



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 187**

51 Int. Cl.:
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99961158 .5**
96 Fecha de presentación : **23.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1141337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Bacterias Gram positivas desprovistas de actividad de proteasa HtrA y sus utilizaciones.**

30 Prioridad: **24.12.1998 FR 98 16462**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

73 Titular/es: **Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA)
147, rue de l'Université
75338 Paris Cédex 07, FR**

72 Inventor/es: **Poquet, Isabelle;
Gruss, Alexandra;
Bolotine, Alexandre y
Sorokine, Alexei**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 357 187 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacterias gram positivas desprovistas de actividad de proteasa htra y sus utilizaciones

La invención se refiere a la producción, en bacterias Gram positivas, de proteínas exportadas.

5 Se designa con la expresión general de: “proteínas exportadas”, a proteínas que son transportadas a través de la membrana citoplasmática. En el caso de las bacterias Gram positivas, este transporte desemboca en la secreción de la proteína al medio, o en su asociación con la superficie celular.

10 Uno de los principales problemas que se plantea durante la producción de proteínas de interés exportadas por bacterias huésped, reside en la degradación de estas proteínas durante y/o después de su exportación, a nivel de la envuelta o de la superficie de la célula. Esta degradación conlleva a menudo una disminución del rendimiento, y/o una alteración de la estructura y de la actividad de la proteína.

15 Las enzimas responsables de esta degradación de las proteínas exportadas, son proteasas bacterianas exportadas a su vez a la envuelta; se trata de proteínas llamadas: “constitutivas”, que tienen normalmente entre sus funciones principales un papel de degradación de proteínas exportadas anormales o mal plegadas que se acumulan en el medio o en la envuelta, particularmente en condiciones de estrés, así como un papel de reciclado de las proteínas exportadas.

20 Las proteínas heterólogas, que son a menudo reconocidas de forma imperfecta por las proteínas chaperonas que intervienen en el plegamiento de las proteínas en la bacteria huésped son particularmente sensibles al ataque de estas proteasas.

25 La proteasa constitutiva exportada caracterizada con más antigüedad es la serina proteasa HtrA/DegP de *E. coli*. Se trata de una proteasa de localización periplasmática, que se expresa bajo el control de un promotor inducible a alta temperatura; BECKWITH y STRAUCH (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1576-1580, 1988) observaron que ésta intervenía en la proteólisis de proteínas de fusión entre proteínas exportadas de *E. coli* y el informador de la exportación PhoA. Propusieron inactivar esta proteasa en *E. coli* para limitar la degradación de las proteínas heterólogas exportadas.

30 De este modo se obtuvieron cepas mutantes de *E. coli*, en las que el gen que codifica la proteasa HtrA/DegP se había inactivado [BECKWITH y STRAUCH, publicación mencionada anteriormente, y Solicitud PCT W088/05821]; sin embargo se ha constatado que esta inactivación se traduce en una ralentización de la cinética de degradación, pero no es suficiente para suprimirla, debido a la existencia en la envuelta de otras proteasas que degradan a las proteínas exportadas.

35 En *E. coli*, se han caracterizado varias proteasas constitutivas de la envuelta, que aseguran funciones similares a las de HtrA/DegP: se trata particularmente de las proteasas HhoA/DegQ y HhoB/DegS, estructuralmente homólogas a HtrA/DegP, y de proteasas de estructura diferente pero funcionalmente comparables (ApeA/proteasa I, OmpT, OmpP, Prc/Tsp, SppA/proteasa IV, PrtIII y SohB).

Estudios concernientes a otras bacterias también permitieron demostrar la existencia en cada especie estudiada, de varias proteasas constitutivas exportadas. Por ejemplo, muchas especies bacterianas poseen varias proteasas de la familia HtrA (PALLEN y WREN, Mol. Microbiol. 19: 209-21), tres homólogos de HtrA se identificaron en *B. subtilis* (YyxA, YkdA y YvtB/Yirf), *Synechocystis* (HtrA, HhoA y HhoB), *Pseudomonas aeruginosa* y *Aquifex aeolicus*, dos en *Haemophilus influenzae* (HtoA y HhoB), *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus* y *Yersinia enterocolitica*, y cuatro en *Mycobacterium tuberculosis*. Diversas bacterias Gram positivas también poseen serina proteasas consideradas como emparentadas con la familia HtrA, en base a una homología a nivel del dominio catalítico: EtA, EtB, V8/StsP de *S. aureus*, GseP de *Bacillus licheniformis* y Spro de *Mycobacterium paratuberculosis* (KOONIN et al., Cap 117 en *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 2203-17, 1997). Finalmente, proteasas exportadas no emparentadas con HtrA, también se han descubierto, por ejemplo en *B. subtilis* (MARGOT y KARAMATA, Microbiology, 142: 3437- 44, 1996; STEPHENSON y HARWOOD Appl. Environn. Microbiol. 64: 2875-2881, 1998; WU et al. J. Bacteriol. 173: 4952-58, 1991).

Se ha propuesto, por lo tanto, combinar mutaciones que afectan a varias proteasas exportadas, para conseguir una reducción efectiva de la degradación de las proteínas heterólogas exportadas.

