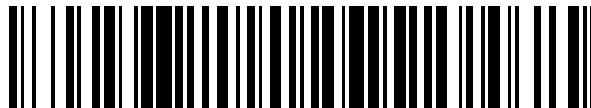


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 130**

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2010 PCT/EP2010/055692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO2010125091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010 E 10715552 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2424883**

54 Título: **Nuevo péptido estimulante de la competencia**

30 Prioridad:

28.04.2009 EP 09305367

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (100.0%)
147, Rue de l'Université
75338 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GARDAN, ROZENN y
MONNET, VÉRONIQUE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 130 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

Nuevo péptido estimulante de la competencia

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente a la competencia de *S. thermophilus*, y más específicamente a un nuevo péptido estimulante de la competencia.

Antecedentes de la invención

10 Muchas especies de bacterias controlan la expresión de genes a una escala de toda la comunidad mediante la producción, secreción, detección y respuesta de moléculas de señalización extracelular (a veces llamadas "autoinductores" o 'feromonas') que se acumulan en el ambiente. Este fenómeno, que se denomina 'percepción de quórum' (QS), ocurre cuando la expresión de los genes se desencadena por la 'detección' de feromonas cuando su concentración ha alcanzado un 'quórum'. En las bacterias Gram-positivas, las moléculas de señalización son principalmente péptidos cortos que actúan ya sea desde la parte exterior de las bacterias como desde el interior, después de la internalización a través de los sistemas de transporte de oligopéptidos llamados OPP o Ami. Varias funciones bacterianas, tales como la virulencia en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, la competencia en *Bacillus subtilis* o la producción de bacteriocina en *Lactococcus lactis* son controladas por péptidos que actúan en la superficie de las bacterias. Sin embargo, el paradigma de los mecanismos que implican los péptidos detectados desde el exterior es la regulación del estado de competencia para la transformación natural por el ADN del donante cromosómico en *Streptococcus pneumoniae*. En esta bacteria, el péptido de señalización, llamado CSP (péptido estimulante de la competencia) y codificado por el gen *comC*, se secreta y madura por un transportador ABC, ComAB. La detección del CSP extracelular en la superficie de la bacteria se consigue mediante un sistema de dos componentes (TCS). En primer lugar, la histidina quinasa incrustada en la membrana, ComD, se autofosforila en respuesta al CSP y después fosforila su regulador de la respuesta cognado, ComE, que activa la transcripción de algunos genes, los genes tempranos inducidos por CSP, incluyendo *comCDE*, *comAB* y *comX*. ComX es un factor sigma específico de la competencia alternativo requerido para la expresión de genes tardíos inducidos por CSP, que comprenden genes que codifican la maquinaria de la captación del ADN.

15 Con respecto a los péptidos de señalización que son activos después de la internalización por un transportador de oligopéptido, tres grupos se han descrito en detalle: (i) péptidos Phr en *B. subtilis* implicados en el control de la esporulación, la competencia, y la producción de enzimas degradativas y antibióticos, (ii) péptidos PapR implicados en el control de la virulencia de las bacterias pertenecientes al grupo *Bacillus cereus* y (iii) péptidos implicados en el control de la transferencia de plásmidos en *Enterococcus faecalis*. Todos estos péptidos cortos extracelulares interactúan con cualquiera de las fosfatasa Rap (en *B. subtilis*) o reguladores transcripcionales (PlcR en *B. cereus* o PrgX en *E. faecalis*) para provocar una respuesta fisiológica.

20 Los sistemas de transporte de oligopéptidos que participan en estas vías de señalización pertenecen a la superfamilia de transportadores de casetes de unión a ATP (ABC). Se componen de cinco subunidades: una proteína de unión de oligopéptido extracelular, OppA, que captura específicamente los sustratos, dos proteínas transmembrana, OppB y OPPC que forman el poro y dos proteínas de unión a ATP citoplasmáticas unidas a la membrana, OppD y oppF, que proporcionan la energía para la translocación de los péptidos. Varias copias del operón *opp* de y/o de los genes que codifican las proteínas de unión de oligopéptidos pueden estar presentes en un único genoma. El genoma de *Streptococcus thermophilus* codifica un sistema de transporte de oligopéptidos y dependiendo de la cepa, dos (cepa LMD-9 y CNRZ1066) o tres (cepa LMG18311) proteínas de unión de oligopéptidos. En las bacterias Gram-positivas, dos funciones principales han sido atribuidas a los transportadores de Opp: la nutrición y la detección. El papel nutricional ha sido bien estudiado en bacterias de ácido láctico tales como *Lactococcus lactis* o *S. thermophilus*. Durante el crecimiento en la leche, los transportadores Opp suministran estas bacterias auxotróficas con péptidos que sirven como fuentes de aminoácidos. La función de detección es más compleja y no está bien documentada, sobre todo en bacterias no patógenas.

25 Entre las bacterias no patógenas, *S. thermophilus* es de gran importancia para la industria alimentaria ya que se utiliza de forma masiva para la fabricación de yogur y quesos de tipo suizos o italianos con un valor de mercado anual de aproximadamente \$ 40 millones, lo que hace de *S. thermophilus* una especie de gran importancia económica. La industria está trabajando continuamente para mejorar las propiedades de las cepas iniciales de *S. thermophilus*. A pesar de que las propiedades de fermentación de esta bacteria se han mejorado poco a poco por los métodos clásicos, existe un gran potencial para seguir mejorando a través de la ingeniería genética.

30 Sin embargo, hasta ahora, sólo existen herramientas genéticas basadas en bacterias modificadas genéticamente. Por ejemplo, Havarstein ha revelado un sistema inducible (sistema *stb*) que permite la sub-expresión de proteínas en *S. thermophilus* (Blomqvist T. et al "Pheromone-induced expression of recombinant proteins in *Streptococcus thermophilus*" Arch Microbiol. 2006 Diciembre; 186 (6): 465-73. Epub 2006 agosto 24). En particular, este artículo da a conocer que un posible péptido-feromona (STP) regula la producción de bacteriocina en *S. thermophilus* LMG 18311, y muestra que el sistema de percepción de quórum *StbABCHR* (el sistema que regula la producción de

bacteriocina) puede ser explotado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en esta especie bacteriana.

5 Por lo tanto, hay una necesidad de un método eficiente que permita obtener mejores Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus* por procesos naturales de transferencia de genes, y transferencia de genes no artificial. Esto es particularmente importante para las industrias de la alimentación, por ejemplo, las industrias lecheras que no quieren utilizar GMO en sus productos.

Con respecto a esta necesidad de herramientas genéticas, la competencia no es muy conocida en *S. thermophilus*. De hecho, con respecto a los sistemas de QS, sólo uno de ellos ha sido aún descrito, cuyo sistema QS (llamado stb o blp) controla la producción de una bacteriocina.

10 La secuenciación del genoma de tres cepas de *S. thermophilus*, CNRZ1066, LMG18311 y LMD-9, ha revelado la presencia de comX y de 14 proteínas con fuertes similitudes con las 14 proteínas que se sabe que son necesarias para la competencia en *S. pneumoniae* y que son codificadas por genes tardíos inducidos por CSP (Bolotin et al., "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus", Nat. Biotechnol. 22:1554-1558, 2004; Makarova et al. "Comparative genomics of the lactic acid bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A, 103 (42): 15611-6, 2006). Excepto comX, no ortólogo de los primeros genes inducidos por CSP de *S. pneumoniae* han sido detectados en el genoma de *S. thermophilus*. Se ha demostrado que la sobreexpresión de comX induce el estado competente en *S. thermophilus* LMG18311. Péptidos implicados en la competencia natural en el género Streptococcus y que comprenden o consisten en la secuencia IAILPYFAGCL se describen en la solicitud WO2010/149721, así como su uso para inducir o incrementar la competencia.

15 Aun así, previamente no se han explicado cómo la transformación está activada en esta cepa y qué vía de regulación y, más especialmente, que péptido estimulante de la competencia (CSP) controla la expresión de comX.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 (LKTLKIFVLFSLLIAILPYFAGCL), o derivados o fragmentos de los mismos capaces de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica para dichos polipéptidos aislados.

La presente invención se refiere todavía a un vector que comprende dicho ácido nucleico unido operativamente a una secuencia de expresión génica.

La presente invención se refiere todavía a una célula huésped manipulada genéticamente con dicho vector.

30 La presente invención también se refiere a un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de dicho polipéptido aislado y nutrientes que permiten el crecimiento de Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

35 La presente invención además se refiere a un uso de dicho polipéptido, dicho ácido nucleico, dicho vector, dicha célula huésped, o dicho medio de cultivo para estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

40 La presente invención se refiere a un método de producción de transformación de Firmicutes competentes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* que comprende la etapa (i) de poner en contacto dicha Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* con una cantidad eficaz de un polipéptido aislado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la obtención de dichos Firmicutes competentes de transformación, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente la bacteria *S. thermophilus*.

Descripción de las figuras

Figura 1: Desarrollo de la competencia durante el crecimiento de la cepa LMD-9 en CDM con el plásmido pG⁺host9 como ADN transformante.

45 Figura 2: Desarrollo de la competencia durante el crecimiento de la cepa LMD-9 en CDM utilizando el ADN cromosómico de la cepa TIL1192 como ADN transformante.

