



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

(21) **PI0610609-9 A2**



(22) Data de Depósito: 14/04/2006  
(43) Data da Publicação: 06/07/2010  
(RPI 2061)

(51) *Int.Cl.:*  
C12N 1/36  
C12P 9/00  
C12N 1/20  
A23L 1/30  
A61K 35/74

(54) Título: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A ADESÃO E TOLERÂNCIA AO ESTRESSE EM BACTÉRIAS**

(30) Prioridade Unionista: 15/04/2005 US 60/671.887

(73) Titular(es): NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY

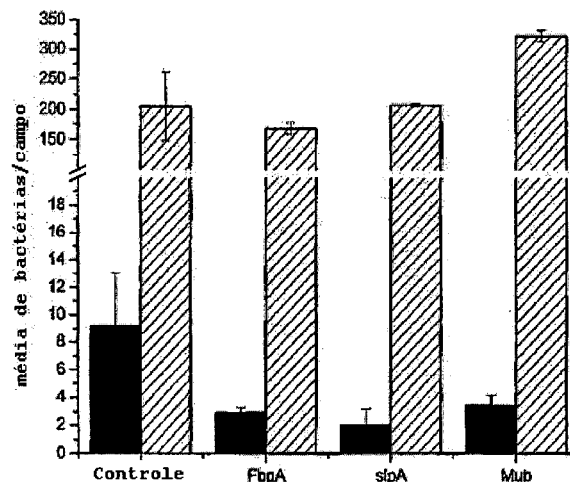
(72) Inventor(es): Andrea Azcarate-Peril, B. Logan Buck, Eric Altermann, Todd Robert Klaenhammer

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014143 de 14/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/113475 de 26/10/2006

(57) **Resumo:** São fornecidos métodos e composições que melhoram a adesão de um bactéria a substratos alvo e/ou melhoram a tolerância ao estresse da bactéria. Métodos compreendem a exposição da bactéria a condições adaptáveis de adesão e dessa forma aumentam a atividade de adesão e/ou tolerância ao estresse da bactéria. Além disso, são fornecidas bactérias que têm uma produção modulada de "auto-indutor-2". Composições incluem bactérias recombinantes que expressam moléculas de ácido nucleico envolvidas na via de produção de "auto-indutor-2". Além disso, são fornecidas proteínas de fusão relacionadas a "auto-indutor-2", peptídeos antigênicos, anticorpos e vetores. Métodos de rastreamento de compostos ou de condições ambientais que estimulam a produção de "auto-indutor-2" e/ou produzem uma resposta adaptável de adesão são também fornecidos, assim como vários métodos de uso para as bactérias que têm adesão aumentada e/ou tolerância ao estresse.



MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A ADESÃO E TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE EM BACTÉRIAS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se às bactérias,  
5 particularmente bactérias probióticas e de ácido lático, e  
métodos e construções para o controle da sinalização  
celular nas mesmas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

No intestino delgado, os lactobacilos representam um  
10 componente principal e importante da microflora comensal.  
Várias espécies de *Lactobacillus* têm sido usadas como  
culturas probióticas selecionadas para uso em alimentos ou  
complementos dietéticos com base nos benefícios específicos  
exigidos do organismo e nas características do  
15 bioprocessamento desejadas pelo fabricante. Nem todas as  
culturas probióticas exibem as mesmas características,  
tornando fundamental a seleção dessas cepas e o  
esclarecimento de seus benefícios. Bactérias de ácido  
lático, e lactobacilos, especificamente, constituem um  
20 gênero comum incluído em produtos alimentícios para uma  
ampla gama de potenciais fatores promotores de saúde.

Bactérias de ácido lático (LAB) são encontradas  
naturalmente em diversos nichos ambientais onde existem  
como membros de comunidades microbianas complexas. A  
25 sobrevida em cada nicho depende da habilidade do organismo  
para perceber e responder às condições variáveis, tais como  
temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e densidade  
celular populacional. Um nicho importante que as LAB  
freqüentemente ocupam é aquele do trato gastrintestinal de  
30 mamíferos (GIT). Provavelmente várias vias de transdução de

sinal controlam a expressão de fatores de adesão, genes de resposta ao estresse e outros determinantes genéticos que promovem a sobrevivência e a competição de LAB dentro dos vários compartimentos do GIT.