Por ejemplo, una cepa de *E. coli* mutada en los genes *degP/htrA*, *ompT*, *prt* y *prc* (MEERMAN y GEORGIU, Bio/technology 12: 1107-10, 1994), y una cepa de *B. subtilis* deficiente en las seis proteasas extracelulares (WU et al., 1991, publicación mencionada anteriormente), se construyeron con este fin. Sin embargo, la utilización de estas cepas no permite eliminar totalmente la proteólisis de las proteínas exportadas. Por ejemplo, en el caso de la cepa de *B. subtilis* descrita por WU et al., aunque la actividad de proteasa extracelular residual sea despreciable (<1%), la degradación de las proteínas heterólogas exportadas sigue siendo importante. Para paliar este problema, este mismo equipo aportó modificaciones suplementarias a esta cepa, para hacerla sobreproducir diversas chaperonas (WU et al., J. Bacteriol. 180: 2830-35, 1998). Además, aunque la inactivación del gen de una de estas proteasas constitutivas exportadas no tenga consecuencias notables sobre la bacteria, el cúmulo de las mutaciones puede afectar a la viabilidad de las cepas; MEERMAN y GEORGIU, (1994, publicación mencionada anteriormente) observan de este modo una disminución de la tasa de crecimiento que puede llegar hasta el 50%.

En las bacterias lácticas, solamente algunas proteasas exportadas han sido objeto de estudios; la mejor caracterizada actualmente es la proteasa denominada PrtP (KOK, FEMS Microbiol. Reviews 87: 15-42, que se localiza en la superficie celular, donde está anclada al peptidoglicano. Esta proteasa está presente en muchas bacterias lácticas, particularmente *Lactococcus lactis*, donde su gen es plasmídico. Ésta participa de la nutrición nitrogenada de las bacterias, degradando las caseínas de la leche. Otras proteasas de superficie se purificaron a partir de dos especies de bacterias lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*, pero su función no se ha determinado. (STEFANITSI et al., FEMS Microbiol. Lett. 128: 53-8, 1995; STEFANITSI y GAREL,

Lett. Appl. Microbiol. 24: 180-84, 1997; YAMAMOTO, et al., J. Biochem. 114: 740-45, 1993). Recientemente, un gen inducible por el estrés que codifica una proteína fuertemente homóloga a las proteasas de la familia HtrA se ha descubierto en *Lactobacillus helveticus* (SMEDS et al., J. Bacteriol. 180: 6148-53, 1998). Se ha observado que este gen era necesario para la supervivencia a temperatura elevada; se construyó una cepa mutante de *Lactobacillus helveticus* en la que el gen *htrA* se ha inactivado mediante la inserción de un gen informador (*gusA*, que codifica β -glucuronidasa) bajo el control del promotor *htrA*. El estudio de la expresión del gen *gusA* en este mutante permitió demostrar una inducción de la transcripción de este gen en las mismas condiciones que la del gen *htrA* en las cepas silvestres; por el contrario, no se observó ninguna actividad de β -glucuronidasa.

10 Durante trabajos anteriores que pretenden caracterizar proteínas exportadas de *Lactococcus lactis* mediante el estudio de proteínas de fusión con el informador de exportación $\Delta_{sp}Nuc$ (POQUET et al., J. Bacteriol. 180: 1904-12, 1998), el equipo de los inventores observó una importante proteólisis extracelular, aunque los experimentos se habían realizado en una cepa de *L. lactis* subesp. *cremoris* desprovista de cualquier plásmido, y por lo tanto en particular del que porta *prtP*.

15 Los Inventores decidieron buscar las proteasas extracelulares responsables de esta proteólisis.

De este modo descubrieron, en *L. lactis*, la existencia de un gen de la familia *htrA*. Este gen, encontrado en el genoma de la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis*, codifica una proteína de 408 aminoácidos, denominada en lo sucesivo HtrA_{LI} cuya secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos se representan en la figura 1, y figuran en la lista de secuencias en el anexo (SEC ID N° 1). Esta proteína es muy homóloga de HtrA de *E. coli*, y de diversos otros miembros conocidos de la familia HtrA, como muestra la Tabla I a continuación, que ilustra los porcentajes de identidad y de similitud entre HtrA_{LI} y diferentes proteínas de la familia HtrA:

TABLA I

Proteína	Organismo	% de identidad	% de similitud
HtrA/DegP/proteasa Do	<i>E. coli</i>	31,5	38,2
HhoA/DegQ	<i>E. coli</i>	34,0	40,8
HhoB/DegS	<i>E. coli</i>	29,9	37,3
HtrA	<i>S. typhimurium</i>	32,4	39,1
HtoA	<i>H. influenzae</i>	31,9	39,2
HhoB/DegS	<i>H. influenzae</i>	31,2	40,0
spHtrA	<i>S. pneumoniae</i>	55,6	62,0
HtrA	<i>Lb. helveticus</i>	46,9	54,1
YyxA	<i>B. subtilis</i>	43,5	52,0
YkdA	<i>B. subtilis</i>	42,5	49,4

25

La proteína HtrA de la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis* posee los tres aminoácidos Ser, His y Asp, que definen el sitio catalítico característico de las serina proteasas emparentadas con la tripsina, entre las cuales la familia HtrA; además esta proteína presenta, en torno a estos tres aminoácidos, los tres motivos siguientes: DAYVVTNYH₁₂₇VI, D₁₅₇LAVLKIS, y GNS₂₃₉GGALINIEGQVIGIT, que corresponden a los consensos definidos por PALLÉN y WREN (Mol. Microbiol. 19: 209-21, 1997) para el dominio catalítico de las proteasas HtrA: GY--TN-HV-, D-AV---- y GNSGG-L-N-G--IGIN.

Ésta posee en su extremo N-terminal una secuencia de aminoácidos hidrófobos L₁₀LTGVVGGAIALGGSAL₂₆ que corresponde a un supuesto segmento transmembrana. La proteína HtrA_{LI} de *L. lactis* subesp. *lactis* sería, por lo tanto, una proteína integrante de la membrana citoplasmática. De acuerdo con la regla llamada “de la parte positiva en el interior” concerniente a la topología de estas proteínas (VON HEIJNE, Nature, 341: 456-8, 1989) su topología corresponde al tipo “C-out”, es decir que su parte C-terminal, que comprende en particular su sitio catalítico, estaría expuesta al exterior de la membrana plasmática. Al igual que la proteasa HtrA de *E. coli*, HtrA_{LI} de *L. lactis* subesp. *lactis* aparece por lo tanto como una proteasa de la envuelta, que puede degradar proteínas exportadas. Los aminoácidos del dominio catalítico y del dominio transmembrana están enmarcados en la figura 1.