Figura 3: Niveles de expresión relativos de comX, recA, dprA y comGA entre *S. thermophilus* LMD-9 y la cepa TIL883 (LMD9 ΔamiCDE) o la cepa TIL1196 (LMD-9 comX::erm).

Descripción detallada de la invención

50 Sorprendentemente, los inventores han establecido que el sistema de transporte del oligopéptido Ami está implicado en el control de la competencia en Streptococcus, en particular, *S. thermophilus*. Este sistema de transporte funciona

con varias proteínas de unión de oligopéptidos. En la cepa LMD9 donde dos proteínas de unión de oligopéptidos están presentes, AmiA3 y AmiA1, AmiA3 desempeña el papel principal en el control de la competencia.

Más específicamente, los inventores han identificado un nuevo polipéptido y fragmentos de los mismos implicados en el control de la competencia.

- 5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 (LKTLKIFVLFSLIIAILPYFAGCL), o sus derivados o fragmentos capaces de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente S. thermophilus.

El polipéptido aislado de la invención tiene la capacidad de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente de cepas de S. thermophilus.

- 10 Según la presente invención, la longitud del polipéptido aislado de la invención es inferior a 100 aminoácidos, preferiblemente menos de 50 aminoácidos.

- 15 En una realización preferida, el polipéptido aislado de la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 (LKTLKIFVLFSLIIAILPYFAGCL), o sus derivados o fragmentos; dichos derivados y fragmentos que son capaces de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente S. thermophilus.

En otra realización preferida, el polipéptido aislado de la presente invención comprende, preferiblemente consiste en, un fragmento de la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 1 capaz de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente S. thermophilus.

- 20 Tal como se utiliza en este documento, el término "fragmento" se refiere a los productos derivados de la ruptura química, enzimática o física de un polipéptido. Tales fragmentos se pueden obtener, por ejemplo, mediante reacción enzimática, tales como la degradación por proteasa y/o aminopeptidasas.

Preferiblemente, la longitud de dicho fragmento está comprendida entre 3 y 17 aminoácidos, preferiblemente de 4 a 15 aminoácidos, y más preferiblemente de 6 a 12 aminoácidos.

- 25 En otra realización preferida, el polipéptido aislado de la presente invención comprende además una secuencia de aminoácidos que corresponde a un péptido señal.

Dicho péptido señal permite la secreción del polipéptido de la invención en el medio extracelular cuando dicho polipéptido se expresa en una célula procariota o eucariota, preferentemente en una célula procariota, tal como en una bacteria del género Streptococcus, más preferiblemente en una Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente la bacteria S. thermophilus.

- 30 Tales péptidos señal son bien conocidos por las personas expertas.

Tal como se utiliza en este documento, el término "derivados" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 1, como un ejemplo al menos 85% (es decir, 3 aminoácidos de sustitución), preferiblemente de al menos 90% (es decir, 2 aminoácidos de sustitución), y más preferiblemente de al menos 95% (es decir, 1 aminoácido de sustitución).

- 35 Como ejemplo de derivado, se puede citar el polipéptido de la secuencia SEQ ID No 5 (MGKTLKIFVLFSLIIAILPYFAGCL), que se describe en los ejemplos.

- 40 Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos significa el porcentaje de amino-ácidos idénticos, entre las dos secuencias a comparar, obtenido con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y extendiéndose aleatoriamente las diferencias entre estas dos secuencias sobre las secuencias de aminoácidos. Tal como se usa en este documento, el "mejor alineamiento" o la "alineación óptima" significan la alineación para el cual el porcentaje determinado de identidad (véase más adelante) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos son realizadas por lo general mediante la comparación de estas secuencias que han sido previamente alineadas de acuerdo con la mejor alineación; esta comparación se realiza en segmentos de comparación para identificar y
45 comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de secuencias para realizar la comparación se puede realizar, además de la forma manual, mediante el uso de un software de ordenador utilizando este tipo de algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima; siendo las secuencias de aminoácidos capaces de comprender adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia con el fin de obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se
50 calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias

5 Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que tiene la capacidad de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente de cepas de *S. thermophilus* simplemente puede ser identificada por cualquier experto en la técnica a la vista de los siguientes ejemplos. Como un ejemplo, el experto puede detectar polipéptidos que se deriven de SEQ ID No 1 induciendo competencia en Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus* cuando está presente en el medio de cultivo.

También se entenderá que los aminoácidos naturales pueden ser sustituidos por aminoácidos modificados químicamente. Típicamente, tales aminoácidos modificados químicamente permiten aumentar la semivida del polipéptido.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica para el polipéptido aislado, como se describe anteriormente.

Dicho ácido nucleico corresponde a ARN o ADN, preferiblemente al ADN.

De acuerdo con una realización preferida, dicho ácido nucleico aislado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada en el grupo que comprende
 15 TTGAAAACCCTGAAAATATTTGACTATTTTCACTACTTATTGCTATCTTGCCTTATTTTGCAGGATGTCCTTTAA
 (SEQ ID No 2) y ATGGGGAAAACCCTGAAAATATTTGACTATTTTCACTACTTATTG
 CTATCTTGCCTTATTTTGCAGGATGTCCTTTAA (SEQ ID No 6).

20 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado de la invención como se describe anteriormente unido operativamente a una secuencia de expresión génica.

Dicha secuencia de expresión del gen dirige la expresión de dicho ácido nucleico dentro de una célula procariota o eucariota, preferiblemente dentro de una célula procariótica, y más preferiblemente dentro Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente la bacteria *S. thermophilus*. La "secuencia de expresión génica" es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o una combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción eficaz y la traducción del ácido nucleico a la que está unida operativamente. La secuencia de expresión génica puede ser un promotor constitutivo o inducible.

25 Tales promotores son bien conocidos en la técnica. Los promotores para uso en la invención son promotores de preferencia fuertes, es decir, bajo la inducción en la célula pertinente producen altos niveles de transcripción del gen aguas abajo. Ejemplos de fuertes promotores inducibles incluyen por ejemplo los promotores, de las bacterias, que participan en la producción de bacteriocinas, tales como el promotor *stb*.

30 En general, la secuencia de expresión génica incluirá, según sea necesario, secuencias 5' de no transcripción y 5' de no traducción implicadas con la iniciación de la transcripción y traducción, respectivamente. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba, como se desee.

35 En la presente memoria, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención y la secuencia de la expresión génica se dice que están "operativamente unidas" cuando están unidas covalentemente de una manera tal como para colocar la expresión o transcripción y/o traducción del polipéptido de la invención que codifica la secuencia bajo la influencia o el control de la secuencia de la expresión génica. Dos secuencias de ADN se dice que están unidas operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión del gen 5' da como resultado la transcripción del polipéptido de la invención y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no da como resultado la introducción de una mutación de cambio de marco, interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción del polipéptido de la invención, o interfiere con la capacidad del correspondiente transcrito de ARN de ser traducido a una proteína. Por lo tanto, una secuencia de expresión génica estaría ligada operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de la invención si la secuencia de expresión génica es capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico de tal manera que el transcrito resultante se traduce en el polipéptido deseado.

Los vectores preferidos son vectores de plásmidos, que se han descrito extensamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

50 El vector de la invención puede incluir un marcador seleccionable que es activo en las bacterias.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped manipulada genéticamente con el vector descrito anteriormente.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula huésped de ingeniería genética" se refiere a células huésped que han sido transformadas con el vector descrito anteriormente.

Dicha célula huésped es preferiblemente una célula bacteriana, tal como una bacteria que pertenece al filo Firmicutes, preferiblemente del género *Streptococcus*, y más preferiblemente una bacteria *Streptococcus thermophilus*.

5 La introducción del vector descrito anteriormente en la célula huésped puede efectuarse por cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, tales como transfección con fosfato de calcio o electroporación.

En una quinta realización, la presente invención se refiere a un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz del polipéptido aislado como se describe anteriormente y los nutrientes que permiten el crecimiento de Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

10 Según la presente invención, una "cantidad eficaz" de dicho polipéptido aislado es uno que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado, en este caso la estimulación de la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus*. Como un ejemplo, dicha cantidad eficaz está comprendida entre 0,1 ng/ml y 1 mg/ml, de preferencia entre 0,5 ng/ml y 1 mg/ml, y más preferiblemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml.

15 Los nutrientes del medio de cultivo son bien conocidos por la persona experta e incluyen, por ejemplo, lactosa, acetato de sodio, ácido ascórbico, fosfato de potasio. Preferiblemente, el medio de cultivo no contiene péptidos nutricionales, tales como los proporcionados por neopeptona o extracto de levadura.

20 Existen numerosas causas de inestabilidad o degradación de los péptidos, incluyendo la hidrólisis y la desnaturalización. Este resultado puede implicar la disminución de la inducción de la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus*. Se pueden añadir estabilizantes para disminuir o prevenir tales problemas.

De acuerdo con una realización específica, el medio de cultivo de la invención comprende además al menos un estabilizante.