5 Alguns lactobacilos intestinais, juntamente com bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas, têm a habilidade de se associar ao epitélio intestinal e suas camadas mucosas. Acredita-se que essa associação seja importante para a realização de certas propriedades  
10 probióticas, incluindo exclusão competitiva, imunomodulação e a liberação de bioterapêuticos, dentre outras. Embora os mecanismos moleculares envolvidos com essa associação não sejam compreendidos, é evidente que o processo é complexo, envolvendo fatores específicos do hospedeiro, específicos  
15 das bactérias e ambientais.

Alguns lactobacilos intestinais, juntamente com bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas, têm a habilidade de se associar com o epitélio intestinal e suas camadas mucosas. A habilidade de colonizar essas  
20 superfícies pode fornecer para os probióticos uma nítida vantagem em relação à outra microflora local e patogênica. É especialmente importante o mecanismo através do qual essas bactérias sobrevivem e potencialmente colonizam o ambiente cinético do trato intestinal. Foram estudados  
25 certos fatores ambientais que influenciam a adesão, incluindo pH, fase de crescimento e a presença de outros microorganismos.

Os lactobacilos devem reter um equilíbrio entre obter seus próprios requisitos de crescimento e sobreviver às  
30 condições hostis, incluindo choque gástrico ácido,

apresentado pelas defesas do hospedeiro e pela microflora concorrente (Tannock (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8.419-8.425). No entanto, pouco se sabe sobre como esses fatores estressantes influenciam a habilidade dos lactobacilos para se associarem a substratos variados no ambiente intestinal.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São fornecidos métodos e composições que melhoram a adesão de uma bactéria a substratos-alvo e/ou melhoram a tolerância ao estresse de uma bactéria. Os métodos compreendem a exposição das bactérias às condições adaptáveis de adesão e, dessa forma, o aumento da adesão e/ou tolerância ao estresse das bactérias. Ainda são fornecidas bactérias que possuem um nível modulado de auto-indutor-2 (AI-2). As composições incluem bactérias recombinantes que expressam moléculas de ácido nucléico envolvidas na via de produção de auto-indutor-2. Ainda são fornecidas proteínas de fusão relacionadas ao auto-indutor-2, peptídeos antigênicos, anticorpos e vetores. São ainda fornecidos métodos para o rastreamento de compostos ou condições ambientais que estimularão a produção de auto-indutor-2 e/ou produzirão uma resposta adaptável de adesão, bem como vários métodos de uso para as bactérias que possuem adesão e/ou tolerância ao estresse aumentadas.

A presente invenção é explicada com mais detalhes nos desenhos aqui apresentados e na especificação apresentada abaixo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 demonstra a adesão de *L. acidophilus* NCFM a células Caco-2 *in vitro*, como observada microscopicamente.

As células bacterianas foram (a) incubadas por uma hora a 37°C em condição não concentrada ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) ou (b) peletizadas e incubadas em uma condição concentrada  $10 \times$  ( $1 \times 10^9$  UFC/ml) (condições AAR) por 1 hora a 37°C.

5 A Figura 2 exibe o protocolo de adesão.

A Figura 3 demonstra as propriedades de adesão de cepas mutantes e cepa de controle NCFM::*lacL* às células Caco-2 em condições padronizadas de incubação (barras sólidas) e condições adaptáveis de adesão (barras listradas). As contagens são expressas como aderência média de bactérias por campo microscópico e as barras de erros representam um desvio padrão da média.

10

A Figura 4 mostra a via para a produção de AI-2 a partir de metionina em *L. acidophilus* NCFM. Intermediários essenciais para a produção de AI-2 são representados em negrito, e ORFs que codificam cada enzima estão listados sob o nome da enzima. A metiltransferase dependente de SAM é abreviada SAM-MT. A etapa final envolve a circularização não enzimática de 4,5-diidroxí-2,3-pentanodiona em AI-2.

15

A Figura 5 mostra a habilidade de adesão de uma cepa mutante de *L. acidophilus* NCFM *LuxS*<sup>-</sup> às células Caco-2, comparada com a cepa de controle NCFM::*lacL*.

