de vacina em várias cepas bacterianas. Para detalhes veja a revisão por Reyrat e colaboradores, 1998, *Infection and Immunity*. Marcadores contra-selecionáveis que podem ser usados em *Clostridia* incluem genes que proporcionam sensibilidade à 5-fluoro-uracila (5-FU), gama-glutamil hidrazida (GBS) ou 8-aza-2,6-diaminopurina (8ADP).

Em uma modalidade preferida, o marcador contra-selecionável é o gene *upp*, o qual codifica fosforibosil-transferase de uracila, que promove a transformação de 5-fluoro-uracila (5-FU) em um produto tóxico. Células tendo atividade de Upp não podem crescer sobre um meio com 5-FU.

O uso desse marcador contra-selecionável é particularmente útil quando as *Clostridia* transformadas são Δupp e, conseqüentemente, são capazes de crescer sobre um meio compreendendo 5-FU antes de transformação e após a

eliminação do vetor. Cepas tendo eliminado o vetor podem ser positivamente selecionadas.

5 Mutantes supressores que podem surgir no gene *upp* na presença de 5-FU podem, algumas vezes, levar a falsas suposições com relação à perda do plasmídeo. Em uma modalidade preferida da invenção, o vetor compreende, além disso, um terceiro marcador, preferencialmente um gene de resistência a antibiótico que permite uma segunda seleção de cepas sensíveis ao antibiótico. Essa seleção negativa
10 pode ser usada além da seleção positiva baseada no gene *upp*.

Em uma modalidade preferida da invenção, o vetor é eliminado através de digestão com endonucleases após o evento de recombinação ter ocorrido. De preferência, o
15 vetor abriga seqüências de DNA que são reconhecidas por endonucleases de restrição e que estão, ao mesmo tempo, ausentes do genoma da espécie *Clostridium* usada. Portanto, o vetor é especificamente destruído sem perda de integridade do genoma de *Clostridium*.

20 Endonucleases de restrição são enzimas que clivam moléculas de DNA no local de seqüências de base específicas, o sítio de endonuclease de restrição. Aqueles habilitados na técnica serão capazes de determinar qual sítio de endonuclease de restrição está ausente do genoma

da cepa de *Clostridium* de interesse. Possíveis endonucleases de restrição que podem ser aplicadas para *C. acetobutylicum* são *AscI*, *FseI*, *NotI*, *SfiI*, *SrfI*. Em outra modalidade, meganucleases, as quais reconhecem grandes
5 sítios alvo de DNA (12-45 bp), tais como I-SceI, HO ou I-CreI, podem ser usadas.

Em uma modalidade preferida da invenção, a cepa de *Clostridium* a ser transformada abriga sobre seu genoma, pelo menos um gene que codifica endonuclease, o qual
10 reconhece o sítio de endonuclease de restrição que está presente sobre o vetor. Opcionalmente, expressão da endonuclease de restrição está sob o controle de um promotor induzível.

Um promotor induzível é um elemento de DNA que permite
15 a expressão condicional de uma seqüência alvo através da adição do indutor correspondente. Por exemplo, um sistema de promotor induzível em *Clostridium* que é conhecido por aqueles habilitados na técnica é descrito em Girbal e colaboradores, 2003, Appl. Env. Microbiol. 69:4985-8.

20 Após o evento de recombinação ter ocorrido e antes de seleção de cepas que tenham eliminado o vetor, a expressão da endonuclease de restrição pode ser induzida. A endonuclease de restrição clivará o vetor presente nas *Clostridia*, levando à sua eliminação.

Opionalmente, o gene que codifica a endonuclease de restrição pode ser inserido no genoma antes de introdução do vetor na cepa.

5 Em outra modalidade da invenção, o gene que codifica endonuclease de restrição pode também aumentar a frequência de recombinação antes da eliminação do plasmídeo através do aumento da quantidade de DNA linear nas células, o qual é conhecido por se recombinar melhor do que o DNA circular.

10 Em uma modalidade particular da invenção, o primeiro gene marcador é um gene de resistência a antibiótico introduzido no meio do cassete de substituição.

Em uma modalidade específica da invenção, esse primeiro gene marcador pode ser removido do genoma das 15 cepas de *Clostridium* transformadas. Em particular, o primeiro gene marcador pode ser envolvido por dois sítios alvo de recombinase e, então, ser eliminado pela ação de uma recombinase, após o evento de recombinação homóloga ter ocorrido.

20 Em uma modalidade vantajosa da invenção, a recombinase é expressa por um segundo vetor que traz o gene correspondente, o referido vetor sendo introduzido nas *Clostridia* através de transformação.

De preferência, os sítios alvo de recombinase são as seqüências FRT. Recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae* é ativa em uma seqüência de DNA de 34 pares de base particular, denominada a seqüência FRT (para o alvo da recombinase FLP). Quando dois desses sítios FRT estão presentes, a enzima FLP cria rupturas dupla fita nas fitas de DNA, troca as extremidades do primeiro FRT por aquelas da segunda seqüência alvo e, então, prende novamente as fitas trocadas. Esse processo leva à deleção do DNA o qual repousa entre os dois sítios.

Em uma forma específica de realização da invenção, seqüências homólogas às regiões selecionadas em torno da seqüência de DNA alvo podem compreender mutações em até 10% dos pares de base que compõem o fragmento de DNA usado para o evento de recombinação.

Em uma modalidade vantajosa da invenção, as cepas de *Clostridium* a serem transformadas sofrem deleção de genes que codificam endonucleases de restrição. Essas cepas apresentam a vantagem de que elas são prontamente transformáveis sem qualquer metilação prévia do plasmídeo *in vivo*.

Em outra modalidade vantajosa da invenção, as cepas de *Clostridium* a serem transformadas sofrem deleção de genes que codificam as DNAses extracelulares.

Em outra modalidade da invenção, as *Clostridia* a serem transformadas sofrem deleção do gene *upp*.

Em outra modalidade vantajosa da invenção, as cepas de *Clostridium* a serem transformadas são escolhidas dentre

5 *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium bejeirinckii*,
Clostridium saccharoperbutylacetonicum, *Clostridium butylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*,
Clostridium tetani, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium saccharolyticum* (agora

10 *Thermoanaerobacter saccharolyticum*), *Clostridium thermosulfurogenes* (agora *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (agora *Thermoanaerobacter ethanolicus*).