25 Los estabilizantes incluyen ciclodextrina y derivados de la misma (véase la patente de EE.UU. No. 5.730.969). Los conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina también se pueden añadir para estabilizar la formulación final. Los polioles pueden estabilizar los péptidos, y son miscibles en agua o solubles en agua. Polioles adecuados pueden ser alcoholes polihidroxilados, monosacáridos y disacáridos que incluyen manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, pirrolidona de vinilo, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa y polímeros de los mismos. Varios excipientes también pueden estabilizar péptidos, incluyendo albúmina de suero, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos.

30 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido como se describe anteriormente, un ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente, un vector que comprende dicho ácido nucleico, una célula huésped como se ha definido anteriormente, o un medio de cultivo como se describió previamente para estimular la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

35 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de la transformación de Firmicutes competentes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* que comprende la etapa (i) de poner en contacto dicha Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias *S. thermophilus* con una cantidad eficaz de un polipéptido aislado como se definió previamente para la obtención de dichos Firmicutes competentes de transformación, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente la bacteria *S. thermophilus*.

40 Preferiblemente, el método de la invención se realiza en un medio de cultivo como se describió anteriormente.

45 En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de Firmicutes competentes de transformación, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* que comprende la etapa (i) de cultivar dicha Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias *S. thermophilus* en un medio libre de péptido permitiendo el crecimiento de dichas bacterias a una DO_{600} comprendida entre 1,5 y 2,5, preferiblemente aproximadamente 2 y (i') diluir dicho cultivo a una DO_{600} comprendida entre 0,01 y 0,1, preferiblemente aproximadamente 0,05.

50 Preferiblemente, la presente invención se refiere a un método de producción de Firmicutes competente de transformación, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* que comprende la etapa (i) de cultivar dicha Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* en M17 lactosa (10 g/l) durante 8 horas y (i'') diluir dicho cultivo 50 veces en un medio libre de péptidos. El cultivo diluido se incuba entonces a 4°C durante 10 horas y se incuba adicionalmente a 42°C durante 6 horas lo que permite el crecimiento de dichas bacterias a una DO_{600} comprendida entre 1,5 y 2,5, preferiblemente de aproximadamente 2, y (i'') diluir dicho cultivo en un medio libre de péptido a una DO_{600} comprendida entre 0,01 y 0,1, preferiblemente aproximadamente 0,05.

55 Por ejemplo, dicho péptido comprende un medio libre:

ES 2 617 130 T3

g/mol g/l

Lactosa/Tampón

lactosa	360,32	10 g
acetato de Na	82,03	1 g
citrato de amonio	243,2	0,6 g
KH ₂ PO ₄	136,09	3 g
K ₂ HPO ₄	174,18	2,5 g
urea	60,06	0,240 g

Vitaminas

1 ácido ascórbico L +	176,13	0,5 g
2 piridoxamina	241,1	5 mg
3 ácido nicotínico	123,1	1 mg
4 riboflavina	376,4	1 mg
5 ácido pantoténico	238,3	1 mg
6 tiamina	337,3	1 mg
7 piridoxina	205,6	2 mg
8 ácido aminobenzoico	137,1	10 mg
9 biotina	244,3	10 mg
10 ác. fólico	441,4	1 mg
11 B12	1355,4	1 mg
12 ác. orótico	156,1	5 mg
13 timidina	242,2	5 mg
14 inosina	268,23	5 mg
15 DL 6,8 ác. tióctico	206,3	2,5 mg

Metales

MgCL₂-6H₂O 203,3 0,200 g

CaCL ₂ -2H ₂ O	147,02	0,050 g
FeCl ₂	198,81	0,005 g
ZnS ₀₄	287,54	0,005 g
CuSO ₄	249,7	0,000 g
CoCl ₂	237,9	0,003 g
MnS ₀₄	169	0,028 g

ES 2 617 130 T3

Aminoácido

L ácido aspártico	133,1	0,455 g
L ácido glutámico	147,13	0,398 g
L asparagina	132,1	0,350 g
L glutamina	146,1	0,390 g
L-histidina	155,16	0,150 g
L-arginina	174,2	0,350 g
L-lisina	146,2	0,440 g
L serina	105,1	0,225 g
L treonina	119,1	0,175 g
Glicina	75,07	0,175 g
L alanina	89,1	0,240 g
L isoleucina	131,18	0,210 g
L leucina	131,18	0,475 g
L valina	117,1	0,325 g
L-triptófano	204,2	0,050 g
L-metionina	149,2	0,125 g
L prolina	115,13	0,675 g
L-fenilalanina	165,19	0,275 g
L tirosina	181,2	0,290 g
L-cisteína	121,16	0,250 g

Ácidos nucleicos

adenina	135,1	0,010 g
uracilo	112,09	0,010 g
xantina	174,1	0,010 g
guanina	187,6	0,010 g

- 5 El medio se ajusta a pH 6,6 con HCl, se completa a 1 L con agua y se filtra en el filtro GV.

Ventajosamente, dicho Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* se seleccionan del grupo que comprende *S. thermophilus* LMD-9, *S. thermophilus* CNRZ1066 y *S. thermophilus* LMG18311, preferiblemente *S. thermophilus* LMD-9.

- 10 Según una realización preferida, dichos métodos son para la producción de una bacteria mutante y dicho método comprende además la etapa (ii) poner en contacto dicha Firmicutes competente de transformación, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente bacterias de *S. thermophilus* con ADN homólogo en condiciones que permitan la transformación de dichas bacterias con dicho ADN homóloga y la inserción del ADN homólogo en el cromosoma de Firmicutes, en particular, Streptococcus, y más preferiblemente *S. thermophilus* por recombinación homóloga.

Dicho ADN homólogo puede ser ADN lineal (fragmento PCR), ADN de plásmido o ADN cromosómico.

Ventajosamente, dicha etapa de poner en contacto (ii) se realiza simultáneamente con la etapa (i') de dilución del cultivo del método de acuerdo con el octavo aspecto. En ese caso, la transformación ocurrió esencialmente durante los 100 minutos después de dicha puesta en contacto, más específicamente, esencialmente durante los primeros 60 minutos.

- 5 Ventajosamente, dichos métodos pueden comprender las etapas (iii) de la selección y/o amplificación de las bacterias mutantes así generadas.

En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a un método de selección de un compuesto, preferiblemente un polipéptido, capaz de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus* usando el objetivo AmiA3 proteína de unión al oligopéptido y que comprende las etapas de poner en contacto dicho compuesto con AmiA3, verificar la unión entre AmiA3 y dicho compuesto, y seleccionar el compuesto que se une a AmiA3 como un compuesto capaz de estimular la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus*.

10

Los métodos para la verificación de la unión entre AmiA3 y dicho compuesto son bien conocidos por las personas expertas.

- 15 En un décimo aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que estimula la competencia en Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus* que comprende las etapas de:

i) poner en contacto, con dicho compuesto, una célula huésped (preferiblemente una bacteria) transformada con un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína indicadora (preferiblemente GFP, beta galactosidasa, etc.) bajo el control de la totalidad o parte de un promotor precedido por la secuencia de repetición invertida reconocida por P1cR como regulador (Ster0316 en la cepa LMD9, str0270 en la cepa CNRZ1066, stu0270 en la cepa LMG18311) ATAGTGACATATATGTCTCTAT (SEC ID n° 3) o GTGGTGACATAAATGTCACTAT (SEC ID n° 4);

20

ii) seleccionar el compuesto que estimula la expresión de dicha proteína indicadora.

- 25 Los métodos de verificación de la estimulación de Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente la competencia de *S. thermophilus* son bien conocidos por las personas expertas. Ejemplos de tales métodos se describen en los ejemplos.

En una realización preferida, el método de la invención puede comprender además las etapas de:

iii) poner en contacto dicho compuesto con Firmicutes, en particular, *Streptococcus*, y más preferiblemente *S. thermophilus* en presencia de ADN (plásmidos, ADN cromosómico, etc.); y

30

iv) seleccionar los compuestos que mejoran con eficacia la competencia.

En lo que sigue, la invención se describirá con más detalle con referencia a secuencias de aminoácidos, secuencias de ácidos nucleicos y los ejemplos. Sin embargo, ninguna limitación de la invención es pretendida por los detalles de los ejemplos. Más bien, la invención se refiere a cualquier realización que comprenda los detalles que no se mencionan explícitamente en los ejemplos del presente documento, pero que el experto hallará sin un esfuerzo excesivo.

35

Ejemplos

1) El transportador ami controla la síntesis de varias proteínas esenciales para la transformación natural en estreptococos

- 40 Con el fin de encontrar las funciones fisiológicas controladas por los péptidos de señalización que son internalizados por el transportador Ami, se comparó el proteoma de la cepa tipo salvaje LMD-9 y su mutante isogénica eliminada por el operón ami, LMD-9 Δ amiCDE (TIL883; IBRAHIM et al., J. Bacteriol, vol 189, p: 8844-8854, 2007).

Con el fin de pasar por alto la función nutricional del transportador Ami, las células fueron cultivadas en MDL, un medio definido químicamente sin péptido (CDM), que sólo contiene aminoácidos como fuente de nitrógeno, tal como se describe por Letort y Juillard, "Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*", J. Appl. Microbiol., Vol. 91, p. 1023-1029, 2001. La densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de los cultivos se midió utilizando un espectrofotómetro UVIKON 931 (KONTRON).