20

A Figura 6 mostra AI-2 produzido durante a fase de crescimento de *L. acidophilus* NCFM, detectado do sobrenadante estéril neutralizado (barras listradas) e expresso como luminescência média da cepa parente/luminescência média da cepa mutante *LuxS*<sup>-</sup>. O crescimento de *L. acidophilus* NCFM, representado por OD<sub>600</sub> (linha sólida com círculos) e a queda do pH (linha pontilhada com triângulos), coincide com a produção rápida

25

30

de AI-2 durante a fase de crescimento logarítmico. Cada valor representa a média de experimentos em triplicata e as barras de erro são um desvio padrão da média.

5 A Figura 7 demonstra as propriedades de adesão da cepa de controle e cepas mutantes selecionadas de *L. acidophilus* NCFM, com e sem exposição às condições adaptáveis de adesão.

10 A Figura 8 apresenta a classificação COG de ORFs totais superexpressos na cepa do tipo selvagem (Painel A) ou mutante *LuxS*<sup>-</sup> (Painel B). Os grupos COG (Painel C) são listados nos gráficos de setores com o número de ORFs superexpressos naquele grupo (COG, # de ORFs).

15 A Figura 9 mostra o número de ORFs cuja expressão aumentou (sem listras) ou diminuiu (listras) a partir (A) da fase log inicial a médio ou (B) da fase log médio a tardio. O tipo selvagem é representado por barras brancas e a cepa mutante *LuxS*<sup>-</sup> representada por barras cinzas.

20 A Figura 10 demonstra tolerância à bile de *L. acidophilus* NCFM (sem listras) e da cepa mutante *LuxS*<sup>-</sup> (listras) colhidas na fase log inicial (OD<sub>600</sub> 0,2), log médio (OD<sub>600</sub> 0,7) e log tardio (OD<sub>600</sub> 1,2) de crescimento. Populações bacterianas foram diluídas e plaqueadas em MRS suplementado com Oxgall 0,75% (barras brancas), 1,0% (barras cinza) ou 2,0% (barras pretas). O percentual de  
25 sobrevida foi calculado por comparação com UFC/ml crescido em MRS não suplementado. Diferenças significativas detectadas pelo teste t de Student (P < 0,05) são representadas por um asterisco (\*). As barras de erro representam um desvio padrão da média.

30 A Figura 11 demonstra a sobrevida de populações do

tipo selvagem (círculos abertos) e LuxS<sup>-</sup> (círculos fechados) após estresse por calor a 55°C, quando colhidas na fase log inicial de crescimento (Painel A), OD<sub>600</sub> 0,2, log médio (Painel B), OD<sub>600</sub> 0,7, ou log tardio (Painel C), OD<sub>600</sub> 1,2. Um asterisco (\*) indica que uma diferença estatisticamente significativa (P < 0,05) foi detectada para aquele ponto do tempo. As barras de erro representam um desvio padrão da média.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 As presentes invenções serão descritas com mais detalhes daqui por diante com referência aos desenhos que as acompanham, nos quais algumas modalidades das invenções, mas nem todas, são mostradas. Na verdade, essas invenções podem ser expressas de várias formas diferentes e não devem  
15 ser consideradas como limitadas às modalidades aqui apresentadas; em vez disso, essas modalidades são fornecidas de tal forma que essa especificação satisfaça as exigências legais aplicáveis. Números semelhantes referem-se a elementos semelhantes por toda a especificação.

20 Muitas modificações e outras modalidades das invenções aqui apresentadas ocorrerão para aqueles habilitados na técnica à qual essas invenções pertencem, beneficiando-se dos ensinamentos apresentado das descrições precedentes e dos desenhos a elas associados. Portanto, deve-se entender  
25 que as invenções não se limitam às modalidades específicas apresentadas, e que modificações e outras modalidades visam a estar incluídas dentro do escopo das reivindicações em anexo. Embora sejam empregados nesta especificação termos específicos, eles são usados somente em um sentido genérico  
30 e descritivo, e não com a finalidade de limitá-la.

Como aqui usados, "um/uma" e "o/a" podem ser no plural ou singular, como usados ao longo de toda a especificação e nas reivindicações. Por exemplo, "uma" célula pode significar uma única célula ou uma multiplicidade de 5 células.

