



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0811501-0 B1



(22) Data do Depósito: 12/03/2008

(45) Data de Concessão: 29/03/2022

(54) Título: SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA A PRODUÇÃO DE UM OU MAIS POLIPEPTÍDEO(S)-ALVO, SEU USO, E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO-ALVO LIVRE DE ANTIBIÓTICOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/75; C12N 9/04.

(30) Prioridade Unionista: 04/05/2007 DE 102007021001.0.

(73) Titular(es): AB ENZYMES GMBH.

(72) Inventor(es): CÉLINE CADOT; TINA PLOSS; RUTH SCHWERDTFEGER; BRUNO WINTER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008001977 de 12/03/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/135113 de 13/11/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/11/2009

(57) Resumo: SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA A PRODUÇÃO SEM ANTIBIÓTICO DE POLIPEPTÍDEOS. A presente invenção refere-se a um sistema de expressão para produção de um ou mais polipeptídeo-alvo/polipeptídeos-alvo compreendendo uma célula hospedeira em cujo genoma a sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato é inativado ou parcial ou completamente deletado e a qual é transformada por um elemento extracromossômico que compreende uma sequência de DNA que codifica o (s) polipeptídeo(s)-alvo e desidrogenase de glicerina-3-fosfato, pelo que não apenas o genoma da célula hospedeira, mas também o elemento extracromossômico, não trazem gene de resistência a antibiótico, bem como uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato caracterizado pelo fato de que a sequência de DNA é selecionada de a) sequências de DNA que compreendem uma sequência de nucleotídeo de acordo com SEQ ID NO: 1 b) sequências de DNA que compreendem uma sequência de nucleotídeo representada pelos nucleotídeos 1338 a 2375 de SEQ ID NO: 1, c) sequências de DNA que são codificadas pelo plasmídeo pTP01 com o mapa de plasmídeo de acordo com SEQ ID NO: 2, e) sequências de DNA que hibridizam, sob condições estridentes, a uma das sequências de (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA A PRODUÇÃO DE UM OU MAIS
POLIPEPTÍDEO(S)-ALVO, SEU USO, E MÉTODO PARA
PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO-ALVO LIVRE DE
ANTIBIÓTICOS".**

[001] A presente invenção se refere a um sistema de expressão microbiana para a produção de polipeptídeos baseado no uso de DNA extracromossômico, pelo que nenhum gene marcador de antibiótico (genes cujas proteínas derivadas proporcionam à célula resistência a um antibiótico, também denominados genes de resistência a antibiótico, genes de resistência, marcador antibiótico ou marcador de seleção por antibiótico) para a seleção da células hospedeira, mas sequências de DNA que codificam desidrogenase de glicerina-3-fosfato (também denominada reductase de di-hidroxiacetona fosfato NAD(P)H-dependente, desidrogenase de glicerina-3-fosfato NAD(P)H-dependente, desidrogenase de glicerina-3-fosfato (NADP), sintase de glicerina-3-fosfato, desidrogenase de glicerina-3-fosfato biossintética, L-glicerina-3-fosfato: oxidoreductase de NAD(P)) são usadas e, assim, a produção do polipeptídeo desejado, por exemplo, xilanase, não requer a adição de antibióticos. O sistema de expressão é sem genes de resistência a antibiótico. A invenção ainda se refere a uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato, bem como um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato.

[002] Polipeptídeos e enzimas que são necessários em grandes quantidades são, hoje, obtidos principalmente através de fermentação de micro-organismos. Dois grupos de micro-organismos são aqui usados - i) tais micro-organismos que as proteínas de interesse produzem naturalmente e ii) micro-organismos geneticamente modificados. Os métodos genéticos que são necessários para a

modificação dos micro-organismos são conhecidos no estado da técnica há muito tempo. O princípio dos mesmos é que genes que codificam proteínas de interesse são inseridos nas células hospedeiras e transcritos, traduzidos, possivelmente modificados pós-traducionalmente e opcionalmente secretados pelas respectivas membranas no periplasma ou no meio adjacente pelas células hospedeiras. Os polipeptídeos de interesse podem, então, ser isolados das respectivas células ou dos sobrenadantes de cultura.

[003] Em métodos técnicos para a produção de polipeptídeos, primeiro as habilidades naturais dos micro-organismos usados para a produção são exploradas para síntese e, opcionalmente, para secreção das proteínas. Tais sistemas que são de custo eficaz na fermentação, mostram uma alta taxa de formação de produto e prometem uma duplicação, modificação, etc. corretas do polipeptídeo a ser produzidos são, basicamente selecionados como sistemas para a produção de polipeptídeos. Os micro-organismos estabelecidos para isso são de origem eucariota tais como, por exemplo, fungos filamentosos (*Aspergilla*, *Trichoderma*, *Penicillium*) e levedos (por exemplo, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*) ou procariotas são usados tais como, por exemplo, *E. coli*, *bacilli*, *lactobacilli*, *staphylococci*, *streptomyces* ou *pseudomonades*.

[004] A adequabilidade de um método biotecnológico depende, decisivamente, do rendimento obtido do polipeptídeo. Esse rendimento não apenas é determinado pelo sistema de expressão usado, mas também pelo processo de fabricação usado, particularmente pelos parâmetros de fermentação e o meio de cultura. Otimizando o sistema de expressão e o processo de fermentação, o potencial e rendimento obtenível podem ser claramente aumentados.

[005] Micro-organismos geneticamente modificados contêm a nova informação genética integrada no genoma, conforme

frequentemente é o caso para fungos filamentosos ou levedos ou sobre elementos extracromossômicos tais como, por exemplo, plasmídeos que são frequentemente usados em procariotas ou também levedos. Os primeiros construtos, nos quais a nova informação genética é integrada no genoma do hospedeiro, também são muito estáveis sem pressão de seleção. A desvantagem desse método para procariotas é que apenas uma cópia do gene está presente no hospedeiro após a transformação e integração de outras cópias do mesmo gene para aumento da taxa de formação de produto através do efeito de gene-dosagem é metodicamente muito complexa. Uma solução para essa abordagem pode ser encontrada na EP 0 284 126 B1, o qual resolve o problema da múltipla integração estável de um gene fornecendo separadamente as cópias do gene exógeno a ser integrado no genoma da célula hospedeira através de DNA cromossômico endógeno que é vital para a célula. O pedido de patente DD 277467 A1 proporciona um método para a produção de enzimas extracelulares, o qual é baseado na integração estável, vantajosamente múltipla, dos genes que codificam um polipeptídeo de interesse no cromossoma bacteriano. A integração é aqui realizada através de recombinação através de faixas homólogas. Um gene de eritromicina que está contido sobre o plasmídeo pelo qual os genes são inseridos na célula e inativados no caso de uma integração com sucesso serve como um controle dos eventos de integração com sucesso.

[006] O pedido WO 96/23073 A1 descreve um sistema baseado na transposição para a integração de várias cópias de um gene de interesse no cromossoma bacteriano caracterizado pelo fato de que os genes marcadores do vetor são deletados durante ou após a integração e, assim, as cepas obtidas são isentas de um gene marcador. De acordo com esse documento, um marcador é necessário apenas durante a construção da respectiva cepa bacteriana.

[007] Um sistema para aumento do número de cópias de determinados genes integrado em um cromossoma bacteriano é descrito no pedido WO 01/90393 A1.

[008] Se DNA extracromossômico é usado para a produção de um micro-organismo geneticamente modificado, o gene de interesse é transferido para um elemento de replicação autônoma, por exemplo, um plasmídeo, e epissomicamente mantido no organismo hospedeiro. O efeito de gene-dosagem através do número usualmente alto de cópias de plasmídeo por célula influencia, vantajosamente, o rendimento do polipeptídeo que é codificado pelo gene de interesse. Desvantajoso é o fato de que uma pressão de seleção tem de ser mantida durante todo o tempo de cultura para manter os elementos extracromossômicos estáveis na célula. Como uma regra, isso ocorre através da adição de antibióticos ao meio de cultura. Uma vez que o gene pelo qual o micro-organismo se torna resistente ao antibiótico está localizado sobre o elemento extracromossômico, apenas as células que têm tal elemento podem crescer. O gene de interesse é mantido nas células em um alto número de cópias localizando-o sobre o mesmo plasmídeo, pelo que os hospedeiros se tornam resistentes ao antibiótico/antibióticos. Usando antibióticos como pressão de seleção, perda do plasmídeo em virtude de instabilidade segregativa ou estrutural pode ser evitada (Bron e Luxen, 1985, Plasmid 14, 235-244). Dessa forma, plasmídeos maiores podem também ser mantidos estáveis na célula e a célula mantém a capacidade de produzir o polipeptídeo desejado. Geralmente, uma perda de DNA extracromossômico ocorre muito facilmente, em particular se é sobre DNA que é desconhecido desse organismo. Conforme com plasmídeos que contêm bactérias naturalmente, a aplicação de pressão de seleção é também frequentemente razoável, uma vez que os elementos extracromossômicos que ocorrem naturalmente estão

frequentemente presentes apenas em um baixo número de cópias; contudo, um alto número de cópias é necessário para uma taxa de produção comercialmente alta. Esse alto número de cópias pode, contudo, usualmente ser mantido apenas através de uma pressão de seleção.

[009] O uso de resistências a antibiótico como marcador de seleção tem sido considerado mais e mais criticamente em anos recentes. Primeiramente, o uso de antibióticos é caro, particularmente se a resistência é baseada em uma enzima que degrada o antibiótico, de modo que o antibiótico deve ser fornecido durante todo o cultivo. Em segundo, seu uso mundial, o qual também se estende a outros campos de engenharia e medicina, contribui para a disseminação de genes de resistência para outras cepas também patogênicas, o que poderia ter consequências negativas sobre o controle da doença.

[010] Sistemas de seleção sem antibiótico também já foram desenvolvidos na técnica anterior. Por exemplo, a publicação de Herrero e outros (1990, J. Bacteriol. 172, 6557-6567) descreve resistências a herbicidas e metais pesados como marcador de seleção. Contudo, as mesmas preocupações contra antibióticos surgem contra o uso desses compostos.

[011] Outro método aplicado para manter plasmídeos estáveis na célula é a complementação epissômica de cepas auxotróficas. Nesse caso, genes do genoma da cepa de produção que codificam funções metabólicas essenciais são removidos ou inativados. As cepas hospedeiras assim auxotróficas podem crescer apenas se a função metabólica é alternativamente reproduzida. O produto metabólico necessário pode, por exemplo, ser adicionado ao meio se a cepa é capaz de aceitar esse metabólito ou o gene que é desativado sobre o genoma do hospedeiro e que codifica a função essencial pode ser tornado epissomicamente disponível. Vantajosamente, isso ocorre

sobre o plasmídeo que também traz o gene de interesse para a produção de um polipeptídeo. A patente EP 0 284 126 B1 lista os genes metabólicos *leu*, *his*, *trp* ou semelhante, particularmente aqueles das vias de síntese de aminoácido, como marcadores de seleção auxotrófica.

[012] Na prática, o uso de tais auxotropias como marcadores de seleção tem sido muito difícil até o momento uma vez que, particularmente em meios de fermentação industriais, quase todas as substâncias necessárias, tais como aminoácidos e vitaminas, estão disponíveis em quantidades suficientes e as respectivas células podem equilibrar a incapacidade de síntese de um determinado metabólito através de absorção desse metabólito do meio de cultura.

[013] Os meios de fermentação industrialmente usados contêm, usualmente, componentes que são produtos residuais de outros, frequentemente processos fermentativos, por exemplo, resíduos de grão da produção de etanol (grão consumido de destilarias), resíduos de milho da produção de amido (pó de sabugo de milho ou licor de sabugo de milho) ou resíduos de batata da produção de batata (sedimento de batata). Esses componentes servem não apenas como fonte de carbono (C) ou fonte de nitrogênio (N), mas também são, frequentemente, ricos, por exemplo, em vitaminas ou aminoácidos em virtude da fermentação microbiana que foi envolvida em sua recuperação. Os meios de fermentação industrialmente usados são, conseqüentemente, muito complexos. Assim, é difícil, se não mesmo impossível, manter uma pressão de seleção nesses mesmos, mesmo se cepas auxotróficas são usadas.

[014] Até o momento, as únicas exceções são auxotropias para a timidina e D-alanina essenciais necessárias para *Bacilli* e micro-organismos gram-positivos, os quais estão presentes apenas em traços ou nem isso em meios de fermentação industriais e, assim,

devem ser produzidos pelos micro-organismos em si. Portanto, o pedido EP 0 251 579 A1 proporciona a solução ao usar, como cepas hospedeiras, cepas que são deficientes com relação ao gene essencial para o metabolismo de nucleotídeo para a sintase de timidilato. Consequentemente, o gene pode ser tornado disponível quanto à sua função (thyA de *Escherichia coli* K12) por meio de um vetor e cura do defeito gênico. A patente EP 0 185 512 B1 resolve o problema através da inserção do gene *dal* (racemase de D,L-alanina) no plasmídeo usando cepas hospedeiras *dal*-deficientes.

[015] Uma outra solução para esse problema foi descrito no pedido WO 2004/078953. É descrito que os fatores essenciais envolvidos na secreção eram adequados para uma seleção. Um gene cuja proteína derivada está envolvido na translocação de proteína como um fator que é essencial para o respectivo gene, por exemplo, com relação a *Bacillus*, as proteínas SecA, SecY, SecE, b-SRP, FtsY ou PrsA, proporcionam a base para seleção. Isso significa que a falha de tal fator é letal e, assim, permite uma seleção antibiótico-similar dos micro-organismos recombinantes.