45

Las proteínas se prepararon a partir de células cultivadas en CDM y cosechadas a OD_{600} 0,7 en dos cultivos independientes para cada cepa. Las bacterias fueron rotas mecánicamente y los sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 220.000 g durante 30 minutos a 4°C para enriquecer 'sedimentos de la envoltura celular' en las proteínas de la envoltura celular. Finalmente el sedimento se resuspendió en tampón de ruptura y se sometió a ultrasonidos durante 15 min a 4°C en un baño de ultrasonidos. Las fracciones del sedimento de la envoltura celular (10 μ g) se separaron por electroforesis 1D. Cada carril de electroforesis 1D se cortó en 26 piezas de gel (2 mm de

50

anchura). La digestión en gel de las proteínas se realizó con el sistema de Progest (Genomic Solution) de acuerdo con el siguiente protocolo.

Se lavaron en primer lugar las piezas de gel, en dos baños sucesivos de (i) 10% de ácido acético en etanol 40% y (ii) 100% de acetonitrilo (ACN) y en segundo lugar, en dos baños sucesivos de (i) NH_4CO_3 25 mM y (ii) 100 % de ACN. Los trozos de gel se incubaron adicionalmente en DTT 10 mM en NH_4CO_3 25 mM, 30 min a 55°C y en 50 mM de yodoacetamida en NH_4CO_3 25 mM, 45 min a temperatura ambiente para la reducción de la cisteína y la alquilación, respectivamente. La digestión se realizó posteriormente durante 6 horas a 37°C con 125 ng de tripsina modificada (Promega) disuelta en 20% de metanol y NH_4CO_3 20 mM, por pieza de gel. Los péptidos se extrajeron sucesivamente con (i) 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA) 50% de ACN y (ii) con 100% de ACN. Los extractos de los péptidos resultantes se secaron en una centrifuga de vacío y se suspendieron en 25 μl de 0,08% de TFA, y 2% de ACN.

Las fracciones enriquecidas en proteínas de la envoltura celular se analizaron entonces mediante un enfoque proteómico comparativo sin marcador que combinaba electroforesis 1D con análisis LC-MS/MS.

El análisis LC-MS/MS se realizó en un sistema de LC Ultimate 3000 (DIONEX) conectado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Fisher) por la fuente de iones de nanoelectropulverización. Mezclas de péptidos tripticos (4 μl) se cargaron a un caudal de 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ sobre una precolumna de PepMap C18 (0,3 x 5 mm, 100 Å, 5 micras; DIONEX). Después de 4 mm, la precolumna se conectó con la nanocolumna de separación PepMap C18 (0,075 x 15 cm, 100 Å, 3 micras) y el gradiente lineal se inició de 2 a 36% de tampón B (0,1% de ácido fórmico, 80% de acetonitrilo) en tampón A (ácido fórmico al 0,1%, 2% de acetonitrilo) a 300 nl min^{-1} durante más de 50 min. La ionización se realizó en unión líquida con un voltaje de pulverización de 1,3 kV aplicado a la sonda capilar no revestida (PicoTip EMISOR 10 micras punta de Identificación; NEW OBJECTIVE). Los iones de los péptidos se analizaron de forma automática por el método dependiente de los datos de la siguiente manera: exploración MS completa (m/z 300-1600) en el analizador de Orbitrap y MS/MS en el precursor 4 más abundante en la trampa de iones lineal LTQ. En este estudio sólo péptidos +2 y +3 cargados se sometieron a experimentos de MS/MS con una ventana de exclusión de 1,5 minutos, con los clásicos parámetros de péptidos de fragmentación: Qz = 0,22, tiempo de activación = 50 ms, energía de colisión = 35%.

Los datos en bruto producidos en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se convirtieron primero en un archivo mzXML con ReADW (<http://sashimi.sourceforge.net>) y en un segundo paso, la identificación de proteínas se realizó con el software X!Tandem (X!Tandem tornado 2008.02.01.3, <http://www.thegpm.org>) frente a una base de datos de proteínas de *S. thermophilus* LMD-9 (GenBank: CP000419.1), asociada a una base de datos proteómica contaminante. Los parámetros de búsqueda en X!Tandem fueron: especificidad de tripsina con una escisión perdida, alquilación fijada de cisteína y oxidación variable de metionina. La tolerancia de masa se fijó a 10 ppm para iones precursores y 0,5 Da para los iones de fragmentos. Para todas las proteínas identificadas con una proteína E-valor <0,01 en la primera etapa, se realizaron búsquedas de péptidos adicionales para reforzar la identificación utilizando parámetros similares excepto que los péptidos semi-trípticos y las acetilaciones N-terminales de proteínas fueron aceptadas. Todos los péptidos identificados con un E-valor <0,1 se conservaron. Todos los resultados de cada pieza de gel se fusionaron con un programa hecho en casa escrito en Java por Benoit Valot en la plataforma PAPPISO (<http://moulon.inra.fr/PAPPISO>). Los resultados de búsqueda finales se filtran usando un filtro de umbral múltiple aplicado al nivel de proteínas y que consta de los siguientes criterios: E-valor de la proteína <10⁻⁸ identificado con un mínimo de dos secuencias de péptidos diferentes, detectado en al menos una pieza de gel, con un E-valor del péptido <0,05.

Se centró la atención en las proteínas que fueron detectadas en los extractos preparados a partir de la cepa LMD-9 y que desaparecieron por completo en los extractos preparados a partir de la cepa TIL883. Las proteínas identificadas se describen en la Tabla I.

Para cada proteína detectada, se calculó un factor de abundancia que se define como el número total de espectros detectados por la proteína en cada carril de gel normalizado por el número teórico de péptidos que tienen una masa en el intervalo entre 800 y 2500 Da. Las proteínas que se detectaron en las dos repeticiones realizadas para la cepa LMD-9 y ausente en las dos repeticiones realizadas para la cepa TIL883 (factor de abundancia = 0) fueron tomadas en cuenta.

Tabla I

GenBank	PM	Identificación de proteínas	Factor de Abundancia ^a	
			LMD-9	TIL883
Proteínas esenciales para la transformación natural ^b				
STER1521	24400	Proteína de la captación de ADN o proteína de unión relacionada con ADN, comEA	0,63-0,50	0-0

ES 2 617 130 T3

STER0922	31100	Proteína de unión a nucleótido plegada de Rossmann predicha que participan en la captación de ADN, , DprA	1,12-1,12	0-0
STER1821	14700	Proteína de unión a ADN de una sola hebra, SsbB	0,50-0,83	0-0
STER1840	11800	Proteína de competencia ComGC	1-1,75	0-0
STER1841	33800	Vía secretora Tipo II/componente de la competencia, ComGB	0,64-0,82	0-0
STER1842	35300	Vía secretora Tipo II/componente de la competencia, ATPasa, ComGA	0,95-0,79	0-0
STER0189	20100	ComX	0,57-0,14	0-0

Proteínas inducidas por el estado de competencia, pero que no son esenciales para la transformación^b

STER0057	30100	Antígeno de superficie, CBPD	0,75-0,75	0-0
STER1430	25700	Proteína de reparación del ADN, RadC	0,25-0,33	0-0

Subunidades del sistema de transporte del oligopéptido Ami

STER_1407	34600	dipéptido tipo ABC/oligopéptido/sistema de transporte de níquel, componente de permeasa, AmiD	2,17-2,33	0-0
STER_1408	55500	dipéptido tipo ABC/oligopéptido/sistema de transporte de níquel, componente de permeasa, AmiC	1,41-1,12	0-0
STER_1406	39800	dipéptido tipo ABC/oligopéptido/sistema de transporte de níquel, componente de ATPasa, Amie	1,28-1,	0-0

Otras proteínas

STER_1356	50500	Enzima de superfamilia de SAM radical	1,55-1,65	0-0
STER_1652	50300	Proteína de permeasa del transportador ABC de lactococcina A, PcsB	0,60-1,00	0-0
STER_0329	32200	Proteína accesoria de ureasa Ureh	0,57-0,57	0-0
STER_0123	18500	Proteína de unión de ARN predicha que contiene un dominio PIN	0,60-0,40	0-0
STER_1296	45700	Permeasa de la superfamilia facilitadora principal	0,57-0,29	0-0
STER_0331	29100	Sistema de transporte de cobalto tipo ABC, componente de permeasa CbiQ o transportador relacionado	0,23-0,46	0-0
STER_1779	12200	Dominio de tiorredoxina que contiene la proteína	0,33-0,33	0-0
STER_1834	43200	Quinasa acetato	0,26-0,32	0-0

^aEl factor de abundancia es la relación entre el número total de espectros obtenidos durante el proceso de identificación de proteínas en el número teórico de péptidos que oscilan entre 800 y 2500 Da. Se realizaron dos repeticiones para cada cepa que lleva a dos valores.

^bEstas categorías de proteínas se han definido a partir de los resultados obtenidos con los ortólogos de estas proteínas en *S. pneumoniae*.