Também como aqui usado, "e/ou" refere-se e engloba qualquer e todas as combinações possíveis de um ou mais dos itens associados listados, bem como a ausência de combinações, quando interpretado na alternativa ("ou").

## 10 I. Visão geral

São fornecidos métodos e composições da invenção que melhoram a adesão de uma bactéria a substratos-alvo e/ou melhoram a tolerância ao estresse de uma bactéria. A adesão aumentada de um organismo comensal, por exemplo, um 15 probiótico, às células do trato gastrintestinal ou do trato urogenital encontra utilidade na redução do risco de infecção do intestino, do trato urogenital e de locais de feridas. Da mesma forma, a melhora da tolerância ao estresse de um organismo probiótico como, por exemplo, a 20 taxa de sobrevivência do probiótico é aumentada no ambiente hostil do trato intestinal, irá auxiliar ainda mais na redução do risco de infecção do intestino, do trato urogenital e de locais de feridas.

Em uma modalidade, a presente invenção identificou 25 "condições adaptáveis de adesão". Como aqui usado, o termo "condições adaptáveis de adesão" compreende qualquer condição física, química, biológica ou similar que melhora a adesão de bactérias a um substrato. A presente invenção demonstrou que o pré-condicionamento de células bacterianas 30 a essas condições adaptáveis de adesão resulta em um

aumento da adesão e/ou a um aumento da tolerância ao estresse. Como aqui usadas, as propriedades de adesão aprimoradas das bactérias são denominadas "resposta adaptável de adesão" ou "AAR". Polipeptídeos e polinucleotídeos cujos níveis e/ou atividade são modulados sob condições adaptáveis de adesão são aqui citados como "relacionados à resposta adaptável de adesão" ou polipeptídeos ou polinucleotídeos "relacionados à AAR". Vários polinucleotídeo e polipeptídeos relacionados à AAR são aqui revelados. Veja as Tabelas 8 e 9 abaixo. Polinucleotídeos relacionados a AAR adicionais, e seus polipeptídeos codificados, são apresentados no Id. de Seq. N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 33, 34, 35, 36, 37 e 38.

São ainda fornecidos métodos e composições que modulam a via de auto-indutor-2 de uma bactéria e, portanto, modulam a adesão e/ou a tolerância ao estresse da bactéria. Mais especificamente, são fornecidos polinucleotídeos e polipeptídeos da via de produção de auto-indutor-2 (AI-2) em bactérias. Células bacterianas freqüentemente se comunicam por meio de mecanismos de sensoriamento populacional (*quorum sensing*), que envolvem o reconhecimento dependente da densidade de um auto-indutor, seguido por alterações na expressão gênica. Um sistema de sensoriamento populacional importante que pode ser usado para a comunicação em uma mesma espécie e entre espécies se baseia em um diéster de borato furanosil denominado auto-indutor-2 (AI-2), produzido em quatro etapas enzimáticas a partir de metionina. AI-2 regula a expressão de vários fenótipos, incluindo fatores de virulência, processamento

de DNA, morfologia celular, motilidade, formação de biopelícula, produção de toxina, produção de luz e divisão celular em numerosas espécies (Xavier e cols. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 191-197). Conseqüentemente, são  
5 fornecidos métodos e composições que permitem a modulação do nível e/ou da atividade dos polipeptídeos na via AI-2 e, portanto, é fornecida a habilidade para modular vários fenótipos bacterianos. O polinucleotídeo e as seqüências polipeptídicas da via AI-2 são apresentados no Id. de Seq.  
10 N°: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 21 ou 22. Essas seqüências são aqui denominadas "seqüências relacionadas ao AI-2".

## **II. Polipeptídeos e Polinucleotídeos relacionados ao AI-2 e relacionados à AAR**

São fornecidas composições que empregam os vários  
15 polinucleotídeos e polipeptídeos relacionados à AAR e relacionados ao AI-2 da invenção. A invenção ainda fornece fragmentos e variantes dessas seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, que também podem ser usados para a prática dos métodos da presente invenção. Como aqui  
20 usado, os termos "gene" e "gene recombinante" referem-se às moléculas de ácido nucléico que compreendem um quadro aberto de leitura (ORF), particularmente aqueles que codificam proteínas envolvidas na produção de AI-2 ou na AAR. Moléculas de ácido nucléico isolado da presente  
25 invenção compreendem seqüências de ácidos nucléicos que codificam proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR apresentada nos Ids. de Seq. N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 34, 36 ou 38, as seqüências de ácidos nucléicos apresentadas nos Ids. de Seq. N°s: 1, 3, 5, 7, 9,  
30 11, 13, 15, 17, 19, 21, 33, 35 ou 37, e variantes e

fragmentos destas. A presente invenção também engloba moléculas de ácido nucléico anti-senso, como descritas abaixo.