[016] Acima de tudo deve ser estabelecido que, a despeito da experiência na produção de polipeptídeos através de métodos biotecnológicos durante anos, até o momento, não foi proporcionado um sistema praticável pelo qual a produção com um alto número de cópias do gene de interesse sem seleção através de substâncias caras ou ecologicamente questionáveis, tais como antibióticos, seja possível. Até o momento, as diferentes abordagens para a seleção através de marcadores auxotrópicos também resultou em resultados negligenciáveis em virtude do meio de cultura complexo usado na indústria (WO 2004/078953) ou sistemas que ainda contêm genes de resistência a antibiótico.

[017] O uso de meios definidos compostos de componentes

purificados (fontes de C e fontes de N puras, bem como vitaminas, aminoácidos e minerais) não é possível para a produção de polipeptídeos industrialmente usados tais como, por exemplo, enzimas, na indústria alimentícia, indústria de ração ou indústria de detergente em virtude do alto custo dos mesmos.

[018] Portanto, é o objetivo da presente invenção proporcionar um sistema de expressão para a produção de polipeptídeos pelos quais não há seleção através de substâncias caras e/ou poluentes e/ou não-saudáveis. Uma seleção não ocorre através de resistências a antibiótico, em particular. O sistema de expressão de acordo com a invenção é facilmente aplicável e universalmente adequado para expressão de quaisquer polipeptídeos-alvo. Além disso, o sistema de expressão de acordo com a invenção é adequado para o estabelecimento em quaisquer células hospedeiras. Além disso, o sistema de expressão de acordo com a invenção é também para permitir uma seleção em meios de cultura industrialmente usuais ou de custo eficaz.

[019] O objetivo é resolvido por um sistema de expressão para a produção de um ou mais polipeptídeo-alvo/polipeptídeos-alvo compreendendo uma célula hospedeira em cujo genoma a sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato é inativado ou parcial ou completamente deletado e a qual é transformada por um elemento extracromossômico que compreende uma sequência de DNA que codifica o(s) polipeptídeo(s) alvo e desidrogenase de glicerina-3-fosfato, pelo que não apenas o genoma da célula hospedeira, mas também o elemento extracromossômico, não trazem gene de resistência a antibiótico.

[020] Surpreendentemente, descobriu-se que um gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato que é proporcionado sobre um elemento extracromossômico pode ser usado nas respectivas células

hospedeiras auxotróficas para a seleção das células hospedeiras correspondentes. O elemento auxotrófico que traz o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato também traz o gene para o polipeptídeo de interesse a ser produzidos.

[021] Portanto, o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato serve como um marcador de seleção para estabilização do elemento extracromossômico nas células hospedeiras auxotróficas. Essa estabilização do elemento extracromossômico, o qual compreende uma sequência de DNA que codifica o(s) polipeptídeo(s) alvo e desidrogenase de glicerina-3-fosfato, é baseada na complementação epissômica da célula hospedeira tornada auxotrófica. No genoma da cepa hospedeira, uma sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato ou um respectivo gene é inativada. Esse gene codifica a enzima desidrogenase de glicerina-3-fosfato (também denomina reductase de di-hidroxiacetona fosfato NAD(P)H-dependente; sintase de glicerina-3-fosfato, desidrogenase de glicerina-3-fosfato biossintética; Morbidoni e outros, 1995, J. Bacteriol. 177 (2), 5899-5909; números EC 1.1.1.8, 1.1.1.94, aqui também, *inter alia*, desidrogenase de glicerina-3-fosfato NAD(P)H-dependente, desidrogenase de glicerina-3-fosfato (NADP), oxidoreductase de L-glicerina-3-fosfato: NAD(P)). A desidrogenase de glicerina-3-fosfato catalisa a conversão de di-hidroxiacetona fosfato em sn-glicerina-3-fosfato sob a ligação de NAD(P)H. A sn-glicerina-3-fosfato em si é a substância inicial para a síntese de fosfolipídio da célula e, assim, metabólito central para a síntese de membrana celular. Dependendo do organismo, o gene para a desidrogenase de glicerina-3-fosfato NAD(P)H-dependente é, *inter alia*, referido como *gpsA* (também denominado *gol*, *gly*, *glyc*), *gpd* (*gpd 1/2/3/A/A1/A2/h*) ou *dar1*. Geralmente, ela é a enzima que catalisa a síntese de glicerina-3-fosfato sob condições fisiológicas e usualmente usa NAD(P)H como

cofator. Uma enzima que usa um cofator diferente, por exemplo, FAD, também seria concebível. Dependendo da cepa hospedeira, o gene correspondente que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato ou genes de desidrogenase de glicerina-3-fosfato são inativados.

[022] Deletando o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato no genoma da cepa hospedeira, essa cepa se torna auxotrófica para glicerina-3-fosfato (G3P); contudo, pode crescer se o meio de cultura é correspondentemente suplementado (com G3P ou glicerina) ou o gene correspondente é episomicamente proporcionado. Inserindo o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato no plasmídeo, o qual também traz a sequência de DNA para o polipeptídeo de interesse, o plasmídeo é mantido estável na célula hospedeira auxotrófica. Concorrentemente, os genes de resistência a antibiótico, os quais usualmente existem sobre plasmídeos, são eliminados. Além disso, genes de resistência a antibiótico que estão opcionalmente presentes no genoma de uma célula hospedeira são também eliminados. A eliminação dos genes de resistência a antibiótico é realizada em uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, do genoma através de recombinação homóloga (vide abaixo) ou do plasmídeo através de excisão por meio de enzimas de restrição adequadas e subsequente ligação.

[023] A respectiva sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato é deletado no genoma da célula hospedeira do sistema de expressão de acordo com a invenção. A deleção pode ser completa ou parcial. Em qualquer caso, a deleção deve estar presente para o efeito de que o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato seja inativado. A inativação desse gene na cepa hospedeira ocorre através de recombinação homóloga com uma cópia do gene inativado ou (parcialmente) deletado, por exemplo. Como um resultado desse evento de recombinação, a cópia cromossômica do gene se torna

inoperável. Além disso, sistemas preferidos são caracterizados pelo fato de que a inativação do gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato sobre o vetor de complementação de cura é evitada, de preferência, em uma perda completa do gene ou seção gênica compreendida no respectivo *locus* cromossômico. Uma recombinação e integração do vetor de complementação no genoma do hospedeiro, pelo quais a célula é epissomicamente fornecida com a função essencial, curariam a inativação novamente e, assim, compensando a pressão de seleção pela qual o plasmídeo é mantido estável na célula. O gene realmente de interesse e a ser expresso poderia, desse modo, ser pedido através de subseqüentes divisões celulares ou estaria presente apenas em uma ou poucas cópias sobre o cromossoma. Isso é impedido através de uma deleção completa ou extensiva durante a etapa de inativação, a qual pode, teoricamente, também envolver seções de DNA que estão localizadas a montante ou a jusante. Deve ser levado em conta que as regiões a montante ou a jusante do gene *gpsA* podem ter funções na cepa hospedeira que também são essenciais para o hospedeiro.

[024] Para excluir uma recombinação homóloga entre o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato proporcionado pelo elemento extracromossômico e um gene cromossômico opcionalmente presente, é necessário inativar o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato sobre o genoma do hospedeiro não apenas através de uma mutação de ponto individual, mas removê-lo extensiva ou completamente. A eliminação do gene do genoma do hospedeiro é, por exemplo, realizada através de recombinação homóloga por meio de um vetor de deleção compreendendo apenas uma parte inativa do gene ou, ainda melhor, apenas as regiões de flanqueamento do gene sem o gene em si, de modo que a cópia do gene sobre o genoma do hospedeiro é substituída pela cópia truncada presente sobre o vetor de

deleção ou completamente deletado. É essencial que nenhum gene marcador de antibiótico seja aqui deixado para trás. A fim de eliminar o gene completamente do hospedeiro, é necessário isolar as regiões que flanqueiam o gene a montante e a jusante do genoma do hospedeiro e inserir essas regiões de flanqueamento sem o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato em si em um vetor de deleção. Então, a recombinação homóloga ocorre entre as sequências que flanqueiam o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato, pelo que o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato é completamente removido do genoma.

[025] De acordo com a invenção, o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato deletado ou inativado sobre o cromossoma do hospedeiro é novamente tornado disponível à célula sobre um elemento extracromossômico também trazendo uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo de interesse. Não apenas o mesmo gene que foi deletado na respectiva célula hospedeira, mas também um gene correspondente que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato NAD(P)H-dependente, podem ser tornados disponíveis à célula hospedeira novamente.

[026] Portanto, a invenção também se refere a um vetor para a complementação do genoma de uma célula hospedeira na qual a sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato é deletada, compreendendo uma sequência de DNA que codifica o(s) polipeptídeo(s) alvo e um cassete de expressão que compreende uma sequência de DNA que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato, pelo que o vetor não contém genes de resistência a antibiótico. Assim, o vetor cura a inativação do DNA que codifica a desidrogenase de glicerina-3-fosfato ("vetor de complementação"), isto é, ele proporciona extracromossomicamente uma cópia do gene ativo que codifica desidrogenase de glicerina-3-fosfato. Os termos "vetor" e "plasmídeo"

são basicamente usados permutavelmente. Outros elementos extracromossômicos tais como, por exemplo, fagos, pagmídeos ou transposons, também podem servir como vetores.

[027] Um plasmídeo que mantém um alto número de cópias na célula hospedeira é preferido como um vetor. É particularmente vantajoso se o plasmídeo é um plasmídeo que estabelece uma base (por exemplo, 10 a 30 plasmídeos por célula), de preferência em um número múltiplo de cópias (mais de 30 plasmídeos por célula). Quanto mais cópias do plasmídeo estão presentes, maior é o rendimento do produto de proteína desejado em virtude do efeito de gene-dosagem.

[028] De acordo com a invenção, o vetor de complementação não contém quaisquer genes de resistência a antibiótico. Além disso, o vetor de complementação contém não apenas as sequências de interesse para a produção de polipeptídeo, mas também um cassete de expressão com o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato.

[029] De preferência, a sequência deletada que codifica a desidrogenase de glicerina-3-fosfato e está endogenamente presente nas células hospedeiras é aqui usada. Contudo, também é possível usar sequências de outros organismos que codificam uma enzima tendo a mesma função, de preferência de cepas relacionadas, se elas são capazes de curar o respectivo defeito e, desse modo, proporcionar um sistema que assegura uma alta produtividade da proteína de interesse sem pressão de seleção adicional. Uma perda desse DNA extracromossômico seria letal para a célula hospedeira auxotrófica se crescendo em meio mínimo, de modo que tal célula é forçada a transmitir esse elemento extracromossômico para a geração seguinte em cada divisão celular. Há uma pressão de seleção endógena no sistema de acordo com a invenção, na medida em que a cepa recombinante cresça em um meio sem fornecimento de glicerina-3-fosfato ou glicerina. Não é necessário adicionar um antibiótico para

evitar a perda do vetor com o gene a ser expresso.

[030] Os cassetes de expressão que podem ser usados para a introdução de uma sequência de DNA que codifica a atividade de uma desidrogenase de glicerina-3-fosfato ou uma rede de leitura aberta de acordo com a invenção em uma célula hospedeira compreende, de preferência, uma região de início de transcrição que está ligada à rede de leitura aberta. Tal cassete de expressão pode compreender uma variedade de sítios de clivagem por restrição para a inserção da rede de leitura aberta e/ou outro DNA, por exemplo, uma região de regulação de transcrição. O cassete de transcrição compreende, na direção 5'→3' da transcrição, uma região de início de transcrição e tradução, a sequência de DNA que codifica a atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato e uma região de término de transcrição e tradução que é funcional em uma célula microbiana. A região de término pode ser nativa com relação à região de início de transcrição, pode ser nativa com relação à sequência de DNA de interesse ou pode ser derivada de qualquer outra fonte.

[031] O termo "rede de leitura aberta" (ORF) se refere à sequência de aminoácido que é codificada entre os códons inicial e terminal de tradução de uma sequência de codificação. Os termos "códon inicial" e "códon terminal" se referem a uma unidade de três nucleotídeos adjacentes (códon) em uma sequência de codificação, os quais especificam o início e final de cadeia da síntese de proteína (tradução de mRNA).

[032] Com relação a um ácido nucleico, "ligação operável" se refere a um composto como parte da mesma molécula de ácido nucleico em uma posição e orientação adequadas ao início de transcrição do promotor. DNA em ligação operável a um promotor está localizado abaixo da regulação de início de transcrição do promotor. Sequências de codificação podem ser operavelmente ligadas à

sequência regulatória, na orientação senso ou anti-senso. Com referência a polipeptídeos, ligação operável significa o composto como parte do mesmo polipeptídeo, isto é, através de ligações de peptídica.

[033] De acordo com a invenção, quaisquer promotores podem ser usados, na medida em que eles mantenham o sistema de acordo com a invenção estável. Em uma modalidade preferida, promotores fracos e constitutivos são usados. Promotor usualmente se refere à sequência de nucleotídeo a montante (5') com relação à sequência de codificação e controla a expressão da sequência de codificação proporcionando o reconhecimento da RNA polimerase e outros fatores que são necessários para a transcrição correta. O promotor usado de acordo com a invenção pode compreender um promotor mínimo, isto é, uma sequência de DNA curta a partir de uma caixa TATA e outras sequências que especificam o sítio de início de transcrição ao qual elementos regulatórios são presos para controlar a expressão.

[034] Com o sistema de expressão de acordo com a invenção, o polipeptídeo de interesse pode ser produzido com um rendimento se não maior, pelo menos o mesmo, sem a adição de antibiótico em qualquer ponto da produção e sem genes marcadores de antibiótico estarem presentes e sem antibióticos ou genes de resistência a antibiótico estarem presentes no produto de proteína. Usando o sistema de expressão de acordo com a invenção, os produtos podem, portanto, também ser usados naquelas aplicações nas quais a presença de genes marcadores de antibiótico completos ou parciais não são admissíveis ou desejados.