Los Inventores procedieron a la inactivación de este gen mediante mutación; a temperatura óptima (30°C), la cepa mutante de *L. lactis* subesp. *lactis* obtenida de este modo es viable y crece normalmente; por el contrario su crecimiento y su viabilidad resultan afectados a temperaturas más altas (a partir de 37°C), tanto en placa como en medio líquido.

Además, los Inventores estudiaron el efecto de esta mutación sobre la exportación de diferentes proteínas de fusión, y constataron que la inactivación de la proteasa HtrA_{LI} en *L. lactis* bastaba para suprimir totalmente la degradación de las proteínas exportadas; este efecto es sorprendente, teniendo en cuenta la proteólisis residual observada anteriormente en otras bacterias después de la inactivación de proteasas de la familia HtrA.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la producción de una proteína de interés, **caracterizado por que** comprende el cultivo de una bacteria que expresa dicha proteína de interés, y la obtención de dicha proteína de interés exportada por la bacteria, **caracterizado por que** dicha bacteria es una bacteria gram positiva seleccionada entre *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae*, del género *Listeria*, y *Enterococcaceae*, del género *Enterococcus*, cuya proteasa de superficie HtrA está inactivada por mutación. Ventajosamente, dicha bacteria se selecciona entre los lactococos.

Ventajosamente, dicha cepa bacteriana también puede comprender una o más modificaciones diferentes de su genoma, que pretenden mejorar la producción y/o la secreción de proteínas expresadas en dicha bacteria, y/evitar su degradación. De acuerdo con el tipo de proteína que se desee obtener, puede utilizarse por ejemplo una cepa bacteriana en la que la actividad de proteasa PrtP se haya inactivado, y/o una cepa bacteriana que sobre-produzca una proteína que permite

estabilizar las proteínas exportadas, tal como la proteína Nlp4 de *Lactococcus lactis*, o uno de sus homólogos (POQUET et al. 1998, publicación mencionada anteriormente).

La presente invención también tienen por objeto cualquier cepa bacteriana, que pueda obtenerse a partir de una bacteria gram positiva, tal como se ha definido anteriormente, mediante una mutación que inactiva la proteasa de superficie HtrA de dicha bacteria, y que comprende además al menos una casete de expresión de un gen de interés, a excepción de una cepa de *Lactobacillus helveticus* que comprende una sola casete de expresión, constituida por la secuencia que codifica el gen informador *gusA* insertada en el gen *htrA* de dicha cepa, bajo el control transcripcional del promotor de dicho gen.

Se entiende por: “casete de expresión” cualquier construcción de ADN recombinante que comprende un gen de interés que se desea expresar, o un sitio que permite la inserción de dicho gen, situado bajo el control de secuencias de regulación de la transcripción (promotor, terminador) funcionales en la bacteria huésped en cuestión.

En el sentido de la presente invención, se entiende por: “proteasa HtrA” cualquier serina proteasa de tipo tripsina, que presenta similitudes funcionales y estructurales suficientes con la proteasa HtrA de *E. coli*, para poder agruparse en la misma familia, es decir:

- un sitio catalítico formado por los tres aminoácidos Ser, His y Asp;
- la presencia, alrededor de este sitio catalítico, de las regiones consenso: -GY--TN-HV-, D-AV- --- y GNSGG-LN-G-IGIN;
- una señal de exportación que permite a la proteasa ser transportada hasta la superficie celular de la bacteria (puede tratarse, por ejemplo, de un péptido señal, de un dominio transmembrana, de una señal de anclaje a la pared, etc.).

Para la realización de la presente invención, pueden obtenerse bacterias mutantes desprovistas de actividad HtrA realizando una o más mutaciones, particularmente a nivel de la secuencia que codifica la proteasa HtrA y/o a nivel de las secuencias de regulación que permiten la expresión del gen *htrA*, para impedir la expresión de una proteasa HtrA funcional. Estas mutaciones pueden realizarse de manera convencional, mediante delección, inserción, o sustitución de al menos un nucleótido o una secuencia nucleotídica en el gen HtrA; éstas pueden dar como resultado la ausencia de producción de HtrA, o la producción de una proteasa HtrA en la que al menos un aminoácido necesario para la actividad se ha delecionado o ha sido sustituido.

Las técnicas de mutagénesis apropiadas son conocidas por sí mismas; ventajosamente, se utilizarán técnicas de mutagénesis dirigida, en la medida en que los datos disponibles sobre las proteasas de la familia HtrA permiten, incluso aunque no dispongamos de informaciones más precisas sobre la secuencia específica del gen que se desea inactivar, dirigir a la o las mutaciones a dominios conservados necesarios para la actividad (por ejemplo el dominio catalítico).

La presente invención puede aplicarse en muchos ámbitos.

En primer lugar, la presente invención puede utilizarse en el ámbito de la producción de proteínas de interés (por ejemplo enzimas, proteínas humanas, etc.) mediante ingeniería genética a

partir de cultivos de bacterias transformadas con un gen de interés. En este ámbito, la presente invención permite mejorar el rendimiento en proteínas exportadas (y en particular secretadas), y evitar su contaminación con productos de proteólisis, inactivos: esto permite purificarlas fácilmente y a un menor coste.

5 Para esta aplicación se utilizarán preferiblemente cepas mutantes obtenidas a partir de bacterias no patógenas, tales como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., así como estreptococos alimentarios, *Streptococcus thermophilus*.