A cepa de *Clostridium* preferida é *Clostridium*

15 *acetobutylicum*.

Em uma modalidade preferida da invenção, a cepa de *Clostridium acetobutylicum* a ser transformada é uma cepa Δ Cac15, que sofreu deleção do gene que codifica a endonuclease de restrição Cac 824I. Essa cepa apresenta a

20 vantagem de que ela é prontamente transformável sem qualquer metilação prévia do plasmídeo *in vivo*.

Em outra modalidade preferida da invenção, a cepa de *Clostridium acetobutylicum* a ser transformada é uma cepa cujo gene *upp* foi deletado, denominada Δ *upp*. Como uma

consequência, a transformação da cepa com um vetor trazendo o gene *upp* permite a seleção de cepas sensíveis a meio com 5-FU e, então, a seleção positiva de cepas tendo perdido o plasmídeo que não são mais sensíveis a meio com 5-FU.

A cepa de *Clostridium acetobutylicum* a ser transformada também pode ser Δ *Cac15* Δ *upp*.

O processo é vantajosamente usado para substituição sucessiva de dois ou mais genes alvo através de recombinação homóloga na mesma cepa de *Clostridium*.

A presente invenção também se refere a uma cepa de *Clostridium* recombinante passível de ser obtida através do processo de acordo com a invenção. Vantajosamente, o processo de acordo com a invenção pode ser usado para obter cepas de *Clostridium* recombinantes em que o gene *cac15* foi deletado (cepa Δ *cac15*), em que o gene *upp* foi deletado (cepa Δ *upp*) e em que ambos os genes, *cac15* e *upp*, foram deletados (cepa Δ *Cac15* Δ *upp*).

A presente invenção também se refere ao vetor para transformação da cepa, tal como descrito acima.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 : Mapa do vetor pUC18-FRT-MLS2.

Figura 2 : Mapa do vetor pCons2-1.

Figura 3 : Mapa do vetor pCIP2-1.

Figura 4 : Mapa do vetor pCons::UPP.

Figura 5 : Mapa do vetor pCLF1.

Figura 6 : Representação esquemática do método de deleção para *Clostridia*.

5 As seguintes etapas são realizadas sucessivamente:

A - Amplificação de duas regiões selecionadas em torno da sequência de DNA alvo; 1, 2, 3, 4 representam primers de PCR.

10 B - Clonagem dos fragmentos de PCR obtidos no vetor de clonagem pTOPO.

C - Inserção de um marcador no sítio de restrição *StuI*, presente nos primers de PCR.

D - Clonagem do cassete de substituição no sítio *BamHI* de pCONS 2.1 : construção do vetor pREP clo Y.

15 E - Transformação de *Clostridium* com o vetor pREP clo Y.

F - Integração cromossômica do cassete de substituição através de "crossover" duplo durante subcultura.

G - Seleção de clones com fenotipos Ery^R e Thiam^S.

20 H - Análise por PCR para verificar a substituição de gene e perda do plasmídeo OR.

D' - Clonagem do cassete de substituição no sítio *BamHI* de pCONS::UPP : Construção do vetor pREP clo Y:UPP.

E' - Transformação de *Clostridium Aupp* com o vetor pREP cloY: UPP.

F' - Integração cromossômica do cassete de substituição através de "crossover" duplo durante
5 subcultura.

G' - Seleção de clones com os fenotipos Ery^R e 5-FU^R (Thiam^S).

H' - Análise por PCR para verificar a substituição de gene e perda do plasmídeo.

10 EXEMPLOS

Exemplo 1: Construção de vetores

1.1 Construção do pUC18-FRT-MLS2

Esse plasmídeo contém um gene MLS^r funcional em *Clostridia* e flanqueado por dois sítios FRT e dois sítios
15 *StuI* e é útil para a construção dos cassetes de substituição. Reação em cadeia de polimerase inversa (IPCR) foi realizada com DNA polimerase Pwo com pKD4 como um plasmídeo modelo (Datsenko e Wanner, 2000) e oligonucleotídeos PKD4.1 e PKD4.2 como *primers* para
20 amplificar a região do plasmídeo com os sítios FRT, mas sem o marcador Km^r. Esse fragmento com extremidade cega foi depois ligado ao gene MLS^r obtido após uma digestão com *HindIII* do plasmídeo pETSP0 (Harris e colaboradores, 2002, J. Bacteriol) e tratamento com Klenow. O plasmídeo

correspondente (pKD4-Ery1) foi, então, usado como um template para amplificar o gene MLS^r flanqueado por dois sítios FRT e dois sítios *StuI* em uma reação de PCR usando os oligonucleotídeos FRT-MLSR-F e FRT-MLSR-R como *primers* e DNA polimerase Pwo. Esse fragmento foi diretamente clonado no pUC18 digerido com *SmaI* para produção do plasmídeo pUC18-FRT-MLS2 (Figura 1).

Primers de PCR:

PKD4.1 (SEQ ID N°1):

10 5'-ct**ggcgcc**ctgagtgccttgccggcagcgtgagggg-3'

PKD4.2 (SEQ ID N°2):

5'-ag**cccgagg**atctcatgctggagttcttcgccc-3'

FRT-MLSR-F (SEQ ID N°3):

5'-tac**aggcct**tgagcgattgtgtaggctggagc-3'

15 FRT-MLSR-R (SEQ ID N°4):

5'-aac**aggcct**gggatgtaacgcactgagaagccc-3'

1.2 Construção de pCons 2.1

Esse plasmídeo contém uma origem de replicação pIM13 funcional em *Clostridia* (mecanismo de replicação de rolamento circular), um gene *catP* que confere resistência ao tianfenicol e um sítio *BamHI* único para a clonagem do cassete de substituição. Esse plasmídeo foi construído em um procedimento em duas etapas a partir do plasmídeo pETSP0 (Harris e colaboradores, 2002, J. Bacteriol) para remover

parte de um poli-ligante e, dentre outros, um sítio *Bam*HI e um *Eco*RI. IPCR foi realizada com DNA polimerase Pwo com pETSP0 como um plasmídeo modelo e oligonucleotídeos PCONS*Acc*I e PCONSE*co*RI como *primers*, e o produto de PCR foi
 5 fosforilado e ligado. Após transformação de *E. coli*, o plasmídeo pCons0 foi obtido. Esse plasmídeo foi, então, digerido com *Bam*HI para remover o cassete *spo0A*, o fragmento de DNA apropriado purificado e ligado para produção do plasmídeo pCons2-1. O mapa do pCons2-1 é
 10 fornecido na Figura 2.