[035] A invenção ainda se refere ao uso do sistema de expressão para a produção sem antibiótico do polipeptídeo-alvo. O sistema de expressão é, desse modo, crescido em um meio que é isento de glicerina-3-fosfato ou compostos que proporcionam glicerina-3-fosfato. Exemplos de tais meios são estabelecidos acima. O crescimento do

sistema de expressão é realizado de uma maneira conhecida *per se*.

[036] O sistema de expressão de acordo com a invenção é adequado para quaisquer células hospedeiras. O sistema de expressão de acordo com a invenção pode, em geral, ser usado para praticamente todas as células hospedeiras industriais que são importantes para produção fermentativa de proteína. São exemplos organismos hospedeiros gram-positivos, por exemplo, dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ou *Bacillus*, particularmente das espécies *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. globigii*, *B. megaterium*, *B. clausii* ou *B. lentus* e, muito particularmente, derivados das cepas *B. licheniformis* ou *B. amyloliquefaciens*.

[037] O uso de cepas de *Bacillus* como células hospedeiras é preferido. Particularmente preferido é o uso de *Bacillus amyloliquefaciens*. Em *Bacillus amyloliquefaciens*, o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato está presente como *gpsA*. Surpreendentemente, descobriu-se que o sistema de expressão de acordo com a invenção pode ser estabelecido em *Bacillus amyloliquefaciens* sem uma redução do número de cópias do plasmídeo de produção comparado com o plasmídeo contendo marcador de antibiótico análogo (derivado de pUB110). Antes, foi possível obter uma alta produtividade com uma cepa hospedeira de *Bacillus amyloliquefaciens* assim transformada (*GpsA*⁻), mesmo se comparado com a cepa hospedeira transformada pelo plasmídeo inicial com gene marcador de antibiótico (pIK91 derivado de pUB110, vide EP 0 585 617 B1) (*GpsA*⁺).

[038] Ainda, descobriu-se que o gene *gpsA* endógeno de *Bacillus amyloliquefaciens* pode ser melhor removido do genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* através do uso das sequências que flanqueiam esse gene. Além disso, é vantajoso se o gene *gpsA* endógeno como tal é

proporcionado episomicamente. O gene *gpsA* de *Bacillus amyloliquefaciens*, o qual era desconhecido até o momento, foi isolado para essa finalidade. Embora bancos de dados de sequência tais como, por exemplo, EMBL (European Bioinformatics Institute (EBI), Cambridge, Grã Bretanha; <http://www.ebi.ac.uk>) ou GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contenham dados do gene *gpsA*, uma comparação do gene de acordo com a invenção com genes *gpsA* de outros organismos mostra apenas 76% de identidade, a nível de DNA, com o gene descrito para *Bacillus subtilis* ou 71% de identidade com o gene de *Bacillus licheniformis*.

[039] A enzima desidrogenase de glicerina-3-fosfato proporciona, em *Bacilli*, sn-glicerina-3-fosfato (G3P), um metabólito essencial da síntese de membrana celular. Morbidoni e outros (1995) descrevem que o teor de G3P na célula de *Bacillus subtilis* deve ser regulado muito finamente e que o equilíbrio entre síntese e degradação de G3P na célula é muito crítico. Experimentos por Freese e outros (1972, em: Halverson e outros (ed.) Spores V, 212-221) mostram que células de *B. subtilis* nas quais fosfato de glicerina se acumula em virtude de um defeito da desidrogenase de glicerina de fosfato (Gof) catabólica crescem pior do que células normais e que a esporulação é suprimida.

[040] Geralmente, é desejável que o gene de interesse que codifica o polipeptídeo a ser produzido esteja presente na célula hospedeira em um número possivelmente alto de cópias para aumentar o rendimento através do efeito de gene-dosagem. Assim, em uma modalidade preferida, plasmídeos que estão presentes na célula com várias cópias são usados tais como, por exemplo, derivados de pUB110, o qual está presente com cerca de 50 cópias por célula (Gryczan e outros, 1978, J. Bacteriol. 134, 318-329). A introdução de tais cópias numerosas do gene *gpsA* a ser complementado poderia,

contudo, perturbar o equilíbrio sensível entre a síntese e degradação de G3P.

[041] Surpreendentemente, agora descobriu-se que esses problemas descritos para *Bacillus subtilis* não ocorrem em *Bacillus amyloliquefaciens* sob as condições de acordo com a invenção. Em uma modalidade preferida, o gene *gpsA* é, desse modo, colocado abaixo de um promotor fraco. Zyprian e Matzura (1986, DNA 5, 219-225) reportam que, no vetor pUB110, tal promotor está naturalmente presente. Se o gene *gpsA* é colocado sob a regulação desse promotor, o equilíbrio delicado entre síntese e degradação de G3P na célula é aparentemente mantido, a despeito do número aumentado de cópias do gene comparado com uma célula de *Bacillus* não modificada. Uma vez que o promotor é também constitutivo, desidrogenase de glicerina-3-fosfato suficiente é proporcionada no ciclo celular de *Bacillus* em qualquer ponto de tempo. Além disso, esse sistema também resulta em uma manutenção estável do alto número de cópias na célula hospedeira *gpsA*-negativa se crescida em meio complexo. Isso permite a produção de polipeptídeos de interesse, os quais também são codificados pelo vetor de complementação, em altas concentrações no meio de cultura usualmente utilizado pela indústria.

[042] Conforme já afirmado, de acordo com a invenção, quaisquer promotores podem ser usados, na medida em que eles mantenham o sistema de acordo com a invenção estável. Promotores constitutivos fracos são particularmente preferidos tais como, por exemplo, o promotor antes mencionado descrito para o plasmídeo pUB110 por Zyprian e Matzura (1986). O promotor *ptsH* de *B. subtilis* é também um promotor fraco e constitutivo adequado (Stulke e Hillen, 2000, Annu. Rev. Microbiol. 54, 849-80).

[043] Conforme afirmado acima, no sistema de expressão de acordo com a invenção, o gene de desidrogenase de glicerina-3-

fosfato é inativado sobre o cromossoma do hospedeiro. A incapacidade de sintetizar desidrogenase de glicerina-3-fosfato é equilibrada por um fornecimento epissômico do respectivo gene. Mutantes de *Bacillus subtilis* *gpsA*-negativos já foram produzidos através de mutação clássica há muito tempo (Mindich, 1970, J. Mol. Biol. 49, 415-432). As mutações são alelos do gene *gpsA* (Morbidoni e outros, 1995), os quais provavelmente têm apenas mutações de ponto no gene *gpsA* ou sua regulação.

[044] Essas cepas (e esse método) não são utilizáveis para uma produção de proteína industrial, uma vez que poderia haver remutação espontânea à forma ativa, bem como recombinação do gene *gpsA* intacto epissomicamente fornecido com o gene cromossômico defectivo em virtude das longas regiões de homologia (conforme também Ostroff e outros, 1984, Mol. Gen. Genet. 193, 299-305). Khasanov e outros (1992, Mol. Gen. Genet. 234, 494-497) mostraram que já poderia haver uma recombinação homóloga no genoma em homologias de 70 bp em *Bacillus*. Em tal caso, as células hospedeiras poderiam se tornar prototróficas novamente e não seriam mais dependentes do plasmídeo com o gene *gpsA*. Isso poderia levar a uma integração mais fácil ou perda do plasmídeo, de modo que o polipeptídeo de interesse, o gene do qual também está presente sobre o plasmídeo, não poderia mais ser produzido pela célula hospedeira ou apenas em pequenas quantidades.

[045] O gene *gpsA*, bem como as regiões a montante e a jusante do gene, não são descritos para *B. amyloliquefaciens*, os bancos de dados (por exemplo, EMBL, GenBank, SubtiList (Moszer e outros, 1995, Microbiology 141, 261-268, Moszer, 1998, FEBS Lett. 430, 28-36; <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>)) fornecem apenas dados sobre *Bacillus subtilis* e micro-organismos que são mais distantemente relacionados. A organização do genoma de *B. amyloliquefaciens* não é

conhecida. Genes que estão localizados sobre o cromossoma de *B. subtilis* em proximidade direta com o gene *gpsA*, isto é, que representam as regiões de flaqueamento necessárias para a produção do hospedeiro auxotrófico podem estar presentes sobre o genoma de *B. amyloliquefaciens* em posições completamente diferentes ou podem mesmo estar faltando em geral. Também, deve ser levado em consideração que as regiões a montante e a jusante do gene *gpsA* podem codificar funções na cepa hospedeira que são essenciais para o hospedeiro. Para *B. subtilis*, genes com funções desconhecidas são descritos a montante e a jusante, enquanto que não há informação sobre genes adjacentes para *B. amyloliquefaciens*. Assim, é aconselhável manter completamente as regiões adjacentes ao gene *gpsA* para *B. subtilis* e também para *B. amyloliquefaciens* e outros *Bacilli* de modo a não destruir funções desconhecidas e, assim, complementáveis, do genoma. Uma deleção completa, mas possivelmente precisa do gene *gpsA* que não causa qualquer mutação ou desvio da rede de leitura nos possíveis genes adjacentes é, assim, aspirada de acordo com a invenção.

[046] Uma recombinação homóloga para a remoção precisa de um gene cromossômico ou fragmentos gênicos obterá mais sucesso quanto mais longas as regiões homólogas são (conforme Hamilton e outros, 1989, J. Bacteriol. 171 (9) 4617-4622). Descobriu-se que as regiões que flaqueiam o gene *gpsA* de *B. amyloliquefaciens* mostram apenas uma identidade de sequência de cerca de 84% para a região de cerca de 1,3 kbp a montante e uma identidade de cerca de 69% para a região de cerca de 1,1 kbp a jusante das regiões correspondentes de *B. subtilis* - conforme descrito no banco de dados SubtiList (Moszer e outros, 1995; 1998). A amplificação das regiões de flaqueamento sobre o DNA cromossômico da cepa hospedeira *B. amyloliquefaciens* foi, assim, extremamente difícil, particularmente

uma vez que possivelmente regiões homólogas longas para a construção do vetor de deleção tiveram de ser produzidas.

[047] A deleção do gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato sobre o cromossoma do hospedeiro foi realizada, por exemplo, por meio de vetores de plasmídeo tendo uma origem de replicação que é sensível à temperatura ou não funciona em *Bacilli* e nos quais as possíveis regiões de DNA homólogas (flanqueamento) do gene a ser deletado foram adicionalmente inseridas (vetor de deleção). Uma inativação reversível, por exemplo, através de integração de um elemento genético móvel, por exemplo, um transposon, no gene a ser inativado poderia, contudo, também ser concebível.

[048] Métodos para a inativação de genes através de um vetor de deleção são descritos na publicação de Vehmaanperä e outros (1991, J. Biotechnol. 19, 221-240). A origem de replicação desse vetor de deleção é caracterizada por sua dependência da temperatura. Assim, é possível selecionar uma transformação com sucesso em baixa temperatura primeiro e, então, exercer uma pressão de seleção para uma integração com sucesso através de aumento da temperatura. Então, a célula é curada pelo vetor compreendendo a cópia do gene endógeno, de modo que nenhuma cópia funcional do gene está mais presente sobre o cromossoma. Não restam quaisquer sequências de vetor, isto é, também, nenhum gene de resistência a antibiótico, na célula.

[049] Portanto, a invenção se refere a uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato caracterizado pelo fato de que a sequência de DNA é selecionada de a) sequências de DNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo de acordo com 1, b) sequências de DNA que compreendem uma sequência de nucleotídeo representada pelos nucleotídeos 1338 a 2375 de SEQ ID NO: 1, c) sequências de DNA

que são codificadas pelo plasmídeo pTP01 com o mapa de plasmídeo de acordo com a Figura 4 e depositado sob o número de depósito DSM 18890, d) sequências de DNA que codificam a sequência de proteína de acordo com SEQ ID NO: 2, e) sequências de DNA que se hibridizam com uma das sequências de DNA de acordo com a), b), c) ou d) sob condições estridentes, f) sequências de DNA que são relacionadas às sequências de DNA/nucleotídeo de acordo com a), b), c), d) ou e) em virtude da degenerência do código genético e g) fitas complementares às sequências de acordo com a) a f), bem como um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato selecionado de a) um polipeptídeo codificado pela parte de codificação da sequência de DNA acima, b) um polipeptídeo tendo uma sequência de acordo com SEQ ID NO: 2 ou uma sequência derivada da mesma que é obtível através de substituição, adição e/ou deleção de um ou mais aminoácidos da mesma, c) um polipeptídeo tendo uma sequência que mostra pelo menos 77% de identidade aos aminoácidos 1 a 345 de SEQ ID NO: 2, d) um polipeptídeo que é codificado por uma sequência de ácido nucleico que se hibridiza, sob condições estridentes, com (i) os nucleotídeos 1338 a 2375 de SEQ ID NO: 1, (ii) uma sequência parcial de (i) de pelo menos 100 nucleotídeos ou (iii) uma fita complementar de (i) ou (ii), e) uma variante do polipeptídeo com SEQ ID NO: 2 compreendendo uma substituição, deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos, f) variantes alélicas das sequências de aminoácido a) a e).

[050] A invenção ainda se refere ao uso da sequência de DNA para a produção do sistema de expressão de acordo com a invenção. Foi surpreendente descobrir que uma sequência de DNA derivada de *B. amyloliquefaciens* que codifica um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato é particularmente vantajosa na produção do sistema de expressão de acordo com a invenção.