10 Las cepas mutantes obtenidas a partir de bacterias habitualmente utilizadas en la industria agroalimentaria, tales como las bacterias lácticas (particularmente, lactococos, lactobacilos y estreptococos termófilos), pueden utilizarse ventajosamente en este mismo ámbito. Por ejemplo, pueden utilizarse en la composición de fermentos, para producir proteínas heterólogas que permitan mejorar la calidad del producto fermentado acabado; de este modo, la exportación de enzimas extrañas producidas por una cepa mutante de *L. lactis* de acuerdo con la invención, a quesos fermentados por *L. lactis* puede mejorar su maduración y sus cualidades organolépticas.

15 Estas cepas mutantes también pueden utilizarse para la obtención de productos dietéticos o de medicamentos. En este ámbito pueden utilizarse, por ejemplo, cepas mutantes de acuerdo con la invención para expresar, previamente a la ingesta del producto, y/o después de su ingesta, proteínas con efecto profiláctico o terapéutico, tales como enzimas (que permiten por ejemplo facilitar la digestión), proteínas que permitan estimular el sistema inmunitario, antígenos de vacunas, etc. En la mayor parte de los casos, se preferirá, para las utilizaciones en este ámbito, y para garantizar una inocuidad máxima, cepas mutantes obtenidas a partir de bacterias no patógenas, y ventajosamente, de bacterias utilizadas habitualmente para alimentación. Sin embargo, en el marco de utilizaciones en vacunas, pueden utilizarse cepas mutantes obtenidas a partir de bacterias (particularmente estreptococos, estafilococos, enterococos o listeria) patógenas, y preferiblemente, de variantes de estas
20 bacterias que ya portan una o más mutaciones que atenúan su poder patógeno; la inactivación de la proteína HtrA, que limita las capacidades de supervivencia de estas bacterias en condiciones de estrés, puede contribuir a atenuar su virulencia, como se ha observado anteriormente en el caso de algunas bacterias gram negativas.

30 En el marco de algunas aplicaciones, en las que la bacteria huésped debe ser viable y capaz de producir proteínas a temperaturas del orden de 35 a 40°C, por ejemplo la producción en fermentador de algunas proteínas, o la producción después de la ingesta, en el tacto digestivo del ser humano o de un animal, de proteínas con actividad terapéutica o profiláctica, se utilizarán ventajosamente cepas mutantes obtenidas a partir de bacterias termófilas, tales como *Streptococcus thermophilus*.

35 La presente invención se entenderá mejor con ayuda de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos no limitantes, que ilustran la obtención de mutantes de *L. lactis* en los que la proteasa de superficie HtrA es inactiva, y las propiedades de estos mutantes.

EJEMPLO 1: INACTIVACIÓN DEL GEN *htrA* DE *L. lactis*

El gen *htrA*, portado por el cromosoma de la cepa IL1403 (CHOPIN et al. Plasmid, 11, 260-263, 1984) de *L. lactis* subesp. *lactis*, se inactivó mediante integración de un plásmido suicida que porta un fragmento interno del gen (FA) de 665 pb.

5 Como control positivo de integración, se utilizó un plásmido suicida que porta un fragmento truncado en 3' (GA) de 902 pb, cuya integración en el cromosoma restituye una copia silvestre del gen.

Estos fragmentos se obtuvieron previamente mediante amplificación por PCR, a partir del ADN genómico de la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis*, utilizando los pares de cebadores F/A
10 y G/A:

- F [5'-GGAGCCA(G/T)(A/C/T)GC(A/G/C/T)(C/T)T(A/G/T)GG-3'] localizado cadena abajo del codón de inicio ATG
- G [5'-GTTTCCA(T/T)TTTCTGTGG-3'] localizado cadena arriba del promotor de *htrA*
- A [5'-TT(A/T)CC(A/T)GG(A/G)TT(A/G/T)AT(A/G/C/T)GC-3'] localizado cadena arriba del
15 codón de la serina del sitio catalítico.

El emplazamiento de los cebadores, F, G, y A, se indica en la figura 1.

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones:

- mezcla de reacción: 0,2 mM de cada dNTP, 5 μ M de cada oligonucleótido, aproximadamente 500 ng de ADN cromosómico, 2 mM de MgCl₂, 1,25 unidades de Taq-DNA-pol
20 (BOEHRINGER MANNHEIM) en el tampón Taq suministrado por el fabricante;
- condiciones de temperatura: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 46°C y 30 segundos a 72°C), y 4°C.

Los fragmentos amplificados se ligaron al plásmido lineal pGEM^T (PROMEGA). Después de la transformación de *E. coli* TG1 con los productos de ligamiento, se seleccionan los clones
25 resistentes a ampicilina, y desprovistos de actividad de β -galactosidasa. Los plásmidos obtenidos, que portan respectivamente los fragmentos FA y GA, se denominan pES1.1 y pES2.1.

Los insertos FA y GA se sub-clonaron en un vector suicida que porta un gen de resistencia a cloranfenicol. Al ser este vector incapaz de replicarse solo en ausencia de la proteína RepA que es necesaria para el inicio de su replicación, se crearon cointegrantes mediante ligamiento
30 entre cada uno de los plásmidos pES1.1 y pES2.1, y el vector suicida, previamente linealizados.

Después de la transformación de la cepa TG1 de *E. coli*, y selección de los clones que resisten a cloranfenicol, se delecionó la parte de pGEM^T de los cointegrantes, y los vectores se re-circularizaron. Los plásmidos obtenidos se multiplican en la cepa de *E. coli* TG1 *repA*⁺; después de la selección de los clones resistentes a cloranfenicol, se obtienen los plásmidos suicidas denominados
35 pVS6.1 y pVS7.4.

pVS6.1 contiene el fragmento FA, y pVS7.4 contiene el fragmento GA del gen *htrA_{LI}* de la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis*.