Polipeptídeos e proteínas isoladas envolvidos na  
5 produção de AI-2 ou na AAR, e variantes e fragmentos destes, são englobados, bem como métodos para a produção daqueles polipeptídeos. Para as finalidades da presente invenção, os termos "proteína" e "polipeptídeo" são usados de forma intercambiável. Polipeptídeos relacionados ao AI-2  
10 exemplares incluem os Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 2, 4, 14, 16, 22. Polipeptídeos relacionados à AAR exemplares incluem o Id. de Seq. N<sup>o</sup>: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 34, 36 e 38.

A "produção de AI-2" ou a "resposta adaptável de  
15 adesão (AAR)" refere-se a uma atividade biológica ou funcional, como determinada *in vivo* ou *in vitro* de acordo com técnicas padronizadas de ensaio. Por exemplo, a produção de AI-2 pode ser medida utilizando-se uma cepa repórter *Vibrio harveyi* e um bioensaio de auto-indutor (De  
20 Keersmaecker e cols. (2003) *Microbiology* 149: 1.953-6). Ensaio adicionais envolvem, por exemplo, a medida da sobrevivência ou do crescimento bacteriano sob as condições adaptáveis de adesão aqui descritas em outra seção.

As bactérias e os métodos da invenção são úteis para  
25 fermentações bacterianas, por exemplo, quando se desejar estimular a produção de AI-2, ou promover a adesão ou formação de biopelícula das bactérias em um substrato para a realização do processo fermentativo.

As bactérias da invenção são úteis como bactérias  
30 probióticas, por exemplo, quando se desejar estimular a

produção de AI-2, ou promover a adesão ou formação de biopelícula das bactérias no intestino ou na parede intestinal para dele excluir competitivamente outras bactérias menos desejadas.

5 Métodos de indução de sinalização celular ou uma resposta adaptável de adesão em bactérias são úteis na estimulação da produção de AI-2, ou na promoção da adesão ou formação de biopelícula de bactérias, incluindo bactérias tanto recombinantes quanto não recombinantes do

10 tipo selvagem, para estimular a produção de AI-2, ou para promover a adesão ou formação de biopelícula por bactérias probióticas.

As composições de ácido nucléico e polipeptídeo englobadas pela presente invenção são isoladas ou

15 substancialmente purificadas. O termo "isolado" ou "substancialmente purificado" significa que as moléculas de ácido nucléico ou polipeptídeo, ou fragmentos ou variantes biologicamente ativos, são substancial ou essencialmente livres de componentes normalmente encontrados em associação

20 com a molécula de ácido nucléico ou proteína em seu estado natural. Tais componentes incluem outro material celular, meios de cultura da produção recombinante, e várias substâncias químicas usadas na síntese química das proteínas ou dos ácidos nucléicos. De preferência, um ácido

25 nucléico "isolado" da presente invenção é livre de seqüências de ácidos nucléicos que flanqueiam o ácido nucléico de interesse no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucléico foi derivado (tais como as seqüências de codificação presentes nas extremidades 5' ou 3'). No

30 entanto, a molécula pode incluir algumas bases ou porções

adicionais que não afetam negativamente as características básicas da composição. Por exemplo, em várias modalidades, a molécula de ácido nucléico isolado contém menos de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb de seqüência de ácidos nucléicos normalmente associados ao DNA genômico nas células das quais foi derivada. Da mesma forma, uma proteína substancialmente purificada tem menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% (por peso seco) de proteína contaminante, ou proteína não relacionada ao AI-2 ou não relacionada à AAR. Quando a proteína é produzida de forma recombinante, preferivelmente o meio de cultura representa menos de 30%, 20%, 10% ou 5% do volume da preparação de proteína, e quando a proteína é produzida quimicamente, preferivelmente as preparações têm menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (por peso seco) de precursores químicos, ou substâncias químicas não relacionadas à produção de AI-2 ou às condições adaptáveis de adesão.