[051] Com relação às sequências reivindicadas, o grau da identidade de sequência é, de preferência, analisado determinando o número de resíduos da sequência mais curta envolvida na comparação e tendo uma contra-parte "correspondente" na outra sequência. Para fins da presente invenção, a identidade é, de preferência, determinada de uma forma conhecida *per se* usando os algoritmos usuais. De acordo com a invenção, apenas os nucleotídeos que codificam as proteínas maduras ou os aminoácidos das respectivas proteínas maduras são usados para uma comparação. De acordo com a invenção, contra-partes de sequência similares, de preferência idênticas, foram detectadas como sequências homólogas por meio de programas de computador conhecidos. Um exemplo de tal programa é o programa Clone Manager Suite, o qual compreende a parte de programa Align Plus e é distribuído pela Scientific & Educational Software, Durham, NC, EUA. Uma comparação de duas ou mais sequências de DNA ou aminoácido, conforme definido acima é, desse modo, realizada sob a opção *local alignment* de acordo com o método FastScan – MaxScore ou de acordo com o método de Neeldeman-Wunsch, mantendo os valores-padrão. Para calcular a identidade, a versão do programa "Clone Manager 7 Algin Plus 5" com as funções "Compare Two Sequences/Local/Fast Scan-Max Score/Compare sequences as DNA bases" ou, para aminoácidos, "Compare Two Sequences/Local/Fast Scan-Max Score/Compare sequences as Amino Acids" é especialmente usada de acordo com a invenção. Algoritmos disponíveis das seguintes fontes foram, desse modo, usados: Hirschberg (1975, Commun. Assoc. Comput. Mach. 18, 341-343); Myers e Miller (1988, CABIOS 4, 11-17); Chao e outros (1992, CABIOS 8, 481-487).

[052] A invenção ainda se refere à adição e/ou deleção de moléculas dos polipeptídeos acima com atividade de desidrogenase

de glicerina-3-fosfato. Assim, um polipeptídeo modificado de acordo com a invenção com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato pode ser obtido através da adição de outras sequências na extremidade N-terminal e/ou C-terminal ou na molécula, pelo que os polipeptídeos assim obtidos ainda mostram atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato ou devem ser capazes de complementar as cepas desidrogenase de glicerina-3-fosfato-deficientes. Moléculas híbridas tendo outras propriedades vantajosas podem, desse modo, ser produzidas.

[053] De acordo com a invenção, partes de sequência do polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato também podem ser deletadas mantendo a atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato. A mutação, alongamento e redução podem ser realizadas de uma forma conhecida *per se* de acordo com métodos conhecidos *per se* na técnica.

[054] A produção de tais variantes é geralmente conhecida na técnica. Por exemplo, variantes de sequência de aminoácido dos polipeptídeos podem ser produzidas através de mutação no DNA. Métodos para a mutagênese e modificação de sequência de nucleotídeo são bem conhecidos no estado da técnica (conforme, por exemplo, Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492, Kunkel e outros, 1987, Methods Enzymol. 154, 367-382, Patente U.S. Nº 4873192, Walker e Gaastra (ed.), 1983, Techniques in Molecular Biology, Mac Millan Publishing Company, New York). Referências sobre substituição de aminoácido adequada que não afeta a atividade biológica da proteína de interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff e outros (1978, Atlas of Protein Sequence and Structure. Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.). Substituições conservativas, tal como a substituição de um aminoácido por outro tendo propriedades similares são preferidas. Essas substituições

podem ser divididas em 2 grupos principais com 4 subgrupos juntos e uma substituição em cada subgrupo é referida como substituição conservativa a qual, de preferência, não afeta a atividade ou duplicação da proteína.

Alifático	Não-polar	G A P
		I L V
	Polar e não carregado	C S T M N Q
	polar e carregado	D E
Aromático		K R
		H F W Y

[055] Os termos "proteína", "peptídeo" e "polipeptídeo" são essencialmente usados de modo permutável. Um polipeptídeo ou enzima tendo atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato é referida como uma enzima que catalisa a redução NAD(P)H-acoplada de di-hidroxiacetona fosfato em glicerina-3-fosfato. A atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato pode ser determinada usando qualquer método de teste conhecido *per se* no qual um desses substratos ou produtos é usado (Morbidoni e outros, 1995; Bergmeyer, 1970, Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, 426-227).

[056] A invenção ainda se refere à sequências de DNA que codificam um polipeptídeo com atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato compreendendo mutações, modificações ou variações da sequência de acordo com SEQ ID NO: 1. Além disso, a invenção também se refere à sequências que hibridizam, sob condições relaxadas ou estringentes, com as sequências acima. Condições estringentes são: hibridização a 65 °C, 18 h em solução de sulfato de dextrano (GenescreenPlus, DuPont), então, lavagem dos filtros durante 30 min cada, primeiro com 6 x SSC, 2 x SSC, 2 x SSC, SDS a 0,1% e, então, com 0,2 x SSC a 65 °C (métodos de detecção e

transferência de membrana, Amersham).

[057] Além disso, a invenção também se refere à sequências de DNA que são relacionadas às sequências acima de acordo com a invenção em virtude da degenerência do código genético, bem como variantes alélicas das mesmas. A degenerência do código genético pode resultar de degenerência natural ou de um uso de códon especialmente selecionado. Variantes alélicas que ocorrem naturalmente podem ser identificadas usando técnicas bem conhecidas de biologia molecular tal como, por exemplo, a reação em cadeia de polimerase (PCR), técnicas de sequenciamento e técnicas de hibridização.

[058] Uma sequência de DNA que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção pode ser usado para ser deletado em quaisquer células hospedeiras e é subsequentemente tornada disponível novamente sobre o plasmídeo que também traz o gene de interesse. Após a deleção/inativação do gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato, as células hospedeiras são caracterizadas pela falta da função essencial da desidrogenase de glicerina-3-fosfato.

[059] O tipo de construção de cepas hospedeiras auxotróficas de acordo com a invenção, conforme descrito aqui, torna possível usar uma cepa de micro-organismo auxotrófica produzida, o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato cromossômico da qual foi inativado, para novas transformações contínuas com vetores de complementação similarmente construídos os quais, a cada vez, proporcionam a mesma função curando o defeito gênico mas trazem, cada um, diferentes genes para que outros polipeptídeos de interesse sejam produzidos. Assim, um sistema de produção muito prático e versatilmente utilizável é proporcionado.

[060] É a finalidade do sistema manter um elemento genético que é necessário para a produção de um polipeptídeo de interesse sem

pressão de seleção por antibiótico estável durante mais ou muitas gerações e mantê-lo em um alto número de cópias na célula. Esse elemento é o plasmídeo que traz não apenas o gene de desidrogenase de glicerina-3-fosfato, mas também o gene para o polipeptídeo a ser produzido.

[061] A manutenção dessa pressão de seleção é de vantagem para o armazenamento das cepas de produção recombinantes. A estabilidade inerente do sistema, contudo, é suficiente para manter o alto número de cópias no processo de produção e, assim, assegurar alta produtividade.

[062] Em consequência da alta estabilidade inerente, o sistema permanece estável mesmo sem a aplicação de pressão de seleção, isto é, mesmo se crescido em meio industrial (o qual pode conter traços de glicerina) na cultura principal, o rendimento do polipeptídeo-alvo não diminui durante o tempo de cultivo, isto é, o vetor de complementação é mantido estável na célula.

[063] De interesse particular são sistemas de expressão de acordo com a invenção que são dirigidos a determinados produtos produzidos através da cultura de micro-organismos, particularmente polipeptídeos ou proteínas tais como, por exemplo, enzimas hidrolíticas ou oxidoreductases, particularmente de preferência alfa-amilases, beta-amilases, amilases maltogênicas, CGTases, xilanases, alfa-galactosidases, beta-galactosidases, fosfolipases, fosfatases, fitases, endoglucanases, particularmente endo-beta-1,4-glucanases, endo-beta-1,3(4)-glucanases, endo-1,2-beta-glucanases e endo-1,3-alfa-glucanases, celulases, xilosidases, galactanases, particularmente arabinogalactan-endo-1,4-beta-galactosidases e arabinogalactan-endo-1,3-beta-galactosidases, enzimas de degradação de pectina, particularmente pectinases, esterases de pectina, pectinilases, poligalacturonases, arabanases, rhamnogalacturonases,

ramnogalacturonanacetil esterases, ramnogalacturonan-alfa-ramnosidases, liases de pectato e alfa-galacturonidases, mananases, beta-manosidases, acetil esterases de manana, acetil esterases de xilana, outras xilanases, arabinoxilanases, enzimas proteolíticas, tais como proteases e peptidases, enzimas lipolíticas, tais como lipases, digalactosil-diglicerol-esterases e cutinases e outras enzimas, tais como lacases e transglutaminases.

[064] Portanto, o uso de um sistema de acordo com a invenção em métodos industriais, principalmente para produção de proteína, é de importância particular. Métodos para a produção de uma proteína através de cultivo de células de uma cepa de micro-organismo são geralmente conhecidos no estado da técnica se o plasmídeo é baseado em uma pressão de seleção, porque ela pode ser estabelecida por antibióticos.

[065] A invenção ainda se refere a um método para a produção de um polipeptídeo de interesse usando o sistema de expressão de acordo com a invenção.

[066] Métodos de produção de proteína caracterizados pelo fato de que a proteína de interesse é secretada no meio adjacente são de importância particular. O processamento do produto obtido é aqui significativamente aliviado. Contudo, também é possível uma alternativa de acordo com a invenção para solubilizar as respectivas células que produzem a proteína subsequente à produção real e, assim, obter o produto.

[067] É um aspecto particularmente vantajoso que uma série de micro-organismos relacionados seja obtida realizando sempre o mesmo tipo de inativação e cura mas fornecendo, sobre o vetor de cura, outro gene que codifica outro polipeptídeo de interesse de cada vez. Dessa forma, um sistema desenvolvido com sucesso pode ser transferido para inumeráveis outros processos de fabricação.

Figuras

[068] As figuras em anexo explicam a invenção em mais detalhes. São mostrados na:

[069] Figura 1: sequência de DNA do gene *gpsA* com regiões de flanqueamento de *Bacillus amyloliquefaciens*; SEQ ID N° 1 (em *itálico*: gene *gpsA*, ***itálico/negrito***: RBS putativa, **negrito**: terminador putativo)

[070] Figura 2: sequência de aminoácido codificada pelo gene *gpsA* de acordo com a Figura 1, SEQ ID N° 2

[071] Figura 3: alinhamento da sequência de DNA de acordo com a Figura 1 com outras regiões *gpsA* de *Bacillus* conhecidas (*B. amyloliq.*: *Bacillus amyloliquefaciens* RH 1330; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* 168; *B. lichenif.*: *Bacillus licheniformis* ATCC 14580).

[072] Figura 4: mapa do plasmídeo pTP01 com o gene *gpsA* depositado.

[073] Figura 5: mapa de plasmídeo do plasmídeo de deleção (ALF: região localizada a montante do gene *gpsA* sobre o cromossoma de *B. amyloliquefaciens* RH 1330; ARF: região localizada a jusante do gene *gpsA* sobre o cromossoma de *B. amyloliquefaciens* RH 1330; *ermC*: o gene *ermC* codifica uma adenina-metilase que proporciona resistência contra eritromicina).

[074] Figura 6: mapa de plasmídeo do pLK91.

[075] Figura 7: mapa de plasmídeo do vetor pTP15 usado para a expressão do polipeptídeo.

[076] O plasmídeo pTP01 da Figura 4 e a cepa RH 1626 foram depositados no DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig; <http://www.dsmz.de>) em 22/12/2006 ou em 18/12/2006 sob os números DSM 18890 e DSM 18878. *Bacillus amyloliquefaciens* RH 1626, o qual foi depositado sob o número DSM 18878, é uma cepa recipiente com uma deleção de *gpsA* e sem plasmídeo. O depósito

DSM 18890 se refere a *Bacillus subtilis* RH 1632, o qual traz do plasmídeo pTP01.

[077] Os exemplos abaixo explicam a invenção em mais detalhes.

Exemplos

[078] Os trabalhos moleculares-biológicos foram realizados de acordo com métodos-padrão tais como, por exemplo, descrito no manual de Sambrook e Russell (2001, Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press). Os kits e enzimas usados foram aplicados de acordo com a especificação do respectivo fabricante.

Exemplo 1: Isolamento do gene *gpsA* de *Bacillus amyloliquefaciens*

[079] Para isolar o gene *gpsA*, DNA cromossômico de *Bacillus amyloliquefaciens* (coleção de cepa AB Enzymes GmbH) foi preparado por meio do QIAGEN DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) e o gene *gpsA* foi amplificado através de PCR. Iniciadores que se hibridizam a montante e a jusante do gene *gpsA* foram aqui usados, de modo que o gene foi completamente amplificado. Os iniciadores foram derivados das sequências das regiões de flaqueamento do *gpsA* determinadas através de sequenciamento no Exemplo 2a). Os seguintes iniciadores foram usados para a amplificação:

SEQ ID N° 3: AL_1198 gctgttaagccgccgagcttcgttg

SEQ ID N° 4: AR_180C taatcccatagcaccaagcgcaaaccac

[080] O fragmento de DNA contendo 1591 bp foi completamente sequenciado através do método de acordo com Sanger e outros (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Os iniciadores de sequenciamento usados são listados na Tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores usados para o sequenciamento completo do gene *gpsA* de *Bacillus amyloliquefaciens*

SEQ ID NO.	iniciador	sequência
3	AL_1198	gctgttaagccgccgagcttcgttg
4	AR_180C	taatcccatagcaccaagcgcaaaccac

SEQ ID NO.	iniciador	sequência
5	TPA fw 1	cgacaaaagccattcggaagtg
6	TPA fw 2	tccgcgtctatacaaattcccg
7	TPA fw 3	cgtaggcgatttaatcgtgac

[081] O gene *gpsA* tendo 1035 bp de comprimento e a desidrogenase de glicerina-3-fosfato, assim, consistindo em 345 aminoácidos é representado com as regiões de flanqueamento de DNA na Figura 1.