Estos plásmidos se utilizaron para transformar la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis*; los clones que habían integrado estos plásmidos en el locus *htrA* en el cromosoma se seleccionaron en presencia de cloranfenicol.

En los dos casos, se obtuvieron varios clones independientes resistentes a cloranfenicol. Cinco clones de cada clase, indicados como A a E en el caso de la integración de pVS6.1, y 17 a 22 en el caso de la integración de pVS7.4, se seleccionaron para el análisis.

Para cada uno de estos clones, la integración en el locus *htrA* se confirmó mediante transferencia de Southern.

Dos clones, A y 17, se seleccionaron para los siguientes análisis; estos constituyen los dos prototipos de las cepas mutantes, que se denominarán en lo sucesivo:

- *htrA* (mutación nula del gen *htrA_{LI}*, Cm^R); esta cepa no expresa ninguna proteasa HtrA activa;
- *htrA⁺/htrA* (copia silvestre + copia truncada del gen *htrA_{LI}*, Cm^R); esta cepa expresa una proteasa HtrA_{LI} activa.

15 EJEMPLO 2: PAPEL DEL GEN *htrA_{LI}* DE *L. lactis* EN LA SUPERVIVENCIA A ALTA TEMPERATURA

Las dos cepas *htrA* y *htrA⁺/htrA* se cultivaron, en cultivo líquido, en las condiciones habituales de cultivo de *L. lactis*, es decir a 30°C y en presencia de oxígeno pero sin agitación, y en presencia de cloranfenicol.

El comportamiento de la cepa *htrA* de *L. lactis* subesp. *lactis* a 30°C y a 37°C, se estudió utilizando como controles a la cepa *htrA⁺/htrA*, así como a la cepa parental IL403 (cultivada en ausencia de cloranfenicol).

Las bacterias se cultivaron durante 1 noche a temperatura ambiente, en medio M17 que contenía el 1% de glucosa (+2,5 µg/ml de cloranfenicol para las dos cepas *htrA* y *htrA⁺/htrA*). Los cultivos se diluyeron a la 1/1001^a por la mañana en el mismo medio, y se dividieron en dos lotes colocados en semi-anaerobiosis a 30°C o a 37°C. El crecimiento se supervisó mediante la medición de la DO₆₀₀.

Los resultados se ilustran mediante la figura 2.

A 30°C (figura 2A), se constata que la cepa *htrA⁺/htrA* (■), la cepa *htrA* (◆), y la cepa silvestre IL1403 (▲) presentan tiempos de generación muy próximos: 65 minutos para la cepa silvestre, 70 minutos para *htrA⁺/htrA*, y 75 minutos para *htrA*; finalmente, para los 3 cultivos, los valores de DO₆₀₀ que corresponden a la fase estacionaria son muy comparables (DO₆₀₀ = 2,1 a 2,2).

Estos resultados indican que no hay diferencia de crecimiento significativa entre estas tres cepas a 30°C.

A 37°C (figura 2B), la cepa *htrA⁺/htrA* (■) tiene un tiempo de generación de 100 minutos, y la DO₆₀₀ de la fase estacionaria es menor que a 30°C (DO₆₀₀ = 1,25). Un menor crecimiento a 37°C que a 30°C también se observa para la cepa silvestre IL1403 (▲); el tiempo de generación es de 65 minutos, pero la DO₆₀₀ de la fase estacionaria es menor que a 30°C (DO₆₀₀ = 1,9). En el caso de la

cepa *htrA* (♦) el crecimiento es muy reducido, incluso nulo, y la DO_{600} no supera 0,1 incluso después de 7 horas de cultivo.

De estos resultados se deduce que la cepa *htrA* de *L. lactis* subesp. *lactis* es termosensible, y que la mutación *htrA* es letal a 37°C.

5

EJEMPLO 3: PAPEL DEL GEN *htrA_{LI}* DE *L. LACTIS* EN LA PROTEOLISIS DE SUPERFICIE

Se ensayó el efecto de la mutación *htrA_{LI}* sobre la estabilidad de cinco proteínas exportadas. Estas proteínas son:

- 10 i) una proteína heteróloga, la nucleasa secretada de *S. aureus*, Nuc; esta proteína es expresada por el plásmido pNuc3 (LE LOIR et al., J. Bacteriol. 176: 5135-5139, 1994; LE LOIR et al., J. Bacteriol. 180: 1895-903 1998);
- 15 ii) tres proteínas híbridas (*Usp- Δ_{SP} Nuc*, *Nlp4- Δ_{SP} Nuc*, y *Exp5- Δ_{SP} Nuc*) que resultan de la fusión entre el informador Δ_{SP} Nuc y fragmentos de proteínas exportadas de *L. lactis*: la proteína secretada *Usp45* (VAN ASSELDONK et al., Gene 95: 155-60, 1990), la lipoproteína *Nlp4*, y la proteína *Exp5* (que es, a su vez, una proteína de fusión entre una proteína exportada y una proteína citoplasmática); estas proteínas, así como los plásmidos pVE8009, pVE8024 y pVE8021 que las expresan respectivamente, son descritas por POQUET *et al.* (1998, publicación mencionada anteriormente);
- 20 iii) una proteína exportada de forma natural de *L. lactis*, *AcmA*.