*i. Fragmentos e variantes*

A invenção fornece moléculas de ácido nucléico isolado que compreendem seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, além das proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR por elas codificadas. Também são fornecidos fragmentos e variantes dessas seqüências de nucleotídeos e proteínas codificadas. "Fragmento" de uma seqüência de nucleotídeos ou proteína significa uma porção da seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos.

Fragmentos das moléculas de ácido nucléico aqui revelados podem ser usados como sondas de hibridização para identificar ácidos nucléicos que codificam a proteína

relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, ou podem ser usados como iniciadores em amplificação por PCR ou mutação de moléculas de ácido nucléico relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. Fragmentos de ácidos nucléicos também  
5 podem ser ligados a um substrato físico para compreenderem o que pode ser considerado um macro- ou microarranjo (por exemplo, Patente U.S. N° 5.837.832; Patente U.S. N° 5.861.242). Tais arranjos de ácidos nucléicos podem ser usados para estudar a expressão gênica ou para identificar  
10 moléculas de ácido nucléico com identidade suficiente para as seqüências-alvos.

A presente invenção ainda fornece um arranjo ou chip de ácidos nucléicos, ou seja, vários ácidos nucléicos (por exemplo, DNA) como sondas moleculares organizadas ou  
15 arranjadas precisamente em um suporte sólido, que permite o seqüenciamento de genes, o estudo de mutações neles contidas e/ou a análise da expressão de genes, uma vez que esses arranjos e chips são atualmente de interesse em função de seu tamanho muito pequeno e de sua alta  
20 capacidade em termos de número de análises.

A função desses arranjos/chips de ácidos nucléicos se baseia em sondas moleculares, principalmente oligonucleotídeos, que são anexadas a um veículo que possui um tamanho geralmente de poucos centímetros quadrados ou  
25 mais, como desejado. Para uma análise, o veículo, por exemplo, um arranjo/chip de DNA, é coberto com sondas de DNA (por exemplo, oligonucleotídeos) que são arranjadas em uma localização ou posição predeterminada no veículo. Uma amostra contendo um ácido nucléico-alvo e/ou fragmentos  
30 deste a serem analisados, por exemplo, DNA ou RNA ou cDNA,

que foi marcada previamente, é colocada em contato com o arranjo/chip de DNA, levando à formação, através de hibridização, de um duplex. Após uma etapa de lavagem, a análise da superfície do chip permite que quaisquer  
5 hibridizações sejam localizadas por meio dos sinais emitidos pelo alvo marcado. Como resultado, forma-se uma "impressão digital" da hibridização, a qual, por processamento computacional, permite a obtenção de informações como a expressão de genes, a presença de  
10 fragmentos específicos na amostra, a determinação de seqüências e/ou a identificação de mutações.

Em uma modalidade desta invenção, a hibridização entre ácidos nucléicos-alvo e ácidos nucléicos da invenção, usados na forma de sondas e depositados ou sintetizados *in*  
15 *situ* em um chip/arranjo de DNA, pode ser determinada por meio de fluorescência, radioatividade, detecção eletrônica, ou semelhantes, como são conhecidos na técnica.

Em outra modalidade, as seqüências de nucleotídeos da invenção podem ser usadas na forma de um arranjo/chip de  
20 DNA para a realização de análises da expressão de genes envolvidos na produção de AI-2 ou na AAR. Essa análise se baseia no arranjo/chips de DNA nos quais sondas, escolhidas por sua especificidade para caracterizar certo gene ou seqüência de nucleotídeos, estão presentes. As seqüências-  
25 alvos a serem analisadas são marcadas antes de serem hibridizadas sobre o chip. Após lavagem, os complexos marcados são detectados e quantificados, com as hibridizações sendo realizadas pelo menos em duplicata. Análises comparativas das intensidades dos sinais obtidos  
30 com relação à mesma sonda para amostras diferentes e/ou

para sondas diferentes com a mesma amostra, permitem, por exemplo, uma transcrição diferencial de RNA derivado da amostra.