Exemplo 2: Deleção do gene *gpsA* em *Bacillus amyloliquefaciens*

[082] A eliminação do gene *gpsA* sobre o cromossoma de *B. amyloliquefaciens* foi realizada através de um vetor de deleção. O procedimento é baseado na descrição de Vehmaanperä e outros (1991). O plasmídeo PE194, o qual foi descrito na mesma publicação, foi selecionado como um vetor para a deleção de *gpsA*. É a vantagem desse vetor que ele não tem origem de replicação temperatura-dependente. A 28°C, o pE194 pode se reproduzir na célula, de modo que, nessa temperatura, ele pode primeiro ser selecionado para uma transformação com sucesso. Subsequentemente, as células que contêm o vetor são incubadas a 46°C. Nessa temperatura, o vetor não se reproduz mais e uma pressão de seleção é exercida sobre a integração do plasmídeo sobre uma das duas regiões homólogas (a montante e a jusante do *pgsA*) no cromossoma. Uma outra recombinação homóloga sobre a outra região homóloga (segunda), então, leva à deleção do *gpsA*. Uma outra recombinação da primeira região homóloga também seria possível. Aqui, o vetor se recombina do cromossoma novamente, de modo que o gene *gpsA* cromossômico seria mantido.

[083] A eliminação do gene *pgsA* do genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* RH 1330 compreende as seguintes etapas:

Etapa 1: Construção do vetor de deleção

Isolamento das regiões de flaqueamento de *gpsA* de *Bacillus amyloliquefaciens*

[084] O DNA cromossômico de *B. amyloliquefaciens* RH 1330 foi preparado de acordo com uma especificação por Sachse (em: Bertram e Gassen, 1991, Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 99-100).

[085] As regiões de flaqueamento de *pgsA* de *B. amyloliquefaciens* RH 1330 foram amplificadas sobre o DNA cromossômico através de PCR. Uma vez que as sequências dessas regiões de *B. amyloliquefaciens* não estavam disponíveis, diferentes iniciadores foram derivados da sequência conhecida da região *yphC-gpsA-yphE-yphF* de *B. subtilis* (banco de dados SubtiList (Moszer e outros, 1995; 1998), estado: 18/02/2002). Os iniciadores foram colocados em regiões de não-codificação (em *B. subtilis*) para evitar a introdução de mutações nos genes dentro das regiões de flaqueamento do gene *gpsA*. Em virtude da identidade de sequência particularmente baixa entre *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* nessas regiões de não codificação, a amplificação das regiões de flaqueamento do gene *gpsA* através de PCR provou ser difícil e teve de ser realizada sob condições muito suaves (baixa temperatura de anelamento, alta concentração de modelo).

[086] Os seguintes iniciadores foram usados para a amplificação por PCR da região localizada a montante do gene *gpsA*:

SEQ ID Nº 8 ALF.Xba.fw aatgaaagcgtctagattgaaagg

SEQ ID Nº 9: ALF.Kpn.bw catgtttgattggtacctttttatttc

[087] O produto de PCR (ALF, 1,4 kbp) foi inserido no plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O plasmídeo resultante foi denominado pCC1.

[088] Os seguintes iniciadores foram usados para a amplificação por PCR das regiões localizadas a jusante do gene *pgsA*:

SEQ ID N° 10: ARF.Kpn.fw

aagcgaaggtacccctctttg

SEQ ID N° 11: ARF. Xba.bw

cctatttgaatatgacatctctagaaaatttc

[089] O produto de PCR (ARF, 1,2 kbp) foi inserido no plasmídeo pCR®2.1-TOPO®. O produto resultante foi denominado pCC2.

Incorporação das regiões de flaqueamento de *gpsA* de *Bacillus amyloliquefaciens* no vetor pE194

[090] A região ALF foi isolada do plasmídeo pCC1 cortado com *Kpn I* e inserida no plasmídeo pCC2 cortado com a mesma enzima de restrição. As regiões de flaqueamento do *gpsA* estão presentes "cabeça-para-cauda" no plasmídeo pCC3 resultante.

[091] As regiões de flaqueamento do *gpsA* foram isoladas do plasmídeo pCC3 através de restrição com *Pst I* e *Sac I* e construídas no vetor pE194 cortado com as mesmas enzimas de restrição. O plasmídeo de replicação temperatura-dependente pCC10 é um vetor de deleção. Ele foi confirmado através de análise de restrição e sequenciamento.

Etapas 2: Transformação de *B. amyloliquefaciens* com o vetor de deleção e deleção do gene *gpsA* no cromossoma

[092] *C. amyloliquefaciens* RH 1330 foi transformado pelo vetor de deleção através de protoplastos de acordo com o método descrito por Chang e Cohen (1979, Mol. Gen. Genet. 168, 111-115).

[093] Consequentemente, a deleção do gene *gpsA* foi realizada de acordo com o método descrito por Vehmaanperä e outros (1991). O vetor de deleção foi primeiro integrado no cromossoma sob pressão por antibiótico e pressão por temperatura através de recombinação homóloga de uma das regiões de flaqueamento do gene *gpsA*. Subsequentemente, as células sem pressão de seleção foram crescidas através de eritromicina, o que permitiu uma segunda recombinação entre as duas cópias da segunda região homóloga e levou à excisão do vetor de deleção trazendo o *gpsA*. O gene *gpsA*

cromossomicamente codificado foi completamente removido do genoma de *Bacillus* dessa forma.

[094] Finalmente, as células nas quais os eventos de recombinação desejados ocorreram foram isoladas examinando as células com relação à sua sensibilidade à eritromicina e sua auxotrofia para glicerina através de crescimento sobre respectivas lâminas de ágar.

[095] A cepa isolada de *B. amyloliquefaciens* RH 1330 Δ (*gpsA*) foi denominada RH 1626. A ausência do gene *gpsA* e a conservação das regiões de flaqueamento no cromossoma desse cepa, bem como a ausência de genes de resistência a antibiótico e outras sequências do pE194, foram confirmadas através de sequenciamento e Southern blot.

Exemplo 3: Construção do sistema de expressão recombinante

[096] A construção do sistema de expressão recombinante compreendeu as seguintes etapas:

Etapas 1: Inserção do gene *gpsA* no derivado pUB110 através de xilanase de *B. amyloliquefaciens*

[097] O gene *gpsA* foi amplificado através de seu próprio sítio de ligação ribossômica (RBS) e seu próprio terminador de transcrição, começando a partir de DNA cromossômico de *B. amyloliquefaciens*. Os seguintes iniciadores foram usados para essa finalidade:

SEQ ID Nº 12: ABa Ale fw cgaatccggcagcgttggtgatttg

SEQ ID Nº 13: ABa Sph bw ccgtcccatcattgcatgcgttatatttc

[098] Os iniciadores foram construídos de modo que, a montante do RBS, um sítio de clivagem Ale I e, a jusante do terminador, um sítio Sph I, fossem inseridos no produto de PCR. Subsequentemente, o fragmento de PCR obtido pôde ser clonado, através desses sítios de clivagem inseridos, no vetor de expressão de xilanase pIK91 (EP0585617) por trás do promotor descrito por Zyprian e Matzura (1986) para pUB110. O vetor pIK91, um derivado de pUB110

(McKenzie e outros, 1986, Plasmid 15, 93-103; McKenzie e outros, 1987, Plasmid 17, 83-85), compreende o gene para a endo- β -1,4-xalanase (*xyl*) de *Bacillus subtilis*, re-classificado como *Bacillus amyloliquefaciens*. O plasmídeo pTP01 (representado na Figura 4) resultante da clonagem tem um tamanho de 7267 bp e não apenas traz os genes *gpsA* e *xyl*, mas também um gene de resistência à canamicina e um gene de resistência à bleomicina. A sequência do plasmídeo pTP01 resultante foi confirmada através de análise de restrição e sequenciamento. Uma cepa de *Bacillus subtilis* (1A 247, BGSC; genótipo: *sacU(H)*, *rpsL*) foi transformada através do pTP01, pelo que células competentes (Bertram e Gassen, 1991, Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York) foram usadas para transformação. A cepa resultante foi denominada RH 1632.

[099] A expressão de desidrogenase de glicerina-3-fosfato ativa na cepa de *Bacillus* trazendo pTP01 RH 1632 pôde ser verificada (contrário aos relatos anteriores na literatura através de um teste de atividade enzimática descrito por Morbidoni e outros (1995) e Bergmeyer (1970). Nesse teste de atividade, a alteração da concentração de NADH durante a conversão NADH-acoplada de di-hidroxiacetona fosfato em sn-glicerina-3-fosfato catalisada pela desidrogenase de glicerina-3-fosfato é fotometricamente monitorada. A diminuição na extinção a 340 nm é proporcional à diminuição na concentração do substrato. A cepa de *Bacillus* RH 1632 foi aqui crescida em um frasco de agitação sobre meio de caldo LB (peptona a 1%, extrato de levedo a 0,5%, NaCl a 1%, água corrente, ajuste do valor de pH para um pH de 7,2 antes da esterilização), as células foram coletadas através de centrifugação e solubilizadas por lisozima. O lisato de células foi usado para o teste de atividade de desidrogenase de glicerina-3-fosfato. Usando uma desidrogenase de

glicerina-3-fosfato análoga de músculo de coelho como padrão, pôde ser mostrado que a cepa de *Bacillus* trazendo plasmídeo RH 1632 tem uma atividade que está em torno de unidades g^{-1} de massa celular umida maior comparado com *B. subtilis* 1A 247. Assim, o gene episomicamente codificado *gpsA* é também expresso no transformante adicional ao gene *gpsA* cromossomicamente codificado.

[0100] Para revisar a complementação da cepa de *B. amyloliquefaciens* GpsA⁻ auxotrófica RH 1626 (Exemplo 2) através de pTP01, a cepa RH 1626 foi transformada com o plasmídeo pTP01 através de protoplastos (correspondendo a Chang e Cohen, 1979). A seleção dos transformantes foi realizada através de seleção com antibiótico sobre lâminas de ágar TYE, suplementadas com xilano e canamicina (peptona a 1%, extrato de levedo a 0,5%, NaCl a 0,8%, xilano a 1%, 10 g/l de canamicina). A complementação da cepa de *B. amyloliquefaciens* auxotrófica através de pTP01 foi verificada através do cultivo sobre meio mínimo (sal Spizizen (Anagnostopoulos e Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81/5), 741-746) com glicose a 0,7% e glutamina a 0,4%, água purificada pelo Millipore Water System, valor de pH em um pH de 7,2 antes da esterilização) sem a adição de glicerina ou G3P.

Etapas 2: Deleção dos genes marcadores de antibiótico

[0101] Os genes de resistência a antibiótico *kan* e *ble* foram removidos do plasmídeo pTP01 (Exemplo 3, etapa 1) através de amplificação do plasmídeo completo sem genes *kan* e *ble* através de PCR. Iniciadores que inseriram um sítio de clivagem Sac II no produto de PCR em cada extremidade do produto de PCR foram usados para essa finalidade:

SEQ ID Nº 14: pT ble kan Sac fw gctaaaatctattattccgcggttcagcaatcgg

SEQ ID Nº 15: pT kan ble Sac bw gtccattcactatccgcggtcccttttcag

[0102] O produto de PCR foi cortado com Sac II e o produto de restrição foi religado. Protoplastos da cepa BGSC 61106 de *B. subtilis* (*gol* (= *gpsA*) *metC* *trpC2*. Morbidoni e outros, 1995) foram transformados através do produto de ligação. A cepa BGSC 61106 atuou como um hospedeiro intermediário. Uma transformação direta do produto de ligação na cepa transformante de *B. amyloliquefaciens* GpsA⁻ auxotrófica RH 1626 (Exemplo 2) não foi possível. A seleção dos transformantes de *Bacillus* foi realizada sobre lâminas de ágar consistindo em sal Spizizen, glicose a 0,7% e glutamina a 0,2%. O plasmídeo de 5864 bp resultante foi confirmado através de mapeamento e sequenciamento e foi denominado pTP15 (Fig. 7).

Etapas 3: Preparação de um sistema de expressão recombinante

[0103] O isolamento do plasmídeo pTP15 de *B. subtilis* BGSC 61106 foi realizado através do QIAGEN Plasmid MiniprepKit. A cepa de *B. amyloliquefaciens* RH 1626 (Δ *gpsA*; Exemplo 2) foi transformada, através de protoplastos, através do plasmídeo pTP15. O sistema de vetor/hospedeiro resultante, o qual é sem a presença de genes de resistência a antibiótico e sem antibióticos no meio de cultura, foi registrado sob o número RH 1810 na coleção de cepas AB Enzymes. A complementação da cepa de *B. amyloliquefaciens* auxotrófica pelo pTP15 foi verificada através de cultivo sobre meio mínimo (sal Spizizen com glicose a 0,7% e glutamina a 0,4%, água purificada pelo Millipore Water System, valor de pH em um pH de 7,2 antes de esterilização). RH 1810 cresce sobre meio mínimo em oposição à RH 1626. A ausência do gene *gpsA* sobre o DNA cromossômico de RH 1810 foi verificada através de PCR através do uso de iniciadores, as sequências dos quais são derivadas das regiões de flanqueamento do gene *gpsA*. Os seguintes iniciadores foram usados para a verificação:

SEQ ID N° 16: A_313

gaaggtgtgacgtctgcggatgaa

SEQ ID Nº 4: AR_180C

taatcccatagcaccaagcgcaaaccac

[0104] Para examinar a expressão do gene *xyI* de RH 1810, a atividade de xilanase foi determinada no sobrenadante de cultura. A cepa de *Bacillus* no frasco de agitação foi crescida sobre diferentes meios em dois estágios. Na primeira etapa, o crescimento foi realizado sob pressão de seleção sobre meio mínimo (sal Spizizen com glicose a 0,7% e glutamina a 0,4%, água purificada pelo Millipore Water System, valor de pH em um pH de 7,2 antes da esterilização). Na segunda etapa, o meio complexo foi inoculado com 5% da primeira cultura. O meio correspondia à seguinte composição: Glucidex 12 a 9%, pó de sabugo de milho a 2%, (NH₄)₂HPO₄ a 1,32%, MgSO₄ * 7 H₂O a 0,05%, CaCO₃ a 0,5%, água corrente, ajuste do valor de pH para um pH de 8,0 antes da esterilização. Os sobrenadantes de cultura obtidos após 48 horas de incubação foram usados para determinar a atividade de xilanase de acordo com o método abaixo.