En la cepa silvestre MG1363 de *L. lactis* subesp. *cremoris*, se secreta *Usp- Δ_{SP} Nuc*, *Nlp4- Δ_{SP} Nuc* está asociada a las células; para estas 2 proteínas, se detectan en el medio, al lado de la forma madura, diferentes productos de degradación, entre los cuales el péptido NucA procedente de la parte Δ_{SP} Nuc de la fusión; en cuanto a la fusión tripartita *Exp5- Δ_{SP} Nuc*, ésta es muy inestable y no se detecta la forma madura en el medio sino solamente los productos de degradación, entre los cuales el péptido NucA. La forma madura, así como los productos de degradación de estas tres proteínas híbridas pueden detectarse con ayuda de anticuerpos anti-NucA.

La proteína exportada de forma natural de *L. lactis* seleccionada es la bacteriolisina *AcmA* (BUIST et al., J. Bacteriol. 177: 1554-1563, 1995). Esta proteína que degrada el peptidoglicano es a la vez secretada y asociada a la superficie, probablemente por afinidad con su sustrato. Presenta, tanto en la cepa MG1363 de *L. lactis* subesp. *cremoris* como en la cepa IL1403 de *L. lactis* subesp. *lactis*, productos de proteólisis activos y por lo tanto detectables, como la proteína intacta, mediante zimograma.

Las cepas transformadas con los plásmidos que expresan estas diferentes proteínas se cultivan a 30°C durante varias horas, al menos hasta la mitad de la fase exponencial o hasta el comienzo de la fase estacionaria.

Para cada plásmido, se utilizaron cultivos de las tres cepas IL1403, *htrA*, y *htrA⁺/htrA*, que hubieran alcanzado DO_{600} comparables para extraer muestras proteicas: a) del cultivo total, b) de

las células, c) del medio, de acuerdo con el protocolo descrito por POQUET et al., (1998, publicación mencionada anteriormente).

Estas muestras se someten a una electroforesis (SDS-PAGE) en gel desnaturalizante.

Para detectar las proteínas Nuc, Usp- Δ_{SP} Nuc, Nlp4- Δ_{SP} Nuc, Exp5- Δ_{SP} Nuc, y sus
5 productos de degradación, se procede a una transferencia de las proteínas sobre membrana, y a continuación a una revelación inmunológica gracias a anticuerpos anti-NucA, que se detectan con ayuda un conjugado proteico G/peroxidasa (BIO-RAD), y de un kit de quimioluminiscencia (DUPONT-NEN).

Acma se detecta mediante zimograma (BUIST *et al.*, 1995, publicación mencionada
10 anteriormente): micrococos cuya pared es sensible a Acma se incluyen en el gel de electroforesis a la concentración del 0,2%, lo que le hace opaco; después de la electroforesis, el gel se trata a 37°C durante una noche en un tampón que contiene 50 mM de Tris/HCl a pH 7 y el 0,1% de Triton X100, lo que permite la lisis de los micrococos por Acma o sus productos de proteólisis activos. El gel se tiñe a continuación con azul de metileno al 0,1% en KOH al 0,01%: las bandas correspondientes a la
15 actividad de Acma aparecen como halos de hidrólisis transparentes sobre fondo azul.

Para cada proteína, se compararon los perfiles de degradación en las cepas IL1403, *htrA*, y *htrA⁺/htrA*, observando el contenido proteico acumulado durante varias horas de cultivo.

Las figuras 3 a 6 presentan respectivamente los resultados de detección inmunológica, para las proteínas Nuc, Usp- Δ_{SP} Nuc, Nlp4- Δ_{SP} Nuc y Exp5- Δ_{SP} Nuc. Para las proteínas Nuc, (figura 3) y
20 Usp- Δ_{SP} Nuc, (figura 4).

La figura 7 representa un zimograma de la actividad de bacteriolisina de Acma; la detección se realizó en el conjunto del cultivo (T), solamente las células (C) o el medio (M).

En la cepa IL1403:

Para las proteínas secretadas Nuc y Usp- Δ_{SP} Nuc (figuras 3 y 4: tres primeros pocillos),
25 y para la lipoproteína Nlp4- Δ_{SP} Nuc (figura 5: primer pocillo), se detecta un perfil de tres bandas, como se ha observado anteriormente en la cepa MG1363 (LE LOIR *et al.*, 1994; POQUET *et al.*, 1998, publicaciones mencionadas anteriormente):

- a) la de mayor peso molecular es el precursor cuyo péptido señal no se ha escindido, lo que se confirma mediante su presencia exclusiva en las células (figuras 3 y 4);
- 30 b) la banda intermedia es la forma madura después de la escisión del péptido señal, y está presente exclusivamente en el medio en el caso de las proteínas secretadas Nuc y Usp- Δ_{SP} Nuc (figuras 3 y 4);
- c) la banda de menor peso molecular es el péptido NucA que migra prácticamente de forma conjunta con la forma comercial NucA purificada a partir de *S. aureus* (debiéndose la ligera
35 diferencia de migración a las distintas especificidades de escisión en *S. aureus* y *L. lactis*), y que se encuentra a la vez libre en el medio y asociado a las células.

Para la proteína Exp5- Δ_{SP} Nuc (figura 6: primer pocillo) solamente se detectan con mucha dificultad dos formas, una de alto peso molecular, y una de escaso peso molecular, NucA, que

migra prácticamente de forma conjunta con la forma purificada comercial; la proteólisis en IL1403 es, por lo tanto, prácticamente total.

Para la proteína AcmA (figura 7: los tres primeros pocillos), se detecta como se ha observado anteriormente en la cepa MG1363 (BUIST *et al.*, 1995, publicación mencionada anteriormente), un perfil de cuatro bandas:

- a) la de mayor peso molecular es el precursor cuyo péptido señal no se ha escindido, que está presente exclusivamente en las células;
- b) la banda de peso molecular ligeramente inferior es la forma madura después de la escisión del péptido señal, que está a la vez secretado en el medio y asociado a la superficie de las células por afinidad por su sustrato;
- c y d) las dos bandas de menor peso molecular son productos de proteólisis activos, a la vez secretados en el medio y asociados a la superficie de las células por afinidad por su sustrato.