Los resultados muestran que, además de las subunidades C, D y E del transportador de Ami, que estaban ausentes del mutante, como se esperaba, diecisiete proteínas cumplen este criterio (Tabla I). Ocho fueron codificadas por los genes, los ortólogos de los cuales fueron identificados como genes tardíos inducidos por CSP en *S. pneumoniae*. Entre ellos, seis también han sido identificadas como esenciales para la transformación natural (Peterson et al., Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. Mol. Microbiol. 51: 1051-1070, 2004). La proteína ComX implicada en la regulación del estado de la competencia también se detectó en la cepa LMD-9, pero no en la cepa TIL883.

Estos resultados sugieren que el transportador de Ami está implicado en la vía reguladora que controla la inducción del estado de competencia en *S. thermophilus* y también que la transformación natural puede ser activada en CDM durante la fase de crecimiento exponencial.

2) El LMD-9 de *S. thermophilus* es naturalmente transformable en CDM.

Para comprobar la hipótesis formulada sobre la base de los resultados proteómicos de los inventores, primero se puso a prueba la capacidad de transformación natural de *S. thermophilus* mediante el plásmido pG⁺host9.

Un cultivo de una noche de la cepa LMD-9 crecido en CDM a 42°C se diluyó en CDM a DO₆₀₀ 0,05. Se distribuyeron 2 ml de este cultivo diluido en tubos de 2 ml y se incubó en un baño de agua a 42°C. Una vez cada hora durante cuatro horas, una muestra se utilizó para medir la DO₆₀₀ y 100 µl se mezclaron con 1 µg de ADN de plásmido. Las células con ADN se incubaron durante 2 horas a 28°C antes de ponerse en placas en medio M17 (DIFCO), suplementado con 10 g litro⁻¹ de lactosa (M17lac) con eritromicina (5 µg ml⁻¹ para *S. thermophilus*).

La figura 1 muestra el desarrollo de la competencia durante el crecimiento de la cepa LMD-9 en CDM con el plásmido pG⁺host9 como ADN transformante. La densidad óptica (DO₆₀₀) (x, línea de trazos) se utilizó para medir el número de células y el recuento de células resistentes a la eritromicina (células Ery resistentes) (♦, línea simple) se utilizó para evaluar la competencia. 1 µg de ADN de plásmido se mezcló con 100 µl de células. La media de tres experimentos independientes se presentan y las barras de error indican la desviación estándar.

Se obtuvieron células resistentes a eritromicina (transformantes), pero sólo en las muestras recogidas una hora después de la dilución (Fig. 1). Se observó una media de 1,2 x 10⁶ transformantes por ml (error estándar, ± 7,2 x 10⁵ transformantes por ml; n = 3). La presencia del plásmido pG⁺host9 en estas bacterias se comprobó en varias colonias por PCR.

Este resultado indica que las bacterias fueron capaces de captar el plásmido pero sólo en una etapa de crecimiento específico correspondiente al inicio de la fase exponencial (DO₆₀₀ 0,2-0,3).

Para confirmar la capacidad de transformación de *S. thermophilus*, para demostrar su capacidad de absorber el ADN lineal (fragmento de PCR o ADN) e incorporarlo mediante recombinación homóloga en su cromosoma y también para evaluar la cinética de la tasa de transformación con mayor precisión, se necesitó ADN cromosómico que contenía un marcador de resistencia a antibióticos.

A tal fin, se construyó la cepa TIL1192 (LMD-9 feoB::erm) que contenía un casete de resistencia a eritromicina (erm) introducido en el cromosoma de la cepa LMD-9 en el locus feo. La integración de un fragmento de PCR mediante recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa LMD-9 se demostró en el marco de esta construcción.

El ADN cromosómico de la cepa TIL1192 se utilizó además como ADN donante para estudiar la temporización de la activación del estado de competencia durante el crecimiento en CDM.

Un cultivo de una noche de la cepa LMD-9 crecida en CDM a 42°C se diluyó en CDM a DO₆₀₀ 0,05. Se distribuyeron 2 ml de este cultivo diluido en tubos de 2 ml y se incubaron en un baño de agua a 42°C. Una vez veinte minutos durante dos horas, una muestra se utilizó para medir la DO₆₀₀ y se mezclaron 100 µl con 1 µg de ADN cromosómico. Las células con ADN se incubaron durante 2 horas a 42°C antes de ponerse en placas en medio M17 (DIFCO), suplementado con 10 g litro⁻¹ de lactosa (M17lac) con eritromicina (5 µg ml⁻¹ o kanamicina 1,000 µg/ml⁻¹ para *S. thermophilus*).

La Fig. 2 muestra el desarrollo de la competencia durante el crecimiento de la cepa LMD-9 en CDM usando ADN cromosómico de la cepa TIL1192 como ADN transformante. La densidad óptica (DO₆₀₀) (x, línea de trazos) se utilizó para medir el número de células y el recuento de células resistentes a la eritromicina (células Ery resistentes) (♦, línea continua) se utilizó para evaluar la competencia. 1 µg de ADN cromosómico se mezcló con 100 µl de células. Se presenta la media de cuatro experimentos independientes y las barras de error indican la desviación estándar.

La cinética de la transformación obtenida a partir de cuatro experimentos independientes (Fig. 2) confirmó que la competencia natural es un estado transitorio corto. La capacidad de transformación aumentó considerablemente 20 minutos después de la dilución (DO₆₀₀ 0,06), alcanzó un grado óptimo una hora después de la dilución (DO₆₀₀

0,17~0,2) y luego disminuyó rápidamente. Cien minutos después de la dilución (DO_{600} 0,4~0,5), las células ya no eran transformables. En el óptimo, la tasa de transformación promedio fue de $3,8 \cdot 10^{-6}$ (error estándar, $\pm 4,6 \cdot 10^{-7}$; $n = 4$).

5 También se probó la capacidad de transformación de la cepa TIL883 (Δ amiCDE) con el ADN cromosómico de TIL1192 en las mismas condiciones. No se obtuvieron transformantes durante el crecimiento de esta cepa en CDM.

10 Con el fin de confirmar que los clones resistentes a los antibióticos obtenidos a partir de los experimentos anteriores fueron el resultado de una transformación natural que implica ComEC y más probablemente un complejo transformante similar al que se describe en *S. pneumoniae*, se construyó la cepa TIL1195 (LMD-9 comeC::erm). ComEC es una de las proteínas de la maquinaria de captación de ADN esencial para la transformación natural en *S. pneumoniae* y *B. subtilis*.

15 También se construyó TIL1193 (LMD-9 feo::aphA3) como fuente de ADN cromosómico con una resistencia a los antibióticos diferente a la de eritromicina. Se verificó que la transformación natural de la cepa LMD-9 con el ADN cromosómico de la cepa TIL1193 daba una tasa de transformación similar a la del ADN cromosómico de la cepa TIL1192 (datos no mostrados). Finalmente, se trató de transformar de forma natural la cepa TIL1195 con el ADN cromosómico de la cepa TIL1193. Las muestras de células de TIL1195 cultivadas en CDM se recogieron cada 30 min durante 2 horas y se ensayaron para la transformación.

No se obtuvieron clones resistentes a kanamicina.

20 Con el fin de confirmar que ComX es esencial para la transformación natural en *S. thermophilus*, se construyó la cepa TIL1196 (LMD-9 comX::erm). Las muestras de células de la cepa TIL1196 cultivadas en CDM se recogieron cada 30 min durante 2 horas y se ensayaron para la transformación con ADN cromosómico de la cepa TIL1193.

Como era de esperar, no se obtuvieron clones resistentes a kanamicina durante esta cinética.

25 Finalmente, se encontró una condición natural de crecimiento que se convierte en la capacidad de transformación de la cepa LMD-9. Usando el plásmido o ADN cromosómico como ADN donante, se mostró que las células eran transformables en CDM, durante una ventana estrecha, siendo el óptimo una hora después de la dilución de un cultivo de una noche en CDM. Las tasas obtenidas hacen posible la construcción de mutantes de delección fácilmente usando fragmentos de PCR y fueron mucho más altas con ADN de plásmido que con ADN cromosómico. Esta diferencia puede explicarse por dos factores. En primer lugar, el mayor número de moléculas de plásmido en comparación con el número de moléculas del cromosoma presente en $1 \mu\text{g}$ de ADN (alrededor de 450 veces más). En segundo lugar, los plásmidos pG+host generan multímeros lineales de plásmido en *Lactococcus lactis* (Maguin et al., Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria, *J. Bacteriol.* 178: 931-935, 1996). Tal es el caso, probablemente, también en *S. thermophilus*.

30 3) El Transportador Ami controla indirectamente la transcripción de genes necesaria para el desarrollo de la competencia en los estreptococos.

35 Entre las proteínas detectadas en la cepa LMD-9 y no en la cepa TIL883, tres fueron escogidas para un estudio de la transcripción de los genes correspondientes. Estas proteínas fueron ComGA que está implicada en el ensamblaje de los poros, DPRa, una proteína mediadora de la recombinación que transmite el ssDNA entrante a la recombinasa RecA y el factor sigma ComX. Aunque el factor de abundancia de RecA no llegó a cero en la cepa TIL883, pero se redujo en un factor de 4 (datos no mostrados), se optó por seguir su gen codificante porque RecA es esencial para la transformación en muchas especies transformables Gram-positivas.