[0105] Os fragmentos de xilano liberados pela clivagem enzimática de xilano foram fotometricamente determinados a 412 nm. 1 unidade se refere à quantidade de enzimas que libera o equivalente de 1 µmol de xilose através de clivagem de xilano dentro de um minuto a 30 °C sob condições-padrão. As diluições de enzima são preparadas com solução tampão de acetato de sódio a 0,04 M, pH de 4,5. O lote de reação para o valor principal consiste em 0,75 mL de uma solução de xilano de spelt de aveia a 0,5% em tampão de acetato de sódio a 0,04 M, pH de 4,5 e 0,25 mL de solução enzimática diluída correspondentemente. Com relação ao valor de placebo, 4 mL de uma solução de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico a 0,5% (PAHBAH, company Janssen Chimica), Titriplex III a 0,465% (EDTA, companhia Merck) foram adicionados a NaOH a 0,5 M antes da adição da solução enzimática para cessar a reação.

[0106] Após a incubação de 20 min a 30°C, a reação enzimática no valor principal é cessada através da adição de 4 mL da mesma solução

conforme para o valor de placebo e o desenvolvimento da cor é obtido através de incubação a 75°C durante 30 min. A avaliação é conduzida através de calibração com uma curva de calibração na qual xilose é usada como padrão.

[0107] Com relação à determinação dupla das atividades de xilanase dos sobrenadantes de cultura de RH 1810, as atividades de 153,4 XylH g⁻¹ e 151,1 XylH g⁻¹ foram medidas. Assim, a produção de xilanase isenta de gene de resistência a antibiótico mostrou, no frasco de agitação, uma maior produtividade do que a produção com RH 6000 na qual canamicina foi usada como pressão de seleção. Em comparação, a cepa de *Bacillus* recombinante RH 6000 (RH 1330::pIK91) obteve, no frasco de agitação, uma atividade de xilanase de apenas 57,8 XylH g⁻¹ (EP 0585617 B1).

Exemplo 4: Determinação da estabilidade do sistema

[0108] Para determinar a estabilidade genética do plasmídeo trazendo *gpsA-xyl* nas células de *B. amyloliquefaciens* GpsA⁻, a cepa RH 1810 obtida de acordo com o Exemplo 3 foi examinada em um experimento com frasco de agitação sem pressão de seleção em meio líquido. Uma precultura de RH 1810 foi crescida sob pressão de seleção para essa finalidade, isto é, um meio no qual o *B. amyloliquefaciens* auxotrófico não pode crescer e no qual nem glicerina nem G3P nem edutos de glicerina ou G3P são acessíveis para a cepa de *Bacillus* foi usado. O crescimento foi realizado em um frasco de agitação de Erlenmeyer de 150 mL com 20 mL de meio a cada vez. O meio da precultura consistia na seguinte composição: sal Spizizen + Glucidex 12 a 7% – hidrolisato de caseína a 2% (valor de pH em um pH de 7,2). A primeira precultura foi incubada durante 16 h e, a partir da mesma, a segunda precultura foi inoculada com a mesma composição de meio. Após 8 horas de incubação, a cultura principal foi inoculada a partir da mesma. O crescimento sem pressão de seleção foi realizado em um frasco de agitação de Erlenmeyer de 1 l com 150 mL de meio com

composição, cada: Glucidex 12 a 9%, pó de sabugo de milho a 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a 1,32%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,05%, CaCO_3 a 0,5%, água corrente, ajuste do pH para um valor de pH = 8,0 antes da esterilização. Nesse meio, um crescimento da cepa de *Bacillus GpsA⁻* sem o plasmídeo de complementação pTP15 (Exemplo 3: etapa 2) é possível. Após 8 a 16 horas, a cultura foi, cada uma, superinoculada a 5% em dois frascos de Erlenmeyer com meio fresco, pelo que um frasco foi usado para a superinoculação do frasco seguinte e, no outro dos frascos, a atividade de xilanase do sobrenadante de cultura foi determinada após 24 horas de incubação. Ele foi cultivado durante cinco dias e noites; as culturas principais foram, desse modo, superinoculadas quatro vezes. Após cada término de cultura, o número total de células por mL de meio foi determinado como sendo capaz de controlar a estabilidade do plasmídeo pTP15 em RH 1810. O resultado é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Estabilidade de plasmídeo nos transformantes trazendo pTP15 de células de *B. amyloliquefaciens GpsA⁻* RH 1626, verificada com base na atividade de xilanase pelo número de geração

RH 1810: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> $\Delta(\text{gpsA})::\text{pTP15}$			
Duração acumulada de cultivo da cultura principal [h]	Número de superinoculação da cultura principal	Número de geração	Atividade relativa de xilanase [%]
24	1	8	100
40	2	12	96
48	3	16	97
64	4	21	111
72	5	25	111

[0109] Conforme mostrado no resultado da Tabela 2, a atividade de xilanase sem pressão de seleção permanece estável durante o período de 5-vezes de uma fermentação normal. Isso se torna evidente pela atividade relativa de xilanase para a primeira cultura sem pressão de seleção permanecendo constante e mesmo ligeiramente

aumentando um pouco.

Exemplo 5: Produção de xilanase através de fermentação em um bioreator com o sistema recombinante

a) Precultura

[0110] A cepa RH 1810 foi crescida sobre lâminas de seleção (sal Spizizen com glicose a 0,7%, glutamina a 0,4% ágar a 1%, água purificada através do Millipore Water System, valor de pH a 7,2 antes de esterilização). A incubação foi realizada a 37°C durante pelo menos 32 h.

[0111] 1ª precultura: um frasco de Erlenmeyer de 1 l com defletores com 150 mL de meio foi inoculado com RH 1810 da lâmina de ágar. A solução nutriente tinha a seguinte composição:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	14 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	6 g L ⁻¹
Citrato de Na ₃ x 2 H ₂ O	1 g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g L ⁻¹
Glucidex 12	70 g L ⁻¹
Hidrolisato de caseína	20 g L ⁻¹
pH de 7,2; esterilização 30 min 121°C	

[0112] A cultura foi incubada durante 16 horas a 37 °C enquanto se agitava (150 rpm).

[0113] 2ª precultura: frascos de Erlenmeyer de 1 l com defletores foram enchidos com 150 mL da mesma composição e inoculados com 5% da primeira precultura. O cultivo foi realizado a 37°C durante 8 horas.

b) Bioreator

[0114] Cultura principal: 20 l de uma solução nutriente de:

Glucidex 12	90 g L ⁻¹
Pó de sabugo de milho	20 g L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
CaCO ₃	5 g L ⁻¹

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	13,2 g L ⁻¹
pH = 7,2; esterilização 30 min 121°C	

[0115] O bioreator é inoculado com 5% da 2ª precultura. Condições de cultura: 37 °C, ventilação de 0,5 vvm, agitação com 450 rpm, 48 horas. O caldo de cultura foi clarificado através de centrifugação e usado para a determinação de atividade de xilanase. No sobrenadante de cultura, uma atividade de xilanase de 166 XylH g⁻¹ foi medida.

c) Experimento de assadura

[0116] Uma massa foi preparada a partir de 100 partes em peso de farinha de aveia, 2 partes em peso de sal, 3 partes em peso de levedo de padaria, 58 a 60 partes em peso de água e 40 a 50 ppm (baseado no peso da massa) de ácido ascórbico em uma batedeira de massa (fabricada pela Diosna) durante 2 a 3 min no nível 1 e durante 3 a 4 min no maior nível, 11. Antes de início do processo de amassamento, as respectivas quantidades de enzimas foram adicionadas à água. A temperatura da massa era de 25 °C-28 °C. Após um repouso da massa de 10 min, a massa foi dividida em pedaços de massa de 350 g para produzir pão branco Alemão ("*freigeschobenes Weißbrot*"). Após mais um repouso da massa de 20 min, os pedaços de 350 g foram moldados, refinados durante 70 min a 32 °C e umidade relativa de 80% e assados durante 32 min a 230 °C.

[0117] Após eles terem esfriado, o volume dos pães foi medido por meio de um instrumento TexVol BVM-L370 através de exploração a laser. O valor médio para todas os quatro pães a partir de um pedaço de massa é considerado na avaliação.

Resultado dos experimentos de assadura

[0118] O sobrenadante de cultura de uma fermentação de RH 1810, a qual é realizada de acordo com as condições descritas nos Exemplos 5a) e b), foi usado para os experimentos de assadura. Pães

que foram assados de acordo com o procedimento explicado com a enzima produzida de acordo com a invenção mostraram as seguintes propriedades:

Tabela 3: Série de concentração com a xilanase assadura-ativa de RH 1810 produzida de acordo com a invenção comparado à xilanase produzida pela cepa de *Bacillus* recombinante RH 6000 (EP 0585617 B1)

[0119] O volume dos pães às quais a xilanase assadura-ativa de RH 6000 foi adicionada é de 100%.

dosagem UXyl por 100 kg de farinha	volume [%]
1800	101
3600	102
5400	99

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de expressão para produção de um ou mais polipeptídeo(s)-alvo, caracterizado pelo fato de que compreende uma célula hospedeira derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* em cujo genoma a sequência de DNA endógeno, que codifica glicerina-3-fosfato desidrogenase é extensa ou completamente deletada, sendo que a deleção provoca a inativação da glicerina-3-fosfato desidrogenase, e a qual foi transformada por um elemento extracromossômico que compreende uma sequência de DNA que codifica o(s) polipeptídeo(s)-alvo e glicerina-3-fosfato desidrogenase, ambos o genoma da célula hospedeira, e o elemento extracromossômico, são ausentes de um gene de resistência a antibiótico.

2. Sistema de expressão, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o elemento extracromossômico é um plasmídeo, um fago, fagemídeo ou um transposon.

3. Sistema de expressão, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o elemento extracromossômico compreende uma sequência de DNA que corresponde à sequência de DNA que codifica a glicerina-3-fosfato desidrogenase endógena da célula hospedeira, uma sequência de DNA que codifica uma glicerina-3-fosfato desidrogenase relacionada ou uma glicerina-3-fosfato desidrogenase exógena.

4. Sistema de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a sequência de DNA que codifica glicerina-3-fosfato desidrogenase está sob o controle de um promotor fraco.

5. Sistema de expressão, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o promotor fraco é o promotor ptsH de *B. subtilis*.

6. Sistema de expressão, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a sequência de DNA que codifica a glicerina-3-fosfato desidrogenase endógena é deletada e sem mutação ou deslocamento de quadro nas regiões adjacentes.

7. Sistema de expressão, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*, é *Bacillus amyloliquefaciens* RH 1626, depositado sob o número de acesso DSM 18878.

8. Sistema de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o peptídeo-alvo é selecionado dentre enzimas hidrolíticas, enzimas de degradação de pectina, enzimas proteolíticas ou enzimas lipolíticas.

9. Sistema de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a sequência de DNA que codifica glicerina-3-fosfato desidrogenase é selecionada dentre:

(a) uma sequência de nucleotídeo de acordo com SEQ ID NO: 1;

(b) uma sequência de DNA, de acordo com SEQ ID NO: 1 ou sequências de nucleotídeos degeneradas das mesmas, que codificam uma sequência de proteína de acordo com SEQ ID NO: 2; ou

(c) fitas complementares às sequências (a) e (b).

10. Método para produção de um polipeptídeo-alvo livre de antibióticos, caracterizado pelo fato de que um sistema de expressão, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, é cultivado sob condições para a expressão do polipeptídeo-alvo e, assim, o polipeptídeo-alvo expresso é isolado.

11. Uso de um sistema de expressão, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que é para produção de um polipeptídeo-alvo livre de antibióticos.