En la cepa *htrA⁺/htrA*:

(Figuras 3 y 4: tres últimos pocillos, figuras 5 y 6: último pocillo, y figura 7: tres últimos pocillos). Los perfiles observados son absolutamente idénticos a los observados en la cepa silvestre. La cepa *htrA⁺/htrA* presenta, por lo tanto, un fenotipo de proteólisis silvestre, que se explica por la copia silvestre del gen *htrA_{LI}* que posee.

En la cepa *htrA*:

(Figuras 3 y 4: tres pocillos centrales, figuras 5 y 6: pocillo central, y figura 7: tres pocillos centrales).

En todos los casos, no se detecta ninguno de los productos de proteólisis; simultáneamente, la cantidad de proteína madura (o de alto peso molecular en el caso de Exp5- $\Delta_{SP}Nuc$) aumenta.

Estos resultados muestran que el producto del gen *htrA_{LI}* es, en efecto, responsable de la degradación de las proteínas secretadas, y que su inactivación conlleva la supresión total de esta degradación.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
 POQUET, Isabelle
 GRUSS, Alexandra
 BOLOTINE, Alexandre
 SOROKINE, Alexei

<120> BACTERIAS GRAM POSITIVAS DESPROVISTAS DE ACTIVIDAD DE PROTEASA
HtrA, Y SUS UTILIZACIONES

<130> MJPcb539/89

5

<140>

<141>

<150> FR9816462

10 <151> 24-12-1998

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1740

<212> ADN

<213> Lactococcus lactis

20

<220>

<221> CDS

<222> (230)..(1453)

25 <400> 1

ES 2 357 187 T3

```

aaacaagatg aaaacatgat ttatcaacat ttttttactt ttttccactt ttctgtgga 60
aactttatta aaatatccac ttatcctcat taatttttag attatccaca aaaatgtgga 120
gaaactatat tagtttgatt tttgttacta ttaaggtatt attaagtgag agtagatata 180
attacatcat agaaatgcta caaagattaa taattgaaag gaattatgt atg gca aaa 238
Met Ala Lys
1
gct aat ata gga aaa ttg cta tta aca ggt gtc gtg ggc gga gcc atc 286
Ala Asn Ile Gly Lys Leu Leu Leu Thr Gly Val Val Gly Gly Ala Ile
5 10 15
gca ctt gga gga agt gca atc tat caa agc act aca aat caa tcg gca 334
Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ile Tyr Gln Ser Thr Thr Asn Gln Ser Ala
20 25 30 35
aat aat agt cgt tca aat aca act agt aca aag gtt agt aac gtt tcg 382
Asn Asn Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ser Thr Lys Val Ser Asn Val Ser
40 45 50
gta aat gtc aat acc gat gtt acc tct gca att gaa aaa gtt tca aat 430
Val Asn Val Asn Thr Asp Val Thr Ser Ala Ile Glu Lys Val Ser Asn
55 60 65
tct gtc gtt tct gtt atg aat tat caa aaa gat aac tca caa agt agt 478
Ser Val Val Ser Val Met Asn Tyr Gln Lys Asp Asn Ser Gln Ser Ser
70 75 80

```

ES 2 357 187 T3

gac ttc agt tca att ttt ggt gga aat agc ggt tca agt tca tcg act 526
 Asp Phe Ser Ser Ile Phe Gly Gly Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ser Thr
 85 90 95

gat ggc tta cag ctt tct agt gaa ggc tct ggt gtc atc tac aaa aaa 574
 Asp Gly Leu Gln Leu Ser Ser Glu Gly Ser Gly Val Ile Tyr Lys Lys
 100 105 110 115

tct ggt ggt gat gcc tac gtt gta act aac tac cac gtt att gct ggt 622
 Ser Gly Gly Asp Ala Tyr Val Val Thr Asn Tyr His Val Ile Ala Gly
 120 125 130

aat agc tca ctt gat gtt ctg ctt tct ggt gga caa aaa gtc aaa gat 670
 Asn Ser Ser Leu Asp Val Leu Leu Ser Gly Gly Gln Lys Val Lys Asp
 135 140 145

tct gtg gtt ggt tat gat gaa tac aca gac ctt gct gtt ctt aaa atc 718
 Ser Val Val Gly Tyr Asp Glu Tyr Thr Asp Leu Ala Val Leu Lys Ile
 150 155 160

agt tct gaa cat gtc aaa gat gtg gcg aca ttc gct gat tct agt aaa 766
 Ser Ser Glu His Val Lys Asp Val Ala Thr Phe Ala Asp Ser Ser Lys
 165 170 175

tta aca att ggt gaa cct gcc att gcc gtt ggc tca cct tta ggt agt 814
 Leu Thr Ile Gly Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Ser Pro Leu Gly Ser
 180 185 190 195

caa ttt gca aac acc gca act gaa gga att tta tct gca aca agc cgt 862
 Gln Phe Ala Asn Thr Ala Thr Glu Gly Ile Leu Ser Ala Thr Ser Arg
 200 205 210

caa gtg act ttg acc caa gaa aat ggt caa aca act aat atc aat gca 910
 Gln Val Thr Leu Thr Gln Glu Asn Gly Gln Thr Thr Asn Ile Asn Ala
 215 220 225

att caa aca gat gct gcc att aac cct ggt aac tct gga ggg gct ttg 958
 Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Pro Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu
 230 235 240

att aat att gaa gga caa gtt att gga att act caa agt aaa att aca 1006
 Ile Asn Ile Glu Gly Gln Val Ile Gly Ile Thr Gln Ser Lys Ile Thr
 245 250 255