40 La figura 3 muestra los niveles relativos de expresión de comX, recA, dprA y comGA entre LMD-9 de *S. thermophilus* y la cepa TIL883 (LMD9 Δ amiCDE) o la cepa TIL1196 (LMD-9 comX::erm). Se calcularon los niveles relativos de expresión utilizando el método de umbral crítico comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) como se describe por Livak y Schmittgen (Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001). Los datos se expresan como la media de tres experimentos independientes y fueron significativos según un análisis de la varianza ($P < 0,05$).

Como se muestra en la figura 3, el nivel de expresión de comGA y dprA de la cepa LMD-9 fue mayor que la de la cepa TIL883. En menor medida, pero con valores significativos ($P < 0,05$), se obtuvieron resultados similares con comX y recA que fueron 5 veces y 4 veces más altamente expresados en la cepa LMD-9, respectivamente.

50 Para confirmar que la transcripción de genes dprA, comGA y recA está bajo el control de ComX, se comparó la expresión de estos genes en la cepa LMD-9 y la cepa TIL1196 (LMD9 comX::erm). Como era de esperar, la transcripción de los tres genes fue significativamente mayor en la cepa LMD-9 que en la cepa TIL1196 (Fig. 3), confirmando que su transcripción es controlada positivamente por ComX.

4) La proteína de unión al oligopéptido AmiA3 juega un papel principal en el control de la competencia.

El genoma de la cepa LMD-9 muestra sólo dos genes que codifican las proteínas de unión a oligopéptidos, *amiA1* (*ster-1409*), el primer gen del operón *ami* (de *ster-1408* a *Ster-1405*) y *amiA3* (*ster-1411*) que está flanqueado por dos genes de codificación de transposasa.

5 Se construyeron tres cepas, TIL1197 (*amiA3::erm*), TIL1198 (Δ *amiA1*) y TIL1199 (*amiA3::erm* Δ *amiA1*) correspondientes a la mutagénesis de inserción de *amiA3*, la supresión de *amiA1* y una combinación de ambas mutaciones, respectivamente.

La capacidad de transformación de las tres cepas se ensayó usando ADN cromosómico de la cepa TIL1193 y se comparó con la de la cepa LMD-9 en su grado óptimo de competencia, es decir, una hora después de la dilución de las células en CDM.

10 Como era de esperar, se obtuvieron células no resistentes a la kanamicina después de la transformación de la cepa TIL1199. Sin embargo, el porcentaje de la tasa de competencia de las cepas TIL1197 (*amiA3::erm*) y TIL1198 (Δ *amiA1*) en comparación con la de la cepa LMD-9 fueron 1% (error estándar de ± 2) y 48% (error estándar de ± 4), respectivamente.

Este resultado sugiere que *AmiA3* es más importante en el desencadenamiento de la competencia que *AmiA1*.

15 Como se llevaron a cabo los experimentos en un medio sin péptidos, se postuló que en *S. thermophilus*, la proteína de unión al oligopéptido *Ami3* importa un péptido involucrado con un regulador transcripcional en el control de la expresión de *comX*. Este péptido puede ser una feromona específica o un péptido resultante de la degradación de las proteínas secretadas o las proteínas liberadas por la lisis de las bacterias.

5) La composición del medio de crecimiento influye en el estado de competencia de *S. thermophilus*.

20 Se realizó la cinética de la tasa de competencia con células LMD-9 cultivadas en M17lac y con ADN del plásmido pG⁺host9 o ADN cromosómico de la cepa TIL1192.

Con ambos tipos de ADN del donante, se obtuvieron transformantes no resistentes a la eritromicina con células recogidas cada 30 min durante 2 horas.

25 Entonces, se comparó la expresión de *comGA*, *dprA*, *recA* y *comX* a partir de ARN extraído de células LMD-9 cultivadas en medio CDM y M17lac y cosechadas a DO₆₀₀ de 0,2.

Se observó que estos genes fueron, respectivamente, 1492, 2246, 24 y 236 más altamente expresados en CDM que en M17lac, lo que era consistente con la ausencia de los transformantes durante el crecimiento en M17lac.

6) Las cepas CNRZ1066 y LMG18311 no son transformables de manera eficiente en CDM.

30 Se probó la capacidad de transformación natural de las otras dos cepas de *S. thermophilus*, CNRZ1066 y LMG18311.

Para este propósito, se utilizó el plásmido pG+host9 como ADN donante y las células se recogieron cada 30 min durante 2 horas.

35 Se obtuvieron clones no resistentes a la eritromicina con la cepa CNRZ1066 y algunos clones resistentes a la eritromicina con la cepa LMG18311, una hora después de la dilución. Sin embargo, se obtuvieron 2 10^4 menos transformantes con la cepa LMG18311 que con la cepa LMD-9. También se usó ADN cromosómico de la cepa TIL1195 (*LMD-9 comeC::erm*) como ADN donante porque las regiones circundantes del gen *comEC* son altamente conservadas entre las cepas LMD-9, CNRZ1066 y LMG18311 (más de 98% de identidad de más de 5 kb aguas arriba y aguas debajo de *comEC*). Bajo esta condición, se obtuvieron clones no resistentes a la eritromicina con ambas cepas.

40 7) Identificación de un péptido estimulador de la competencia en *S. thermophilus*

45 Durante el enfoque proteómico que se describe en el párrafo 1, se observó que la síntesis de un PlcR anotado regulador de la transcripción, *ster0316*, disminuía en el mutante *Ami* en comparación con la cepa de tipo salvaje. Se sabe que estos reguladores se regulan por péptidos que son secretados y vueltos a importar por Opp. A medida que se sospechaba que la activación del estado de la competencia en *S. thermophilus* era controlado por un péptido secretado además importado por Opp, también llamado *Ami* en esta especie, se pensó que este regulador podía estar implicado en el mecanismo de control de la activación de la competencia en *S. thermophilus*. Se suprimió *ster0316* y se reemplazó por un casete de resistencia a la eritromicina. La capacidad de transformación del mutante se evaluó durante tres horas cada treinta minutos utilizando el ADN cromosómico de la cepa TIL1193 (*feo::aphA3*). Tres experimentos independientes se realizaron y se obtuvieron transformantes no resistentes a la kanamicina, lo que indicaba que *ster0316* estaba implicado en la activación de la competencia en *S. thermophilus*.

50 Un pequeño CDS, tipo papR, está situado aguas abajo del gen *ster0316* y no se anotan en el Genbank. A medida que la actividad de los reguladores PLCR era controlada por péptidos, se sospechó que el péptido codificado por

este pequeño CDS tipo papR podría estar implicado en el control de la actividad de Ster0316. El tipo papR fue eliminado y reemplazado por un casete de resistencia a espectinomicina que conducía a la construcción de un mutante tipo papR::spec. La capacidad de transformación del mutante se evaluó durante tres horas cada treinta minutos utilizando el ADN del plásmido (pGhost9). Cuatro experimentos independientes se realizaron y fueron obtenidos transformantes no resistentes a la eritromicina, indicando que el tipo papR está muy probablemente involucrado en la activación de la competencia en *S. thermophilus* probablemente mediante el control de la actividad de Ster0316.

Con el fin de comprobar que la ausencia de capacidad de transformación del mutante tipo papR::spec era el resultado de la ausencia del gen tipo papR y no el resultado de un efecto polar de la presencia del casete resistente a la espectinomicina en genes aguas arriba o aguas abajo de tipo papR, se clonó el gen tipo papR en un plásmido con el fin de expresarlo bajo el control de un promotor constitutivo fuerte y se introdujo este plásmido por electroporación en el mutante tipo papR::spec. La capacidad de transformación de los mutantes se evaluó una hora después de la dilución del cultivo previo en CDM utilizando el ADN del plásmido (pGhost9::kana). Se obtuvieron transformantes resistentes a la kanamicina, lo que indicaba que la capacidad de transformación del mutante tipo papR::esp era restaurada por la presencia de papR y que la ausencia de la capacidad de transformación del mutante papR::esp fue el resultado de la ausencia del gen tipo papR.

8) Protocolo de inducción de la competencia y transformación de *S. thermophilus*, comprendiendo el medio CDM y CSP (péptido estimulante de la competencia).

Como se usa en el presente documento, CSP se refiere al péptido tipo Pap-R o a un fragmento del mismo.

Las células de *S. thermophilus* se cultivaron durante la noche a 42°C en CDM. El cultivo se diluyó a continuación en CDM a una DO₆₀₀ 0,05. Sesenta minutos después de la dilución, se añadió el péptido estimulante de la competencia (CSP), que es el péptido maduro que comprende SEQ ID NO 1 o fragmentos o derivados de SEQ ID NO 1, que permiten inducir la competencia en *S. thermophilus*, al cultivo a una concentración final de 1 µM. Diez minutos más tarde, 100 µl del cultivo que contenía CSP se mezclaron con 1 µg de ADN y se incubó durante 2 horas a 28°C, cuando se mezcló con un ADN de plásmido replicativo termosensible o 1 hora a 42°C, cuando se mezcló con ADN cromosómico o fragmentos de la PCR, antes de ser diluido en serie y extendidos sobre placas de M17lac con el antibiótico apropiado.