FIG. 1

```

1  aaggggtacta tgggtaaacc tgtcgtagcc attgtcggaa gaccgaatgt
51  gggaaaatcc acaatcttta accggtattgc gggtgaaaga atttcaatag
101 tagaagatac ccccgagtg acgcgggacc ggatatacag ttcggcggaa
151 tggctgaatt atgattttaa cctgattgat acgggcggaa ttgatatcgg
201 agacgagccg tttctgacac agatccgcca gcaggctgaa atcgccatgg
251 acgaggctga tgtgatcatc tttatggtga acggccgcga aggtgtgacg
301 tctgcggatg aagaagtggc aaaaatactg taccggacga aaaaaccggt
351 cgtattagcc gttaataaat tagataatac cgaaatgaga gcgaacattt
401 atgactttta tgcgctcggc tttggagaac cgtatccgat ttcggggaca
451 cacggtttag gattgggaga tttgctcgat gcttgtgccc agcattttta
501 aaacattccg gagacgaagt acagtgatga tgtcgttcaa ttctgcctga
551 tcggccgccc gaatgtcggg aaatcatccc ttgtcaatgc gatgctcggc
601 gaagagcggg ttatcgtgag caacgtagcc ggaacgacta gagacgctgt
651 ggatacggcg ttcacttaca atcagcagga atttgtaatc gttgacacgg
701 cgggaatgag aaaaaagggt aaagtatatg aaacaacaga aaaatacagt
751 gtgctgcggg cgttaaaagc cattgaccgc tcagacgtcg tcggcgttgt
801 gctgaatgca gaagaaggca tccttgagca ggacaagcgg atcgccggat
851 acgcccatag agccgggaaa gccgtcgtca ttatcgtaaa caaatgggat
901 gccgttgata aggacgagcg cacgatgaaa gaatttgaac agaattattcg
951 ggagcatttc caatttctcg attatgcgcc ggtgctgttt atgtcggcac
1001 tgacgacaaa gcggattcat acactcatgc ctgcgattat taaagcgagt
1051 gaaaaccact ctctccgcgt gcagacaaat atcttaaatg atgtcatcat
1101 ggatgcggtc gccatgaatc cgactccgac gcacaacggc tcccgtctga
1151 aaatttatta tgcgactcaa gtcgctgtta agccgccgag cttcgttgtt
1201 tttgtcaacg atccggaact gatgcatttt tcttatgaac gctttttaga
1251 aaaccgaatc cgggacgctt tcggatttga aggtacgcca attaaaatat
1301 ttgcaagagc aagaaaataa aaaggtgtga tacagagatg aaaaaagtgg
1351 caatgcttgg agcgggaagc tggggcactg cactttcttt agtgctggct
1401 gataacggac atcaagtcat gatgtgggga caccgtgccg aattgatcga
1451 tcaaatcaac gaactgcatg aaaacaaaga ttacctgccg ggtgtggagc
1501 tatcaagttc tatcatcggg acagccgatt taagcgaggc tttaaaagga
1551 gctgacttca tcattgtggc agtaccgaca aaagccattc gggaagtgct
1601 gaaaaaggct ctgccgtaca tcccgaaca atcgattttt gttcatgtca
1651 gcaaggggat tgagccggat tcgcttctcc gcatttcaga attaatggag
1701 gaggagctgc ctgaggagta cagaaaagac atcgctcgtgc tttcagggcc
1751 gagccacgct gaggaagtcg gattaagaca cccgacgact gttacatcat
1801 cttcaaaaaa tatcaaggct gcagaagcgg ttcaggattt attcatgaac
1851 cagcatttcc gcgtctatac aaatcccgat atgacgggtg ttgaaatagg
1901 ggagagcgtta aaaaatatca tcgctcttgc agcggggatt acagacggat
1951 tgggatacgg agataatgca aaagcggcct taatcacccg aggtcttgc
2001 gaaatcggca gactcggcac aaagatgggc ggaaatccgc tcaccttttc
2051 cggcctgacc ggcgtaggcg atttaatcgt gacgtgtaca agcgttcatt
2101 cccgaaactg gcgcgccggc aacctgctcg gcaaaggata taagctggaa
2151 gctgtccttg ataagatggg gatggttgtt gaaggcgtgc ggacgacgaa
2201 agctgcgtat cagctgtctc aaaaatatca ggtgaaaatg ccgatcacag

```

FIG. 1 (Continuação)

```

2251 aagcgcttca ccaagtatta tttaatgggc agaaggtaga aactgccgta
2301 gaatccttaa tggccagagt gaaaacccat gagatggaag acttggtcaa
2351 cacattcgaa aaccgggtga agtga caata acatgccgtc agcatattct
2401 gaagtgcga aagtacaaaa cgcagaactc tccggctgaa atcgcttaaa
2451 acatttgctg atttaggcag aagaggatgc agacgtacgc atctacgcat
2501 actatagcat cgaagtccaa gagagtgtat ctacagcgta cagggtgaata
2551 tagtcaactt gactgaagca aagtccccct ctttgcttca gtttttttgt
2601 tttttcaata gatggaaaac ctgttgatct tttcaacatt tgtatattaa
2651 aatgaaatat aacgcttaca atgatgggac ggggggcacg aacgtgagtg
2701 tggcattgat gaaaatgtgg tttgcgcttg gtgctatggg attaatgttt
2751 gttgcggtcg cctctattta tgtcagcagg tacaaagtga aaaacaaact
2801 gataaaagca gcggtttctt cactcgctta tgcctgcatg gtcattctcg
2851 gattgatcgt gttaatggtc gttttcagcg ggcctgtcaa tgaataaagc
2901 caaaaggggg cgcggaatgc ataagttaaa aatggccgtc ataacggcaa
2951 tggcgggtgct tctgctgtcg ggctgtctgt accctgaagc aaaaaaaact
3001 gaaaataaag tatcttacia acatcagctt cagcaggtgc aagcggcagt
3051 ggatgaattt aaaaaggcga acggcggact tctgccgatt cagacaaaag
3101 atatgaaaac accgctctat caaaaatata cgatagattt taagcggctc
3151 gcgcccagat acatcgagga gccgcgggcc tcagcttatg aaagcggagg
3201 aatgtaccaa tacgtgcttg tcgatgtgga aaataagccg accgtcaagc
3251 tggtcgatct ccaaatggcg gaagcaatcc gcgacatgaa gctgcgtgtc
3301 aaaatgtatc aggaaaagca tacatatcct ccctatgagg acgctgtttc
3351 aaaagggctg ttcactttaa ataaaaaaaaa gctcggcatg aaagactctc
3401 cttcagtcaa aagtccggtt tcaggcacgt ctctgccgct tttaatcggc
3451 gctgacggag aaatctatgc cgactatcgc gtcgatctcg cccgctgcct
3501 gaaggaaaac aaaaagaaaa tcaaaccggg ggcggaaatt caggatatatt
3551 tatggaaaga gactcctttc gtcccggcct tttcagtcac atacaccgta
3601 aatgaaaaac aggaaccogt ttttttagaa agtcaaacga aacaggaatg
3651 aacccttttc ccgcgcatac aaataggagg aaaggttttt ttgattttga
3701 tagaaaagac tgcct

```

Fig. 2

1 MKKVAMLGAG SWGTALSLVL ADNGHQVMMW GHRAELIDQI
41 NELHENKDYL PGVELSSSII GTADLSEALK GADFIIVAVP
81 TKAIREV LKK ALPYIPKQSI FVHVSKGIEP DSLLRISELM
121 EEELPEEYRK DIVVLSGPSH AEEVGLRHPT TVTSSSKNIK
161 AAEAVQDLFM NQHFRVYTNP DMIGVEIGGA LKNIIALAAG
201 ITDGLGYGDN AKAALITRGL AEIARLGTKM GGNPLTFSGL
241 TGVGDLIVTC TSVHSRNRWA GNLLGKGYKL EAVLDKMG MV
281 VEGVRTTKAA YQLSQKYQVK MPITEALHQV LFNGQKVETA
321 VESLMARVKT HEMEDLVNTF ENRVK

100

	10	20	30	40	50	60	70	80
B. amylooliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	aagggtactatgggtaaacctgtcgtagccatttgtcggaagacgcgaatgtggaaaaatcccacaatcttttaaccggattgc							
B. lichenif.	a.....a.t.....a.t.....c.....g..g.....g.....a....c..							
	90	100	110	120	130	140	150	160
B. amylooliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gggtgaagaatttcaatatagtagaaatacccccgagtgaocgcggaacggatatacacagtttcggcggaatggctgaatt							
B. lichenif.	...a.....t.C.....aa...t.....C....t.....c.t.c.g.....c							
	170	180	190	200	210	220	230	240
B. amylooliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	atgatattaacctgattgatacggggcggaatttgatatcggagacgagccgtttctgacacagatccgccagcaggctgaa							
B. lichenif.	tt.....t.....t.t.....t.ag.g....t.....a.....c.c.c.c.....a.....c.a.g....t.g.g....t.....c.g							
	250	260	270	280	290	300	310	320
B. amylooliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	atgcccatggacgaggctgatgtgatcatcttttatggtgaacggccgcgaagggtgtgacgtctgcggatgaagaagtggc							
B. lichenif.	t.a.g.c....t.t.....t.....c.....ag....t.....t.....a.a.a.....t.t.c...ac.....c.c.ag.c.t.....t.....							

Fig. 3 (Continuação 1)

	330	340	350	360	370	380	390	400
B. amyloliq.	aaaaatactgtaccggaacgaaacccggtcgtattagccggttaataaattagataataaccgaaatgagagcgaacattt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	g.....tt.....C.a.....g..t..t..t.....g.....C.g.....C.a.....t....							
B. lichenif.	tt.a.....t.a.....C.....C.....tc.g.g.....g.....C.t.....a.....							
	410	420	430	440	450	460	470	480
B. amyloliq.	atgacttttatgcgctcggtttggagaacccgtatccgatttcggggacacacacggttttaggattgggagatttgcctgat	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	t.....t.....a.....C.g.....C.g.....a.....a.....ac.C...C...t.....a.g...							
B. lichenif.	.C.t.....C.....C.....C.g.....tc.....a.....g..t..cc.t..tc.c.c.....t..c							
	490	500	510	520	530	540	550	560
B. amyloliq.	gcttgtgccgagcatttttaaaacattccggagacgaagtacagtgatgatgtcgttcaattctgcctgatcgccgccc	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	..cgt...a.....t.....t.a.....a.....a.....a..a..ta.....t.....a..t..							
B. lichenif.	..ggtcag...a.....a.....a.....C.....tgag.....a.....t.....C.....g..							
	570	580	590	600	610	620	630	640
B. amyloliq.	gaatgtcggaaaatcatcccttgtcaatgcgatgctcgcggaagagcgggttatcgtgagcaacgtagccggaacgacta	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	a.....g.....g.....t.a.....g.....a.....a.....C.....t..C.....g..t.....a..							
B. lichenif.	C.....C.....a.....C.C..a.t..a.....C.....C.....C.....ta.t..g.....gc							
	650	660	670	680	690	700	710	720
B. amyloliq.	gagacgtgtggatacggcgttcacttacaaatcagcaggaaatttgttaatcgttgacacggcggaatgagaaaaagggt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	t.....t.....t.a..t.....C.....C.....g.....C..t..c..t..t..a..t..c.....a..g							
B. lichenif.	.C.....ca.t..C...ag...t..a.....aaga..C.....C.....g..t..a..C..g.....g							

Fig. 3 (Continuação 2)

	730	740	750	760	770	780	790	800
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	aaagtatatgaaacacagaaaaatacacagtgtgctgcggttaaaagccattgacccgtcagacgctcgctcggtgtgt							
B. lichenif.	C.....g.t.g.g.t.....a.....C.....C.....g.....g.....a.....g.cg.....							
	g.....gg.....t.....C.C.C.a.t.....g.g.C.....t.....a.....t.....C...							
	810	820	830	840	850	860	870	880
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gctgaatgcagaagaaggcatccttgagcaggacaagcggtatcgccgatacgcccatgaagccgggaaagccgctgtca							
B. lichenif.	g...gc.....ta.....a.....t.....t.....t.a.c.....g.c.g.....t.....							
	ct.g.c.gc.....ta.....t.....C.t.g.....a.....t.....t.....							
	890	900	910	920	930	940	950	960
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	ttatcgtaaacaaaatgggatgccgttgataaggacgagcgacgatgaaagaatttgaacagagaatattcgggagcatttc							
B. lichenif.	.cg.....t.....t.....C.a.t.....a.....g.....g.a.....C.t.....t.....							
	.cg.....t.....a..C.a.a.....g.....g.....g.a..gg..a.a..C..C..t							
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	daatttcgcgattatgcgcgggtgctgtttatgtcggaactgacgacaaaagggttcatacacactcatgcctgcgattat							
B. lichenif.	g.....aa.C.a.....t..Ct.a.....a.....C.....t.g.....g.....							
	t.g.c.c.....t..tt.....C..tt...t.a.....C.C.....g.g.....g.c...							
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	taaagcgagtgaaccactctctccgcgtgcagacaaaatactttaaatgatgtcatcatggtgcggtcgccatgaatc							
B. lichenif.	C.....t.....t..t.a..t.a..t.a.....cg.....C.....C.t..g..a.....							
	g.cg.....C.....t..ga.ga.g.....C.....tc.t.....a.....t.....g.t.....c...							