aca act gaa gat ggt tct act tct gtc gaa ggt tta gga ttt gcg att 1054
 Thr Thr Glu Asp Gly Ser Thr Ser Val Glu Gly Leu Gly Phe Ala Ile
 260 265 270 275

cct tct aat gat gtc gta aat atc att aat aaa ctt gaa gat gat ggt 1102
 Pro Ser Asn Asp Val Val Asn Ile Ile Asn Lys Leu Glu Asp Asp Gly
 280 285 290

aag att tca cgc cct gct tta ggt atc cga atg gtt gac ctt tca caa 1150
 Lys Ile Ser Arg Pro Ala Leu Gly Ile Arg Met Val Asp Leu Ser Gln
 295 300 305

tta tca aca aat gac agt tct caa ttg aaa tta cta agc agt gta aca 1198
 Leu Ser Thr Asn Asp Ser Ser Gln Leu Lys Leu Leu Ser Ser Val Thr
 310 315 320

ES 2 357 187 T3

```

ggt ggg gtt gtt gtt tac tcc gtc caa tct gga ctt cct gct gcc tca 1246
Gly Gly Val Val Val Tyr Ser Val Gln Ser Gly Leu Pro Ala Ala Ser
    325                330                335

gct ggt ttg aaa gct gga gat gta att aca aag gtt ggc gat aca gca 1294
Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Val Ile Thr Lys Val Gly Asp Thr Ala
    340                345                350                355

gta acc tct tca aca gac ttg caa agt gct ctt tac tca cac aat atc 1342
Val Thr Ser Ser Thr Asp Leu Gln Ser Ala Leu Tyr Ser His Asn Ile
                360                365                370

aat gat aca gta aaa gtt act tat tat cgt gat ggt aaa tca aat aca 1390
Asn Asp Thr Val Lys Val Thr Tyr Tyr Arg Asp Gly Lys Ser Asn Thr
                375                380                385

gca gat gtt aaa ctt tct aaa tca acc agt gac tta gaa aca agc agt 1438
Ala Asp Val Lys Leu Ser Lys Ser Thr Ser Asp Leu Glu Thr Ser Ser
    390                395                400

cca tct tct tct aat taataactta ataatttaaat aaaagtcttc tgtaaataga 1493
Pro Ser Ser Ser Asn
    405

aggctttttt cataactaaag tctgaaattt ttaaaaaataa taaatttcca tttttctttt 1553

attgatttat ggtaaaaaata agttaagcat gaaaatttta ctttacttag aagccgaaca 1613

atTTTTgagt cattcaggaa ttggtcgtgc aatgaaacat caacaacgcg cccttgattt 1673

aatgggcatt gactggacaa aaaatcctga ggatgattac gatatcctcc atttaaatac 1733

ttatggc 1740

```

- <210> 2
- <211> 408
- 5 <212> PRT
- <213> Lactococcus lactis

- <400> 2

ES 2 357 187 T3

Met Ala Lys Ala Asn Ile Gly Lys Leu Leu Leu Thr Gly Val Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ile Tyr Gln Ser Thr Thr Asn
 20 25 30
 Gln Ser Ala Asn Asn Ser Arg Ser Asn Thr Thr Ser Thr Lys Val Ser
 35 40 45
 Asn Val Ser Val Asn Val Asn Thr Asp Val Thr Ser Ala Ile Glu Lys
 50 55 60
 Val Ser Asn Ser Val Val Ser Val Met Asn Tyr Gln Lys Asp Asn Ser
 65 70 75 80
 Gln Ser Ser Asp Phe Ser Ser Ile Phe Gly Gly Asn Ser Gly Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Thr Asp Gly Leu Gln Leu Ser Ser Glu Gly Ser Gly Val Ile
 100 105 110

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de una proteína de interés, que comprende el cultivo de una bacteria que expresa dicha proteína de interés y la obtención de dicha proteína de interés exportada por dicha bacteria, **caracterizado por que** dicha bacteria es una bacteria gram positiva seleccionada entre *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae*, de los géneros *Staphylococcus* y *Listeria*, y *Enterococcaceae*, del género *Enterococcus*, cuya proteasa de superficie HtrA está inactivada por mutación.
2. Procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha bacteria gram positiva se selecciona entre el grupo constituido por *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., y *Streptococcus thermophilus*.
3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado por que** dicha bacteria gram positiva se selecciona entre el grupo constituido por *Lactococcus* spp., y está desprovista de actividad de proteasa PrtP.
4. Bacteria gram positiva tal como se define en las Reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** comprende al menos una casete de expresión de un gen de interés, a excepción de una cepa de *Lactobacillus helveticus* que comprende una sola casete de expresión, constituida por la secuencia que codifica el gen informador *gusA* insertada en el gen *htrA* de dicha cepa de *Lactobacillus helveticus* bajo el control transcripcional del promotor de dicho gen *htrA*.
5. Utilización de una bacteria tal como se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 3, para la preparación de un producto fermentado.
6. Utilización de una bacteria tal como se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 3, para la preparación de un alimento dietético.
7. Utilización de una bacteria tal como se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento.
8. Utilización de acuerdo con la Reivindicación 7, **caracterizada por que** dicho medicamento es una vacuna.

Figuras

F1,

Amorce = cebador

Domaine catalytique = dominio catalítico

- 5 Domaine transmembranaire = dominio transmembrana
(suite) = (continuación)

F2

Temps = Tiempo

F3, F4, F5, F6, F7

- 10 Précurseur = precursor
(pre-pro-protéine) = (pre-pro-proteína)
(pro-protéine) = (pro-proteína)

Fraction = fracción

Souche = cepa

- 15 Forme mature = forma madura

Forme intacte = forma intacta

Produits de dégradation = productos de degradación