9) La sobreexpresión del gen tipo papR induce la capacidad de transformación de la cepa LMG18311

La cepa de LMG18311 de *S. thermophilus* es naturalmente poco transformable. Se introdujo en esta cepa, y por electroporación, el plásmido que comprende la secuencia de SEQ ID NO 6 de codificación para los derivados de polipéptidos que tienen la secuencia SEQ ID NO 5; plásmido que permite la sobreexpresión del gen tipo papR y que se describe en el párrafo 7. La capacidad de transformación del mutante se evaluó una hora después de la dilución del cultivo de este mutante en CDM utilizando el plásmido de ADN (pGhost9::kana). 100 µl del cultivo se mezclaron con 1 µg de ADN. Las células se incubaron otras 2 horas a 30°C antes de extenderlas en placas M17lac que contenían el antibiótico apropiado. La cepa de tipo salvaje LMG18311 se utilizó como control. Se obtuvieron transformantes no resistentes a kanamicina con el control y muchos (> 1000) con el mutante que sobreexpresa el gen tipo papR. Este resultado indica que la sobreexpresión del gen tipo papR es capaz de estimular la capacidad de transformación de una cepa poco transformable.

10) Transformación de *S. thermophilus* por un plásmido que permite la sobreexpresión del gen tipo papR

Células de *S. thermophilus* se sometieron a electroporación con un plásmido de replicación en el que el gen tipo papR está bajo el control de un promotor constitutivo fuerte. Las células que contenían este plásmido se cultivaron durante la noche a 42°C en CDM. El cultivo se diluyó a continuación en CDM a un DO₆₀₀ 0,05. Una hora después de la dilución, 100 µl del cultivo se mezclaron con 1 µg de ADN y se incubó durante 2 horas a 28°C, cuando se mezcló con un ADN de plásmido replicativo termosensible o 1 hora a 42°C, cuando se mezcló con el ADN cromosómico o fragmentos de la PCR, antes de ser diluido en serie y extendido sobre placas de M17lac con el antibiótico apropiado. Los transformantes pueden además ser fácilmente curados del plásmido replicativo por crecimiento en ausencia de antibiótico.

11) Identificación de los diferentes fragmentos de la SEQ ID NO 1

La SEQ ID NO 1 es el precursor de péptidos más cortos que son secretados. Estos péptidos más cortos, que corresponden a fragmentos de SEQ ID NO 1, son péptidos activos que desencadenan el estado de competencia en *S. thermophilus*.

Para la identificación de la secuencia de estos péptidos activos más cortos, los inventores han utilizado dos cepas, una que se elimina para el gen tipo papR (denominada "cepa eliminada" a partir de aquí) y una que sobreexpresa el gen tipo papR y que es incapaz de péptidos de importar péptidos porque suprime para los genes que codifican el transportador oligopéptido Ami (denominada "cepa superproductora" a partir de aquí). En la cepa superproductora, la secuencia del péptido que se produce en exceso es la SEQ ID NO 5.

Utilizando el análisis de LC-MS/MS, los inventores han buscado masas de péptidos correspondientes a fragmentos de la SEQ ID NO 1 en el sobrenadante de cultivo de la cepa superproductora que estaban ausentes en el de la cepa eliminada. Los sobrenadantes del cultivo se trataron con el fin de ser enriquecidos en péptidos con el siguiente método:

5 (1) ultrafiltración (10 kDa de corte),

(2) inyección del ultrafiltrado (<10 kDa) en C18 Sep-Pack con una etapa de lavado con acetonitrilo 30% y una etapa de elución con acetonitrilo 40%.

Las fracciones eluidas se secaron adicionalmente y se resuspendieron con 0,1% de ácido trifluoroacético, 2% de acetonitrilo.

10 Se han identificado tres masas correspondientes a masas de cinco fragmentos diferentes de SEQ ID NO 1 (presente en la cepa superproductora y ausente en la cepa eliminada), con diferentes tiempos de retención (RT) durante los experimentos de HPLC (péptidos A-naturales, a continuación). Los inventores identificaron por tanto secuencias de fragmentos de la SEQ ID NO 1 que coincidan con las mediciones de m/z.

Los resultados se recogen a continuación:

	m/z (z = 1)	Rt (min)	Secuencias identificadas	SEQ ID NO	Competencia
Péptidos A-Naturales	1180,6434	45,83	IAILPYFAGCL	7	SÍ
			LIAILPYFAGC	8	NT
	1067,5594	42,58	AILPYFAGCL	9	NT
			IAILPYFAGC	10	NT
	996,5223	40,58	ILPYFAGCL	11	NT
Péptidos B-alquilados	1237,6649	42,98	IAILPYFAGC * L	-	NO
			LIAILPYFAGC	-	NT
	1124,5808	39,72	AILPYFAGC * L	-	NT
			IAILPYFAGC * L	-	NT
	1053,5437	37,66	ILPYFAGC * L	-	NT

15 NT, no han sido evaluados

*forma alquilada de la cisteína

En este paso, la fragmentación de iones peptídicos no fue posible debido a la debilidad de las señales de espectrometría de masas. Con el fin de confirmar la presencia de un residuo de cisteína en los diferentes fragmentos, la alquilación de los sobrenadantes de las cepas eliminada y superproductora se realizó con yodoacetamida con el protocolo siguiente: se añadieron 150 µl de NaOH 5 M a 30 ml de sobrenadante. La alquilación se realizó con yodoacetamida a una concentración final de 20 mM durante 30 min en la oscuridad. Las muestras fueron enriquecidas en péptidos como se describió anteriormente con la siguiente modificación, se añadieron 50 µl de ácido fórmico para ajustar el pH a 6,5 después de la etapa de ultrafiltración.

25 Se detectaron las masas correspondientes a las formas alquiladas de todos los fragmentos (péptidos B-alquilados), con el cambio esperado en los tiempos de retención de HPLC, en el sobrenadante de la cepa superproductora y no se detectó en la cepa eliminada confirmando que estos fragmentos contienen un aminoácido de cisteína.

La alquilación aumentó las señales de los péptidos en espectrometría de masas y permitió la fragmentación de los más largos. La fragmentación del péptido validó la secuencia IAILPYFAGCL de la masa 1237,6649 (SEQ ID NO 7).

30 En conclusión, los inventores han demostrado que la SEQ ID NO 1 es el precursor de los péptidos que son secretados en el sobrenadante de cepa de *S. thermophilus* LMD9 sobreproductora. Los inventores identificaron 3 masas correspondientes a 5 fragmentos diferentes de SEQ ID NO 1. Los inventores validaron la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 7 (IAILPYFAGCL), que es un péptido de competencia activa. Los inventores también han mostrado que las secuencias más cortas son productos de degradación de la SEQ ID NO 7 por proteasas y/o aminopeptidasas.

35 12) Actividad biológica de los fragmentos de la SEQ ID NO 1

ES 2 617 130 T3

Los inventores ensayaron la actividad de fragmentos de SEQ ID NO 1 utilizando una cepa eliminada para el gen papR utilizando el protocolo descrito en la parte 8. Los inventores sintetizaron así diferentes fragmentos de la SEQ ID NO 1 a fin de probar su actividad biológica. Los fragmentos se sintetizaron como a continuación:

SEQ ID NO 7	IAILPYFAGCL
SEQ ID NO 12	LPYFAGCL
SEQ ID NO 13	PYFAGCL

- 5 Para probar la actividad biológica de los fragmentos, se añadieron péptidos a un cultivo de una cepa eliminada para el gen papR a una concentración final de 1 μ M, 1 hora después de la dilución del cultivo a una DO₆₀₀ de 0,05 en un medio químico definido (CDM). Los ensayos de transformación se realizaron con 100 μ l de células con 1 μ g de plásmido y/o ADN cromosómico.

Los resultados se dan a conocer más abajo.

- 10 Los números de transformantes obtenidos con 100 μ l de células competentes son los siguientes:

ADN de transformación	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO.12	SEQ ID NO.13
Cromosómico	24	41	0
Plásmido	284 10^2	780 10^2	0

El residuo de cisteilo es un aminoácido reactivo debido a la presencia de un SH libre. Con el fin de probar la importancia de este residuo en la actividad biológica del péptido, se alquiló SEQ ID NO 7, como se describe anteriormente, y se ensayó su actividad.

- 15 Los números de transformantes obtenidos con 100 μ l de células competentes son los siguientes:

ADN de transformación	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO.7 alquilada
Cromosómico	35	0
Plásmido	70 10^2	2

Estos resultados indican que la SEQ ID NO 7 tiene que tener un residuo de cisteilo libre para ser activo y que el estado de oxido-reducción o la alquilación del péptido influyen en la tasa de competencia de las cepas de *S. thermophilus*.

- 20 La cepa de *S. thermophilus* LMG18311 es naturalmente poco competente y la cepa CNRZ1066 no es naturalmente competente. Sin embargo, la complementación de ambas cepas con un plásmido que sobreexpresa el gen papR las hace competentes. Los inventores probaron el efecto de la adición de SEQ ID NO 7 en la competencia de las dos cepas en la misma condición como se describe anteriormente para la cepa LMD9.