Primers de PCR:

PCONS*Acc*I (SEQ ID N°5):

5' - ccg**gggtaccg**tcgacctgcagcc-3'

PCONSE*co*RI (SEQ ID N°6):

15 5' - **gaattccg**cgagctcggtacccggc-3'

1.3 Construção do vetor pCIP 2-1

Nessa construção, a origem de replicação pIM13 do pCons2-1 foi substituída pela origem de replicação do plasmídeo pSOL1, um plasmídeo tendo um mecanismo de
 20 replicação θ . Para essa finalidade, a origem de replicação do pSOL1 foi amplificada por PCR com DNA polimerase Pwo usando DNA total de *Clostridium acetobutylicum* como um modelo e oligonucleotídeos ori-3-D e ori-4-R como *primers*. Esse produto de PCR foi clonado no pCR-BluntII-TOPO e o

plasmídeo resultante digerido por *EcoRI* e o fragmento de 2,2 kb foi purificado. Similarmente, o plasmídeo pCons2.1 foi digerido por *EcoRI* e o fragmento de 2,4 kb purificado e ligado no fragmento *EcoRI* de 2,2 kb contendo a origem de replicação do pSOL1 para proporcionar o plasmídeo pCIP2-1 (Figura 3).

Primers de PCR:

ORI-3-D (SEQ ID N°7):

5'-ccatcgatggggggtcatgcatcaatactatcccc-3'

10 ORI-4-R (SEQ ID N°8):

5'-gcttccctgtttttaataccttttcgg-3'

1.4 Construção do vetor pCons::upp

O gene *upp*, com seu próprio sítio de ligação ribossômica (rbs) foi clonado no pCons2.1 no sítio *BcgI* exatamente a jusante do gene *CatP* de forma a construir um óperon artificial com *upp* expresso sob o controle do promotor de *CatP*. Dessa forma, não foi introduzida nenhuma região homóloga que permitiria integração cromossômica do gene *upp* na cepa $\Delta cac15 \Delta upp$ em outros experimentos de deleção, os quais usam o gene *upp* como um marcador contra-selecionável para perda de plasmídeo. O gene *upp*, com seu rbs, foi amplificado por PCR (Pfu) a partir de DNA genômico de *C. acetobutylicum* usando os oligonucleotídeos REP-UPP F e REP-UPP R como *primers*. O produto de PCR de 664 bp foi

digerido por *PvuII* e clonado no pCons2.1 digerido por *BcgI* e tratado com DNA polimerase T4 para cegar as extremidades. Dessa forma, o vetor replicativo pCons::UPP (veja figura 4) foi obtido.

5 Primers de PCR:

REP-UPP F (SEQ ID N°9):

5'-aaaa**cagctg**gggaggaatgaaataatgagtaaagttacac-3'

REP-UPP R (SEQ ID N°10):

5'-aaaa**cagctg**ttattttgtaccgaataatctatctccagc-3'

10 1.5 Construção do vetor pCLF1

O gene *FLP1* de *S. cerevisiae* que codifica a recombinase FLP foi clonado no vetor pCons2.1 sob o controle do promotor e RBS do gene de tiolase (*thl*) de *C. acetobutylicum*, permitindo alta expressão nesse organismo.

15 O gene *FLP1* foi amplificado por PCR (Pfu) usando os oligonucleotídeos FLP1-D e FLP1-R como *primers* e o plasmídeo pCP20 (Datsenko e Wanner, 2000) como um modelo.

Primers de PCR:

FLP1-D (SEQ ID N°11):

20 5'-aaaa**ggatcc**aaaa**aggaggg**attaaaa**atg**ccacaatttggtatattatgt
aaaacaccacct-3'

FLP1-R (SEQ ID N°12):

5'-aaat**ggcgcc**gcgtacttatatgcgtctatttatgtaggatgaaaggta-
3'

FLP1-D tem uma extensão 5' incluindo um sítio *Bam*HI e a sequência RBS de *thl*. FLP1-R introduziu um sítio *Sfo*I em 3' do produto de PCR. O produto de PCR foi digerido por *Bam*HI e *Sfo*I e diretamente clonado no vetor de expressão pSOS95 que tinha sido digerido com as mesmas enzimas, proporcionando o plasmídeo **pEX-FLP1** (6281 bp). O fragmento *Sal*I (1585 bp) do pEX-FLP1 contendo o cassete de expressão FLP1 foi clonado no sítio *Sal*I do pCONS2.1 para obter o plasmídeo **pCLF1** (4878 bp) (Figura 5).

10 **Exemplo 2: Deleção do gene *cac1502* que codifica a enzima de restrição *cac824I* em *Clostridium acetobutylicum*.**

Veja figura 6 para uma representação esquemática do método.

Dois fragmentos de DNA que envolvem o gene de codificação de *Cac824I* (*CAC1502*) foram amplificados por PCR com DNA polimerase *Pwo* usando DNA total de *C. acetobutylicum* como modelo e dois pares específicos de oligonucleotídeo como *primers* (veja tabela 2). Usando pares de *primers* CAC 1B-CAC 2 e CAC 3-CAC 4B, fragmentos de DNA de 1493 bp e 999 bp foram obtidos, respectivamente. Ambos os *primers*, CAC 1B e CAC 4B, introduzem um sítio *Bam*HI, enquanto que os *primers* CAC 2 e CAC 3 têm sequências estendidas 5' complementares as quais introduzem um sítio *Stu*I. Fragmentos de DNA CAC 1B-CAC 2 e CAC 3-CAC 4B foram

unidos em um experimento de fusão por PCR com os *primers* CAC 1B e CAC 4B e o fragmento resultante foi clonado no vetor pCR4-TOPO-Blunt para produzir pTOPO:cac15. No sítio *StuI* único do pTOPO:cac15, o fragmento *StuI* de 1372 bp do pUC18-FRT-MLS2, abrigando o gene de resistência a 5 antibiótico MLS^r com seqüências FRT sobre ambos os lados, foi introduzido. O cassete de substituição *cac1502* obtido após digestão com *BamHI* do plasmídeo resultante foi clonado, no *BamHI*, no sítio pCons2-1, para produção do 10 plasmídeo pREPCAC15 e no pCIP2.1 para produzir pCIPCAC15.