Fig. 3 (Continuação 3)

• **For all the questions**

Fig. 3 (Continuação 4)

	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	acagcgatttaagcgaggtttaaaggagctgacttcattgtggcagtagccgacaaagccattcggaagtgc							
B. lichenif.	..a.a...a.g.aa.....g.ttc..ac..a..tg...t..c..t..g..c.....a.....g.....tt.							
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gaaaaaggctctgcccgtacatcccgaacaatcgattttgttcattgtcagcaagggaattgagccgattcgtctctoc							
B. lichenif.	..g.c.....g.c..t..t..aa.....a.gg.ag.c.....t.....a.....a.....g..							
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gcatttcagaattaatggaggagctgcctgaggagtagacagaaaagacatcgtcgtgttcaggccgagccacgct							
B. lichenif.	t...a.t.....aatt.....c..gagt..tgt.....t.....t.....c.....c.....t..t..g							
	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	
B. subtilis	gaggaagtcggattaagacacccgacgactgtttacatcatcttcaaaaaatatcaagg---ctgcagaagcgggttcagga							
B. lichenif.	..a.....a..gc.gc.g.....c..a.....tg.....g.gc..g.g.....a.....a.....g.....							
	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	tttattcatgaaccagcatttccggtctatacaaatcccgatatgatcgtgtgtgaaataggggagcggttaaaaaata							
B. lichenif.	..c.....t..t..t..ca.....t..g..g..c.....t..c..t.....a.....c..a..g..t.....cg							

Fig. 3 (Continuação 5)

	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990
B. amylololiq.	tcatcgctcttgcagcggtgattacagacggattgggatacggagataatgcaaaagcggccttaataatcaccgaggtctt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	.t.t.C.....t.a.a.....t.t.a.g.....t.C.....t.t.g.t.a.C.a..							
B. lichenif.	.t.t.g.....C.....C.....t.....t.....g.....C.gC.g.t.aa.g.ct.g							
	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070
B. amylololiq.	gctgaatcgccagactcggcacaaagatggcggaatccgctcacctttccggcctgacggcggtaggcgatttaatt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	.C.....g.....a.g.a.....ct.g.g.C.t.at....a.a.....C.g..							
B. lichenif.	.a.....C.g.....a.....g.a.C.g.t.t.t.aa.C.g.C.g..							
	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150
B. amylololiq.	cgtgacgtgtacaagcgttcattcccgaaactggcgccggcaacctgctcggaaggatataagctggaagctgtcc	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	t.....C.....t.....a.....t.g.....tt.....a.....g.C.....t.a..t.							
B. lichenif.	.C.C.C.....C.....a.....t.....a.....t.ta...g.t....C.tC.....t.a..t.							
	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230
B. amylololiq.	tggataagatggggatggttgttgaggcgtgcggacgcagacgaagctgcgtatcagctgtctcaaaaataatcaggtgaaa	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	.t.ag.....a.....a.C.....C.C.....g.t.....t.ga.g.....g.t.t...							
B. lichenif.	ag.a.....C.C.g.g.C.C.....a.....C.t.....t.aa.g....t.g.t.a...							
	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
B. amylololiq.	atgccgatcacagaagcgttcaccaagtattatttaatgggcagaaggtagaaaactgccgtagaataatccttaatggccag	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	t.....t.C.t.g.cc....C.C.a.a.a.g.....C.t.t....t.....g..							
B. lichenif.	C.....a.g..a.....g..g.C.cg.a..a.t.g.g.a..C....a.g.....a..							

Fig. 3 (Continuação 6)

[illegible]

Fig. 3 (Continuação 7)

	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750
B. amyloliq.	* -gacgggggacgaacgtgagtg---	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	-t.tc....agg..C....C.t..aatc.....							
B. lichenif.	a..a..a....ttc..t....a..----c.gtc..t.a.....							
	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830
B. amyloliq.	* tgcggtgcgcctctatttatgtcagcaggtacaaagtga	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	g..t..a..t..c..c..t..a..c..c..t..t..gtgcc.....							
B. lichenif.	a.....gattg.C..a..ca.a.....a..t..t.....							
	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	
B. amyloliq.	* cctgcatggtcatctcgggattgatcgtgttaaatgg	*	*	*	*	*	*	
B. subtilis	tg..t..c....a..t..a..t..t.....tg.c.g.....							
B. lichenif.	a..t..c.....c....cg.....c..tt.t.....c.....							
	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	
B. amyloliq.	* gcgcggaatgcataaagttaaaaaatggccgtcataac	*	*	*	*	*	*	
B. subtilis	.t..t..t...gg...ac.g..gtgc..aa....tttt....							
B. lichenif.	.attcat...a.a.tcg....cg.tctgc..gct.tttt.t..							
	2990	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060
B. amyloliq.	* aagcaaaaaaactgaaaataaagtattcttacaacatc	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	.cgg.....gc.g..tgc..gccca.tc....tc.g.C....							
B. lichenif.	...a..g...gg.ga....c.gc.c.c.gc.tc.g.C....							

Fig. 3 (Continuação 8)

	3070	3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gcgaacggcggacttctg	ccgattcagacaaaagata	tataaaacaccgctctat	caaaaaatccgata	gttttaagcg			
B. lichenif.	.a..t..a..g..g..t..t..	.a..c.....tcg.....	a.....a.....c.....	g.....c.....	ca.....			
	cg..a..g.....	a.....gg.....	g.....	c.....	ca.....			
	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	gctcgcgccagatacat	cagaggagccgcgcctcag	cttatgaaagcggaggaat	gtaccaatacgtg	cttgcgatg			
B. lichenif.	.t.a.....a.....	.a..ct..a..t..aagta	.g..a..t.....g..	gac..t.....	t..c..			
	...gt.c....c.g..t..g.ct	g.a..t.c.....	a.....a.....c.....	ga.....	ttg.....			
	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	tggaaaaataagccgac	cgcgtcaagctggtgat	ctcaaatggcggaaagca	atccgcgacatga	agctgctgtcaaatg			
B. lichenif.	.a..g..cg.t.....t..t..	at.aa.t.....aa.g.....	a.....a.....aa.....	tg.....at.....	ca..c.....			
	a.....g.....	Ca.t..g.aa.....	t.....atg...a.g..	gt.a.....t..g...	g.....g.....			
	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	tatcaggaagcagcata	cataatcctccctatgag	gacgctgtttcaaaagg	gctgttcaactttaa	ataaaaaaagctcgg			
B. lichenif.	gtc.gg.....ca.....	g..t..ca....t.tgc.a..	tcgt.att.a..t..ac.cg..	g..g.....t...	t...			
	...a.a..tc....c.ag.....	g..g...a.aa.a.tc..a..c..	gaact.a....tgc.tg.cc	tg.....				
	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460
B. amyloliq.	*	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	catgaaagactctcctt	cagtcataaagtcgggtt	caggcacgtctctcgc	cttcttcaatggcg	cttgacggagaaatct			
B. lichenif.	ggatggcag.....t.a....	g.c...c..aa.c.....	g.at..ct.....a.g..	t.a..ga.....a..	a..			
	ac.....gg.g.....t....	cg.....c.....g.....	c.....c.cg...at.aaa	a..c..c..ta				

Fig. 3 (Continuação 9)

	3470	3480	3490	3500	3510	3520	3530	3540
B. amyloliq.	* atgccgactatcgcgtcgatctcgcgcgcctgaaggaaaaacaaacccggggcggaattcaggat	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	t..c..gact..g..g..ttct.....c..aa...g.....a.cgt.t....c..a.t.....c.....							
B. lichenif.	.a.tg..t..c..ga.g..t.g...aagctga.....a.gtcg.....a.cgg.a..g.....c.a.....g.c..a...							
	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3610	3620
B. amyloliq.	* attttatgaaagagactccttttcgtcccgcccttttcagtcacatacacccgtaaatgaaaaaacaggaaacccggttttttt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	..ga.t...c.t..a..c.c.t...t...c.g.....t..a.a...t..g.....c.....t.....t.....							
B. lichenif.	t.ga.g...g.....g.....t.....t.....g.....g.a.ag.....a.g.....c.....t.....t.....c...							
	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	
B. amyloliq.	* agaaa-----gtcaaac-----gaaacaggaatgaacctttttcccgcgcatatacaaataggagaaaggttttttt	*	*	*	*	*	*	*
B. subtilis	a.g.t.t-----a.....a.....c.....tt.....c.....t.....c.....							
B. lichenif.	c...tagaatatcg.....atgcaa.t.t...tc.....c.....c...tcg.....-...ga.....c.....c							
	3700	3710						
B. amyloliq.	* gattttgatagaaa-agactgcct	*						
B. subtilis	---a.a.....ttg..ga..a--							
B. lichenif.	atg.a..ccga....att.c...							

Fig. 4

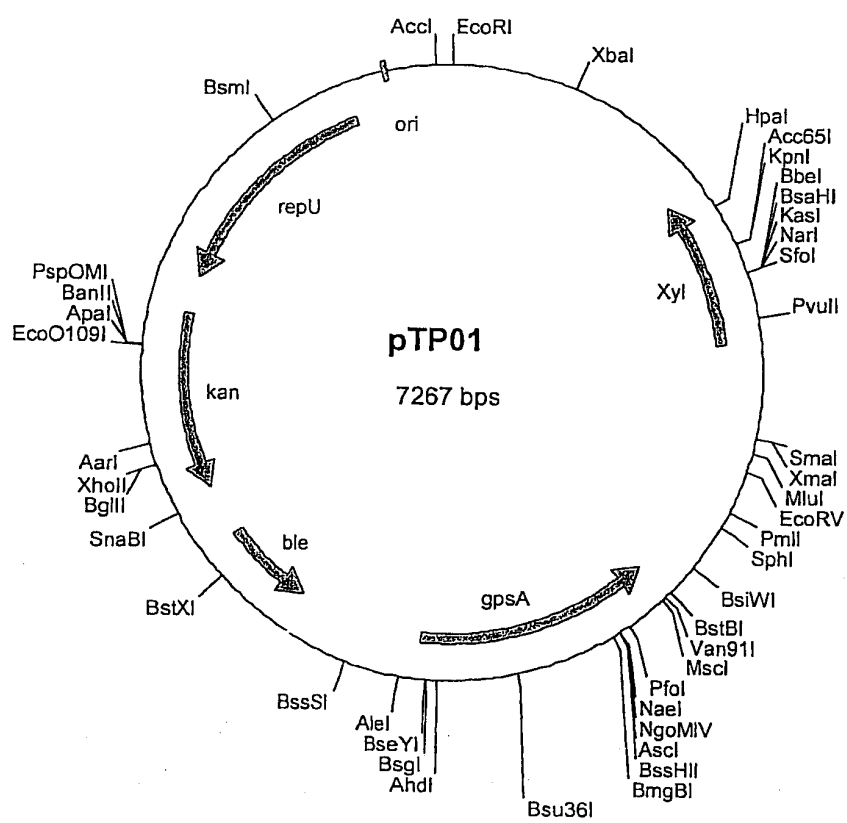


Fig. 5

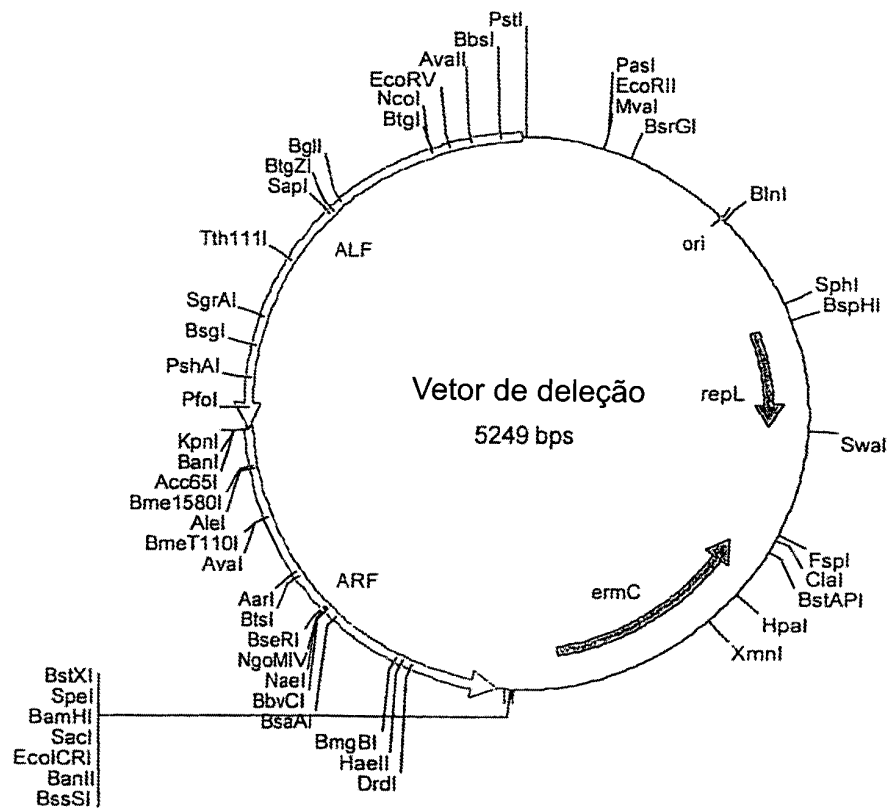


Fig. 6

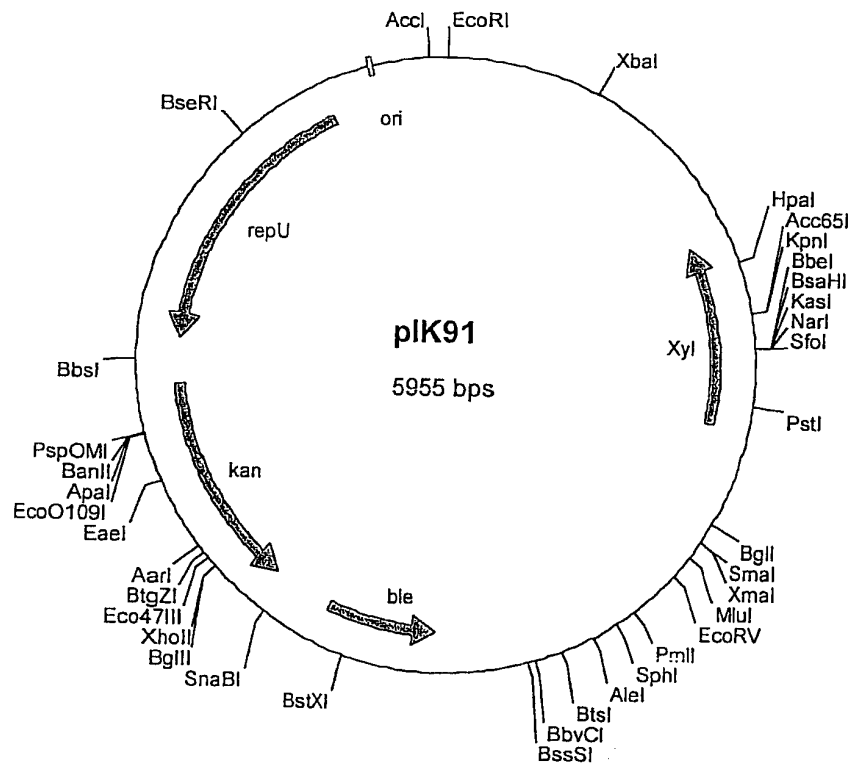


Fig. 7