Los números de transformantes obtenidos con 100 μ l de células competentes son los siguientes:

ADN de transformación	LMG18311		CNRZ1066	
	No Fragmento	SEQ ID NO. 7	No Fragmento	SEQ ID NO. 7
Cromosómico	0	477	0	0
Plásmido	7	731 10^3	0	274 10^3

- 25 Estos resultados indican que la adición de SEQ ID NO 7 en un cultivo de la cepa de *S. thermophilus* CNRZ1066 o LMG18311 las hace competentes.

Los inventores han demostrado por tanto que la SEQ ID NO 1 y los fragmentos de la SEQ ID No 1 (en particular, SEQ ID NO 7) son capaces de estimular la competencia en *Streptococcus*.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INRA
- <120> Nuevo péptido estimulante de la competencia
- 5 <130> BCT100081
- <160> 13
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophiles
- 15 <400> 1
 Leu Lys Thr Leu Lys Ile Phe Val Leu Phe Ser Leu Leu Ile Ala Ile
 1 5 10 15
- Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
 20
- 20 <210> 2
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Streptococcus thermophilus
- 25 <400> 2
 ttgaaaaacc tgaaaatatt tgtactatatt tcaactactta ttgctatcct gccttatctt 60
 gcaggatgtc tttaa 75
- <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> Secuencia reconocida por tipo PlcR
- 35 <400> 3
 atagtgacat atatgtctct at 22
- 40 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 45 <220>
 <223> Secuencia reconocida por tipo PlcR
- <400> 4
 ggggtgacat aaatgtcact at 22
- 50 <210> 5
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 55 <220>
 <223> Polipéptido derivado de SEQ ID N°1
- <400> 5

ES 2 617 130 T3

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

Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
 20 25

<210> 6
 <211> 78
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido SEQ ID N°5

10
 <400> 6
 atggggaaaa ccctgaaaat atttgacta ttttactac ttattgctat cttgccttat 60
 tttgcaggat gtctttaa 78

15 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus

20 <400> 7
 Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
 1 5 10

25 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus

30 <400> 8
 Leu Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys
 1 5 10

35 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus

40 <400> 9
 Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
 1 5 10

45 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus

50 <400> 10
 Ile Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys
 1 5 10

55 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Streptococcus thermophilus

<400> 11
 Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 8

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> Fragmento de la SEC. ID N°7

<400> 12
Leu Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
1 5

10 <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Fragmento de la SEC. ID N°7

<400> 13
Pro Tyr Phe Ala Gly Cys Leu
1 5

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 (LKTLKIFVLFSLLIAILPYFAGCL), o derivados que tienen un porcentaje de identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, o fragmentos de SEQ ID No. 1, siendo capaces dichos derivados o fragmentos de estimular la competencia en *Streptococcus thermophilus*.
2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en el que la longitud de dicho polipéptido aislado es menos de 100 aminoácidos, preferiblemente menos de 50 aminoácidos.
- 10 3. El polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 (LKTLKIFVLFSLLIAILPYFAGCL), o en un derivado que tiene un porcentaje de identidad de al menos 90% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1.
4. El polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido aislado comprende además un péptido señal que permite su secreción en el medio extracelular cuando dicho polipéptido es expresado en *Streptococcus thermophilus*.
- 15 5. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido aislado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 5 unido operativamente a una secuencia promotora.
7. Una célula huésped modificada por ingeniería genética con el vector como se define en la reivindicación 6.
- 20 8. Un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz del polipéptido aislado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y nutrientes que permitan el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*.
9. El medio de cultivo de la reivindicación 8, en el que dicha cantidad eficaz está comprendida entre 0,1 ng/ml y 1 mg/ml.
10. El medio de cultivo de cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, que no contiene péptidos nutricionales.
- 25 11. Un uso de un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un ácido nucleico como se define en la reivindicación 5, un vector como se define en la reivindicación 6, una célula huésped como se define en la reivindicación 7, o un medio de cultivo como se define en la reivindicación 8 a 10 para estimular la competencia en bacterias de *Streptococcus thermophilus*.
- 30 12. Un método de producción de la bacteria de *Streptococcus thermophilus* competente de transformación que comprende la etapa de poner en contacto dicha bacteria de *Streptococcus thermophilus* con una cantidad eficaz de un polipéptido aislado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho método se realiza en un medio de cultivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
- 35 14. Un método para producir la bacteria mutante de *Streptococcus thermophilus*, en donde dicho método comprende (i) producir la bacteria de *Streptococcus thermophilus* competente de transformación por el método de la reivindicación 12 ó 13, y (ii) poner en contacto dicha bacteria de *Streptococcus thermophilus* competente de transformación con ADN, bajo condiciones que permitan la transformación de dicha bacteria con dicho ADN.
15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho método comprende las etapas (iii) de seleccionar y/o amplificar la bacteria mutante así generada.
- 40 16. Un método para identificar un compuesto que estimula la competencia en *Streptococcus thermophilus* que comprende las etapas de:
 - 45 i) poner en contacto, con dicho compuesto, una célula huésped (preferiblemente una bacteria) transformada con un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína indicadora (preferiblemente GFP, beta-galactosidasa) bajo el control de todo o parte de un promotor precedido por la secuencia de repetición invertida reconocida por el regulador tipo PlcR (Ster0316 en la cepa LMD9, str0270 en la cepa CNRZ1066, stu0270 en la cepa LMG18311) ATAGTGACATATATGTCTCTAT (SEQ ID NO 3) o GTGGTGACATAAATGTCATAT (SEQ ID NO 4);
 - ii) seleccionar el compuesto que estimula la expresión de dicha proteína indicadora.

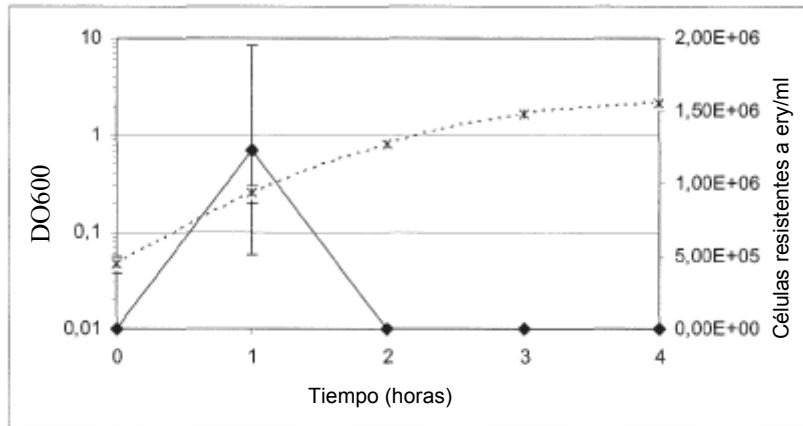


Figura 1

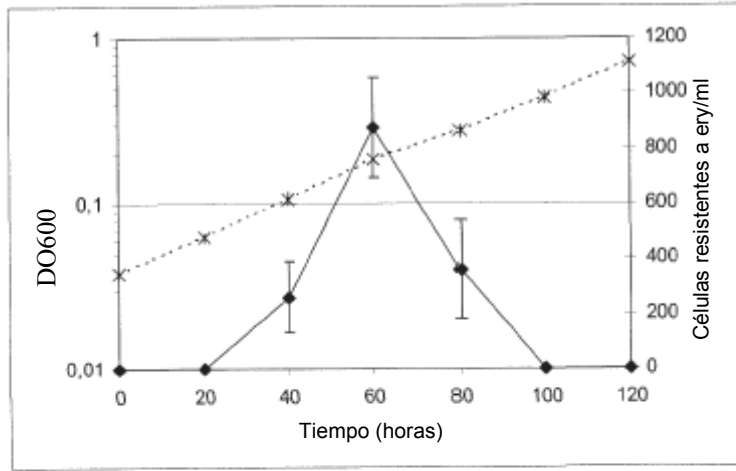


Figura 2

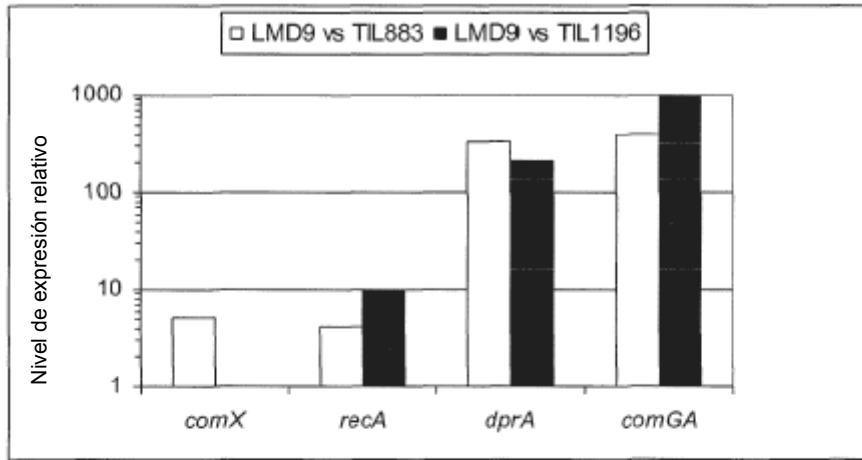


Figura 3