Os plasmídeos pREPCAC15 e pCIPCAC15 foram metilados *in vivo* e usados para transformar *C. acetobutylicum* através de eletroporação. Após seleção sobre Placas de Petri de clones resistentes à eritromicina (40 µg/ml), uma colônia de cada 15 transformante foi cultivada durante 24 horas em meio sintético líquido com eritromicina a 40 µg/ml e, então, subcultivado em meio 2YTG líquido sem antibiótico. Diluições apropriadas foram colocadas sobre agar *Clostridium* reforçado (RCA) com eritromicina a 40 µg/ml. 20 Para selecionar integrantes tendo perdido os vetores pREPCAC15 ou pCIPCAC15, clones resistentes à eritromicina foram colocados em réplica sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml e RCA com tianfenicol a 50 µg/ml. Embora várias colônias com o fenotipo desejado fossem obtidas com os

transformantes pREPCAC15, nenhuma de tais colônias foi obtida com os transformantes pCIPCAC15. Isso demonstra que o mecanismo de replicação θ do pCIPCAC15 é menos favorável ao promover "crossover" duplo em *C. acetobutylicum* do que um mecanismo de rolamento circular. O genotipo de clones resistentes à eritromicina e sensíveis ao tianfenicol foi verificado através de análise por PCR (com os primers CAC 0 e CAC 5 localizados fora do cassete de substituição CAC15 e os primers CAC D e CAC R localizados dentro do *cac1502*). Cepas $\Delta cac15::mls^R$, as quais perderam pREPCAC15, foram isoladas.

Uma cepa $\Delta cac15::mls^R$ foi transformada com o vetor pCLF1 expressando o gene *FLP1* que codifica a recombinase Flp de *S. cerevisiae*. Após transformação e seleção de resistência ao tianfenicol (50 $\mu\text{g/ml}$) sobre placas de Petri, uma colônia foi cultivada sobre meio líquido sintético com tianfenicol a 50 $\mu\text{g/ml}$ e diluições apropriadas foram colocadas sobre RCA com tianfenicol a 50 $\mu\text{g/ml}$. Clones resistentes ao tianfenicol foram colocados em réplica sobre RCA com eritromicina a 40 $\mu\text{g/ml}$ e RCA com tianfenicol a 50 $\mu\text{g/ml}$. O genotipo de clones com sensibilidade à eritromicina e resistência ao tianfenicol

foi verificado através de análise por PCR com os primers CAC 0 e CAC 5B.

Duas culturas sucessivas de 24 horas da cepa $\Delta cac15$ com sensibilidade à eritromicina e resistência ao tianfenicol foram realizadas de forma a liberar o pCLF1. A cepa $\Delta cac15$, a qual perdeu pCLF1, foi isolada de acordo com sua sensibilidade à eritromicina e tianfenicol. A cepa foi denominada *C. acetobutylicum* MGC $\Delta cac15$.

Tabela 2

Nome	SEQ ID NO:	Seqüências de Primer
CAC 1B	13	aa aggatcc atgcacactcataaatttactgtaggaagtctg'
CAC 2	14	ggggaggcctaaaaaggggggtcccaaataatatttgccat agtaaccacc
CAC 3	15	Cccctttttt aggcct cccctcgaacttattagaatgattaag attccgg
CAC 4B	16	aa aggatcc tcattaaatttcctccattttaagcctgtc
CAC 0	17	gtgatataattttcctttaaatggaggaggatctg
CAC 5B	18	gccgttaatagacattataattccattggc
CAC D	19	gaattcttaaaaaatatttgatcattaagcgg
CAC R	30	gttgattggaatctttgttattatttctccc

Exemplo 3: Deleção do gene *upp* que codifica a fosforibosil-transferase de uracila em *Clostridium acetobutylicum* Δ cac15

Dois fragmentos de DNA a montante e a jusante do *upp* (CAC2879) foram amplificados por PCR com DNA polimerase Pwo usando DNA total de *C. acetobutylicum* como modelo e dois pares específicos de oligonucleotídeos como *primers* (veja tabela 3). Com os pares de *primer* UPP 1-UPP 2 e UPP 3-UPP 4, fragmentos de DNA de 1103 bp e 1105 bp foram obtidos, respectivamente. Ambos os *primers* UPP 1 e UPP 4 introduzem um sítio *Bam*HI, enquanto que os *primers* UPP 2 e UPP 3 têm seqüências estendidas 5' as quais introduzem um sítio *Stu*I. Fragmentos de DNA UPP 1-UPP 2 e UPP 3-UPP 4 foram unidos em um experimento de fusão por PCR com os *primers* UPP 1 e UPP 4 e o fragmento resultante foi clonado no pCR4-TOPO-Blunt para produzir pTOPO:*upp*. No sítio *Stu*I único do pTOPO:*upp*, o fragmento *Stu*I de 1372 bp do pUC18-FRT-MLS2, abrigando o gene de resistência a antibiótico MLS^r com seqüências FRT sobre ambos os lados, foi introduzido. O cassete de substituição *upp* obtido após digestão por *Bam*HI do plasmídeo resultante foi clonado no pCons2-1 no sítio *Bam*HI para produzir o plasmídeo pREPUPP.

O plasmídeo pREPUPP foi usado para transformar a cepa MGC Δ cac15 de *C. acetobutylicum* através de eletroporação sem

metilação prévia *in vivo*. Após seleção sobre placas de Petri de clones resistentes à eritromicina (40 µg/ml), uma colônia foi cultivada durante 24 horas em meio sintético líquido com eritromicina a 40 µg/ml e, então, subcultivada em meio líquido 2YTG sem antibiótico. Diluições apropriadas foram colocadas sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml. Para selecionar integrantes tendo perdido o vetor pREPUPP, clones resistentes à eritromicina foram colocados em réplica sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml e RCA com tianfenicol a 50 µg/ml. O genotipo de clones resistentes à eritromicina e sensíveis a tianfenicol foi verificado através de análise por PCR (com os primers UPP 0 e UPP 5 localizados fora do cassette de substituição UPP e os primers UPP D e UPP R localizados dentro do UPP). A cepa $\Delta cac15 \Delta upp::m1s^R$, que tinha perdido o pREPUPP, foi isolada. A deleção prévia de *cac1502* foi confirmada conforme anteriormente descrito no primeiro exemplo. A cepa $\Delta cac15 \Delta upp::m1s^R$ é resistente a 5-FU a 400 µM comparado com 50 µM para a cepa $\Delta cac15$.

A cepa $\Delta cac15 \Delta upp::m1s^R$ foi transformada com o vetor pCLF1 expressando o gene *FLP1* que codifica a recombinase Flp de *S. cerevisiae*. Após transformação e seleção de resistência ao tianfenicol (50 µg/ml) sobre placas de

Petri, uma colônia foi cultivada em meio líquido sintético com tianfenicol a 50 µg/ml e diluições apropriadas foram colocadas sobre RCA com tianfenicol a 50 µg/ml. Clones resistentes ao tianfenicol foram colocados em réplica sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml e RCA com tianfenicol a 50 µg/ml. O genotipo de clones com sensibilidade à eritromicina e resistência ao tianfenicol foi verificado através de análise por PCR com os *primers* UPP 0 e UPP 5. Duas culturas sucessivas de 24 horas da cepa $\Delta cac15\Delta upp$ com sensibilidade à eritromicina e resistência ao tianfenicol foram realizadas de forma a liberar o pCLF1. A cepa $\Delta cac15\Delta upp$, que tinha perdido o pCLF1, foi isolada através de determinação de sua sensibilidade à eritromicina e tianfenicol.

15 Tabela 3

Nome	SEQ ID NO:	Seqüências de Primer
UPP 1	21	aaaaggatcctcctgatctattaattcttgatgaaccc
UPP 2	22	ggggaggcctaaaaagggggattgcataaataaaaagggctgaa aaataaatttcag
UPP 3	23	cccccttttttaggcctccccttatttcattcctccattgtat tttttctatttg
UPP 4	24	aaaaggatccgctattatgaataggttaaataagtcagctgg

UPP 0	25	aatacaagcaaagagaataggctatgtgcc
UPP 5	26	aatacaagcaaagagaataggctatgtgcc
UPP D	27	ggcatatgaagtaacaagagaaatgcagc
UPP R	28	ataatctatctccagcatctccaagacc

Exemplo 4 : Deleção do gene *cac3535* com o uso de *upp* e 5-fluorouracila como uma possível seleção de perda de plasmídeo

5 Dois fragmentos de DNA a montante e a jusante do gene *cac3535* que codifica um segundo sistema de modificação-restrição de *C. acetobutylicum* foram amplificados por PCR com DNA polimerase Pwo usando DNA total de *C. acetobutylicum* como modelo e dois pares específicos de

10 oligonucleotídeos (veja tabela 4). Com os pares de *primer* RM 1-RM 2 e RM 3-RM 4, fragmentos de DNA de 1 kbp e 0,9 kbp foram obtidos, respectivamente. Ambos os *primers* RM 1 e RM 4 introduzem um sítio *Bam*HI, enquanto que os *primers* RM 2 e RM 3 têm seqüências estendidas 5' complementares que

15 introduzem um sítio *Stu*I. Fragmentos de DNA RM 1-RM 2 e RM 3-RM 4 foram unidos em um experimento de fusão por PCR usando os *primers* RM 1 e RM 4 e o fragmento resultante foi clonado no vetor pCR4-TOPO-Blunt para produzir o plasmídeo pTOPO:*cac3535*. No sítio *Stu*I único do pTOPO:*cac3535*, o

20 fragmento *Stu*I de 1372 bp do pUC18-FRT-MLS2, abrigando o

gene de resistência a antibiótico MLS^r com seqüências FRT sobre ambos os lados, foi introduzido. O cassete de substituição CAC3535 obtido após digestão com *Bam*HI do plasmídeo resultante foi clonado no pCons::upp no sítio

5 *Bam*HI para proporcionar o plasmídeo pREPCAC3535::upp.

O plasmídeo pREPCAC3535::upp foi usado para transformar a cepa MGCAcac15 Δ upp de *C. acetobutylicum* através de eletroporação. Após seleção de clones resistentes à eritromicina (40 µg/ml) sobre placas de

10 Petri, uma colônia foi cultivada durante 24 horas em meio sintético líquido com eritromicina a 40 µg/ml e 100 µl de cultura não diluída foram colocados sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml e 5-FU a 400 µM. Colônias resistentes à eritromicina e 5-FU foram colocadas em

15 réplica sobre RCA com eritromicina a 40 µg/ml e RCA com tianfenicol a 50 µg/ml para verificar se a resistência à 5-FU está associada à sensibilidade ao tianfenicol. O genótipo de clones resistentes à eritromicina e sensíveis ao tianfenicol foi verificado através de análise por PCR

20 (com os primers RM 0 e RM 5 localizados fora do cassete de substituição cac3535 e os primers RM D e RM R localizados dentro do gene cac3535). Dessa forma, a cepa Δ cac15 Δ upp Δ cac35::mls^R, que perdeu o pREPCAC3535::upp, foi isolada.

Tabela 4

Nome	SEQ ID NO:	Seqüências de Primer
RM 1	29	aaaaggatccgcagctttctggaaggactacggcg
RM 2	30	ggggaggcctaaaaagggggcatttacttatggtacgggtcacccc
RM 3	31	cccccttttttaggcctccccgtctttaaaaagtaatttatcaaaggca tcaaggc
RM 4	32	cccccttttttaggcctccccgtctttaaaaagtaatttatcaaaggca tcaaggc
RM 0	33	cacattgtcatttataaaaagtccttaggg
RM 5	34	gtagtaattccaacttcaactcttgccac
RM D	35	cttagaatagctgatattgcttgcg
RM R	36	agcatctctcttaatgattctcgg

REFERÊNCIAS**Bennett GN, Scotcher MC**

5 BLOCKING SPORULATION BY INHIBITING SPOIIE

WO2006007530 publicado em 19/01/2006

Requerente: RICE UNIVERSITY (US)

Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E.

High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J Bacteriol. Junho de 1993; 175(11): 3628-35.

Datsenko KA, Wanner BL.

- 5 One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 de Junho de 2000; 97(12): 6640-5.

Fabret C, Ehrlich SD, Noirot P.

- A new mutation delivery system for genome-scale approaches
10 in Bacillus subtilis. Mol Microbiol. Outubro de 2002; 46(1): 25-36.

Girbal L, Mortier-Barriere I, Raynaud F, Rouanet C, Croux C, Soucaille P.

- Development of a sensitive gene expression reporter system
15 and an inducible promoter-repressor system for Clostridium acetobutylicum. Appl Environ Microbiol. Agosto de 2003; 69(8): 4985-8.

Green EM, Bennett GN.

- Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from
20 Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Appl Biochem Biotechnol. Primavera de 1996; 57-58: 213-21.

Green EM, Boynton ZL, Harris LM, Rudolph FB, Papoutsakis ET, Bennett GN.

Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Microbiology. Agosto de 1996; 142 (Pt 8): 2079-86.

Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET.

- 5 Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J Bacteriol. Julho de 2002; 184(13): 3586-97.

Huang IH, Waters M, Grau RR, Sarker MR.

- 10 Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. FEMS Microbiol Lett. 15 de Abril de 2004; 233(2): 233-40.

- 15 **Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN, Papoutsakis ET.**

Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Biotechnology (N Y). Fevereiro de 1992; 10(2): 190-5.

Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T.

- 20 The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol. Abril de 2002; 44(1): 171-9.

Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R.

Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. Infect Immun. Setembro de 1998; 66(9): 4011-7. Revisão.

Sarker MR, Carman RJ, McClane BA.

- 5 Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive C. perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. Mol Microbiol. Setembro de 1999; 33(5): 946-58. Errata em: Mol
- 10 Microbiol. Janeiro de 2000; 35(1): 249.

Varga J, Stirewalt VL, Melville SB.

The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (cpe) regulation in Clostridium perfringens. J Bacteriol. Agosto de 2004; 186(16): 5221-9

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a substituição de uma sequência de DNA alvo através de recombinação homóloga em *Clostridia* **caracterizado pelo** fato de compreender:

- transformar a referida cepa com um vetor compreendendo:

- uma origem de replicação que permite sua replicação em *clostridia*, e

- um cassete de substituição compreendendo um primeiro gene marcador envolvido por duas sequências homólogas às regiões selecionadas em torno da sequência de DNA alvo, permitindo a recombinação do cassete, e

- um segundo gene marcador, em que o segundo gene marcador é um marcador contra-selecionável,

- selecionar as cepas, tendo integrado em seu genoma o referido cassete, que expressam o primeiro gene marcador,

- selecionar as cepas, tendo eliminado o referido vetor, que não expressam o segundo gene marcador.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o marcador contra-selecionável ser um gene que restaura a atividade de um gene não essencial ausente ou deletado.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que o marcador contra-selecionável ser o gene *upp*.

4. Processo, de acordo com a reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que o vetor compreender um terceiro marcador que permite uma seleção negativa de cepas tendo eliminado o referido vetor.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que o

primeiro gene marcador ser um gene de resistência a antibiótico.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que o primeiro gene marcador ser envolvido por dois sítios alvo de recombinase.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que o primeiro gene marcador ser eliminado pela ação de uma recombinase após o evento de recombinação homóloga ter ocorrido.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 ou 7, **caracterizado pelo** fato de que a referida recombinase ser expressa por um gene trazido por um segundo vetor introduzido na cepa.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 7, **caracterizado pelo** fato de que os referidos sítios alvo de recombinase serem sequências FRT, e a referida recombinase ser a FLP recombinase.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado pelo** fato de que as Clostridia a serem transformadas sofrerem deleção para genes que codificam de endonuclease de restrição.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo** fato de que as Clostridia a serem transformadas sofrerem deleção para genes que codificam DNase.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado pelo** fato de que as Clostridia a serem transformadas sofrerem deleção para o gene *upp*.

13. Processo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 12, **caracterizado pelo** fato de que as cepas de *Clostridium* serem escolhidas entre *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium bejeirincii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium saccharolyticum* *Thermoanaerobacter saccharolyticum*), *Clostridium thermosulfurogenes* (agora *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (agora *Thermoanaerobacter ethanolicus*).

14. Processo, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado pelo** fato de que a cepa de *Clostridium* ser *Clostridium acetobutylicum*.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que a cepa de *Clostridium acetobutylicum* a ser transformada é Δcac15 , em que o gene *CAC1502* é deletado.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que a cepa de *Clostridium acetobutylicum* a transformar é Δupp .

17. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que a cepa de *Clostridium acetobutylicum* a transformar é ΔCac15 , em que o gene *CAC1502* é deletado, Δupp .

18. Processo para a substituição de dois ou mais genes alvo através de recombinação homóloga em uma mesma cepa de *Clostridium*, **caracterizado pelo** fato de que o processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17 é realizado sucessivamente duas ou mais vezes.

19. Cepa recombinante de *Clostridium* **caracterizada pelo**

fato de ser passível de ser obtida pelo processo conforme definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 18, em que o gene *CAC1502* e/ou gene *upp* foi deletado.

20. Vetor para a substituição de uma sequência de DNA alvo por recombinação homóloga em *Clostridia*, **caracterizado por** compreender:

- uma origem de replicação que permite a sua replicação em *Clostridia*, e

- um cassete de substituição que compreende um primeiro gene marcador rodeado por duas sequências homólogas a regiões selecionadas em torno da sequência de DNA alvo, permitindo a recombinação do cassete e

- um segundo gene marcador, em que o segundo gene marcador é o gene *upp*, o qual é um marcador contra-selecionável.

21. Vetor, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado pelo** fato de que o marcador contra-selecionável é um gene que restaura a atividade de um gene ausente não essencial ou deletado.

22. Vetor, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que o marcador contra-selecionável é o gene *upp*

23. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, **caracterizado pelo** fato de que o vetor compreende um terceiro marcador que permite uma seleção negativa de cepas que eliminaram o referido vetor.

24. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, **caracterizado pelo** fato de que abriga sequências de DNA que são reconhecidas por endonucleases de restrição e que estão ao mesmo tempo ausentes do genoma da cepa de *Clostridium* utilizada.

25. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 24, **caracterizado pelo** fato de que o primeiro gene marcador é um gene de resistência a antibióticos.

26. Vetor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 25, **caracterizado pelo** fato de que o primeiro gene marcador está rodeado por dois sítios alvo de recombinase.

27. Vetor, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de que os referidos sítios alvo de recombinase são sequências de FRT, e a referida recombinase é a FLP recombinase.

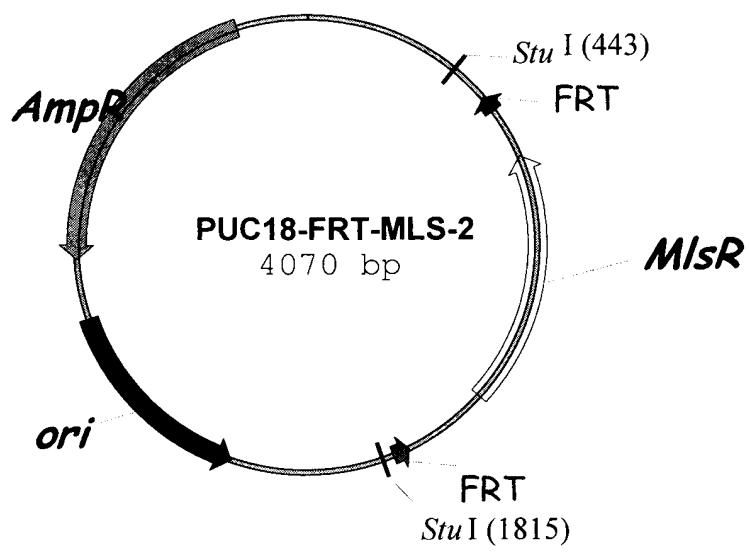


FIGURA 1

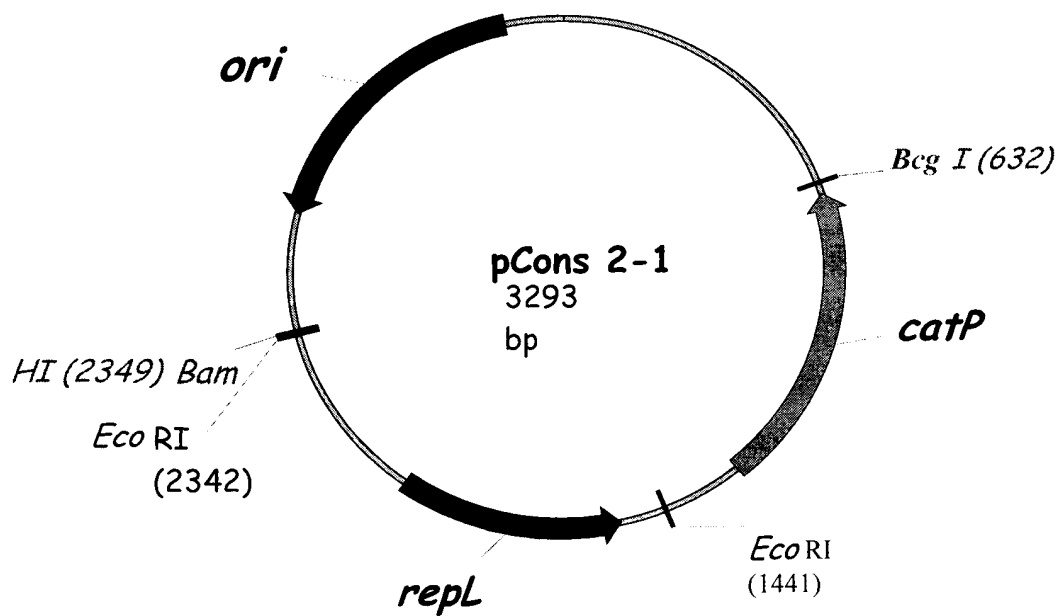


FIGURA 2

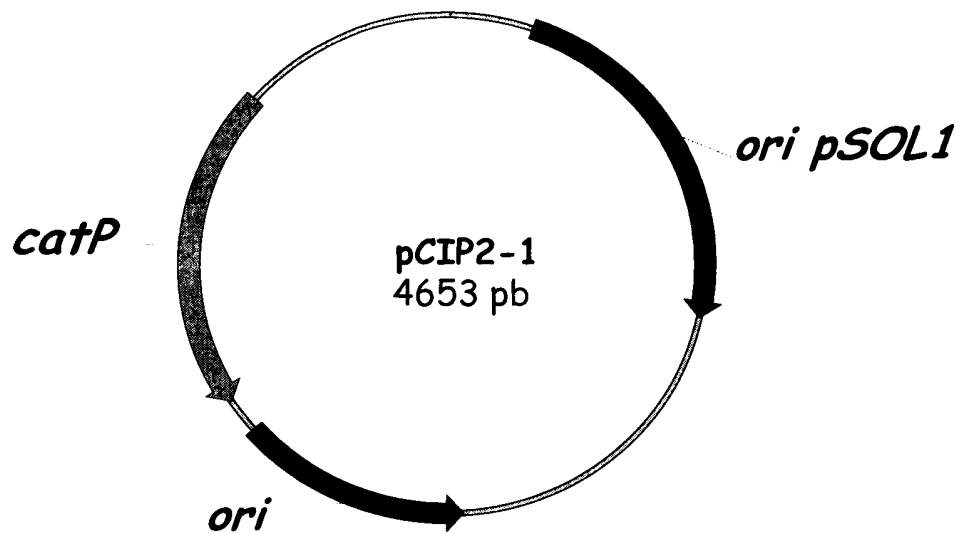


FIGURA 3

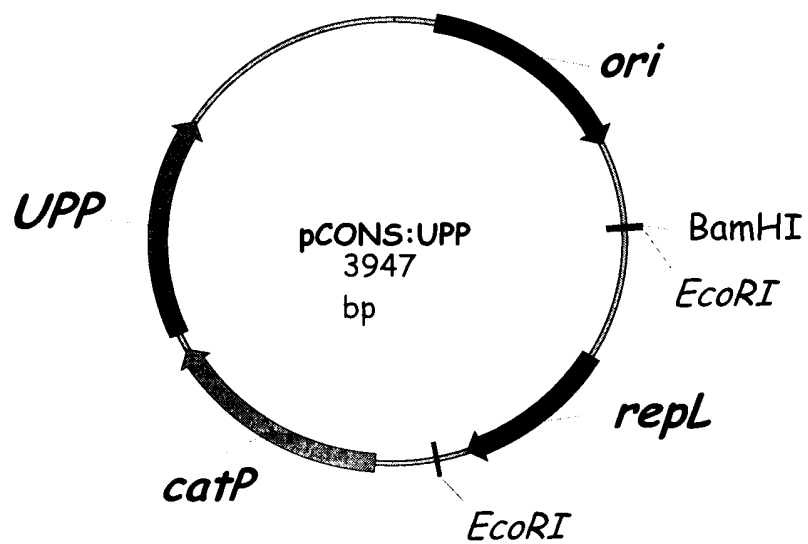


FIGURA 4

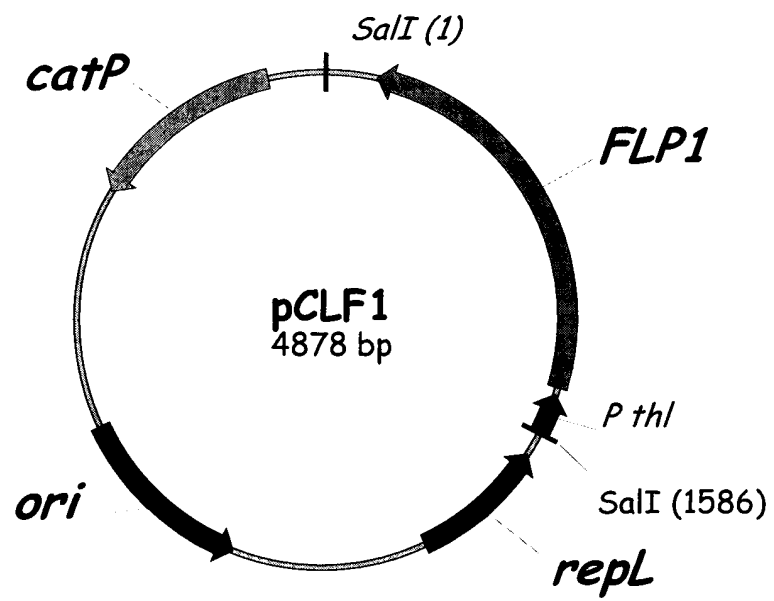


FIGURA 5

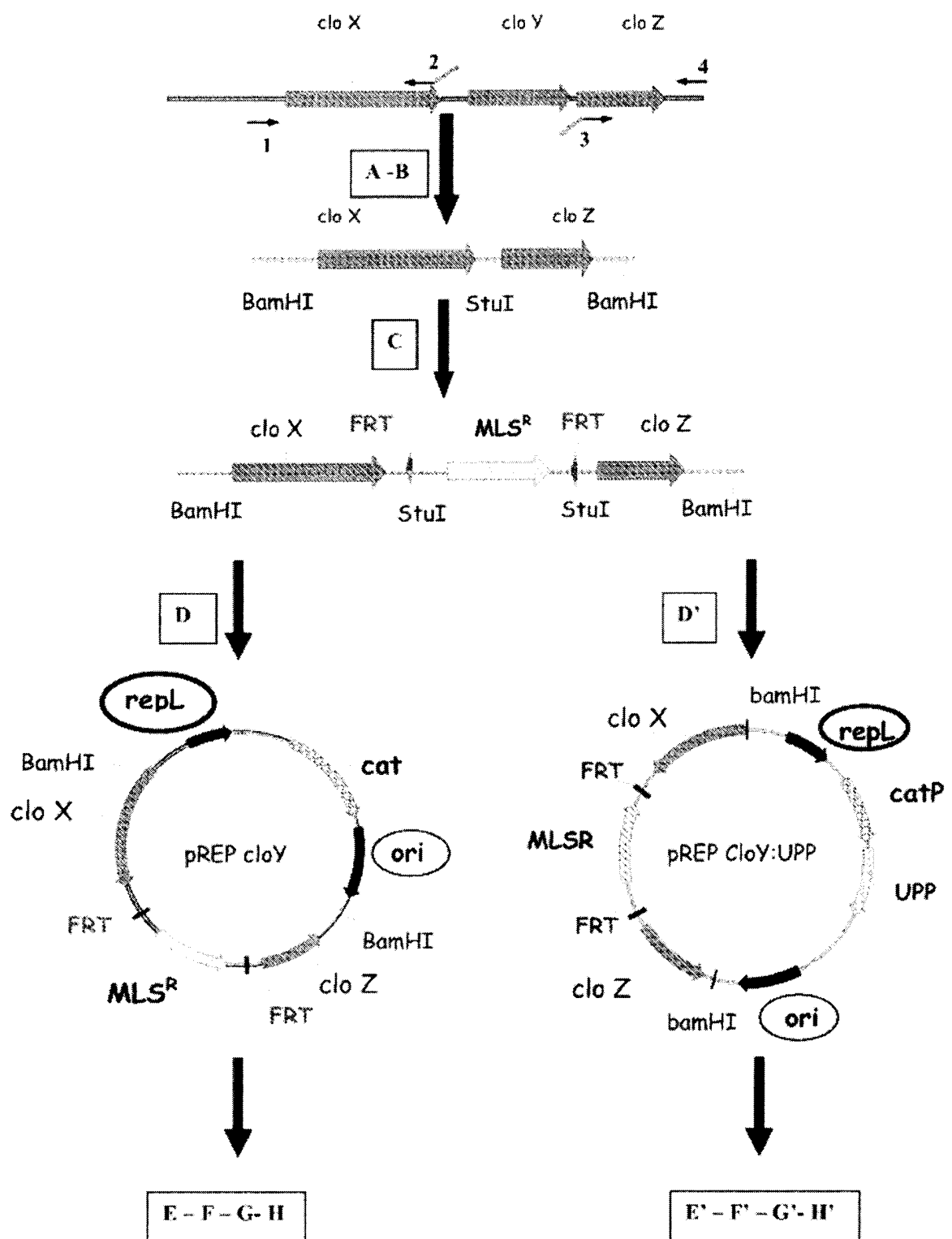


FIGURA 6