Ainda em outra modalidade, os arranjos/chips contendo seqüências de nucleotídeos da invenção podem compreender seqüências de nucleotídeos específicas para outros microorganismos, o que permite o teste serial e a rápida identificação da presença de um microorganismo em uma amostra.

10 Em uma modalidade adicional, o princípio do arranjo/chip de DNA também pode ser usado para produzir arranjos/chips de proteína sobre os quais o suporte foi coberto com um polipeptídeo e/ou um anticorpo desta invenção, ou arranjos destes, no lugar do ácido nucléico.

15 Esses arranjos/chips de proteína tornam possível, por exemplo, analisar as interações biomoleculares induzidas pela afinidade de captura de alvos sobre um suporte coberto, por exemplo, com proteínas, por ressonância de plasma de superfície (SPR). Os polipeptídeos ou anticorpos

20 desta invenção, capazes de se ligarem especificamente aos anticorpos ou polipeptídeos derivados da amostra a ser analisada, podem ser usados em arranjos/chips de proteína para a detecção e/ou identificação de proteínas e/ou peptídeos em uma amostra.

25 Dessa forma, a presente invenção fornece um microarranjo ou microchip que compreende vários ácidos nucléicos desta invenção em qualquer combinação, incluindo repetições, além de um microarranjo que compreende vários polipeptídeos desta invenção em qualquer combinação,

30 incluindo repetições. Também é fornecido um microarranjo

que compreende um ou mais anticorpos que reagem especificamente com vários polipeptídeos desta invenção, em qualquer combinação, incluindo repetições.

O termo "molécula de ácido nucléico" significa moléculas de DNA (por exemplo, cDNA ou DNA genômico) e moléculas de RNA (por exemplo, mRNA) e análogos do DNA ou RNA gerado com a utilização de análogos de nucleotídeos. A molécula de ácido nucléico pode ser de fita simples ou de fita dupla, mas preferivelmente é DNA de fita dupla. Um fragmento de uma molécula de ácido nucléico que codifica uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR pode codificar um fragmento de proteína que é biologicamente ativo, ou ele pode ser usado como uma sonda de hibridização ou iniciador de PCR como descrito abaixo. Um fragmento biologicamente ativo de um polipeptídeo aqui revelado pode ser preparado isolando-se uma porção de uma das seqüências de nucleotídeos da invenção, expressando-se a porção codificada da proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR (por exemplo, por expressão recombinante *in vitro*), e avaliando-se a atividade da porção codificada da proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Fragmentos de moléculas de ácido nucléico que codificam proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR compreendem pelo menos cerca de 15, 20, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600 nucleotídeos ou até o número total de nucleotídeos presentes em uma seqüência de comprimento total relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR de nucleotídeos, como aqui revelada (por exemplo, 693 para o Id. de Seq. N°: 1, 942

para o Id. de Seq. N°: 3, 1.116 para o Id. de Seq. N°: 13, 471 para o Id. de Seq. N°: 15 etc.).

Fragmentos de seqüências de aminoácidos incluem fragmentos polipeptídicos adequados para uso como

5 imunógenos para o desenvolvimento de anticorpos contra polipeptídeos envolvidos na produção de AI-2 ou na AAR. Fragmentos incluem peptídeos que compreendem seqüências de aminoácidos suficientemente idênticas ou derivadas da seqüência de aminoácidos de uma proteína relacionada ao AI-

10 2 ou relacionada à AAR, ou proteína de comprimento parcial, da invenção, e que exibem pelo menos uma atividade de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, mas que incluem menos aminoácidos do que as proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR de comprimento total aqui

15 reveladas. Em uma modalidade, os fragmentos podem incluir polipeptídeos que sejam biologicamente ativos. Uma porção biologicamente ativa de um polipeptídeo é aquela que exhibe pelo menos uma atividade (por exemplo, uma atividade associada à produção de AI-2 ou à AAR) da proteína de

20 comprimento total da invenção. Uma porção biologicamente ativa de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR pode ser um polipeptídeo que tenha comprimento de, por exemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 aminoácidos contíguos, ou até o número total de aminoácidos

25 presentes em uma proteína de comprimento total relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR da presente invenção (por exemplo, 231 para o Id. de Seq. N°: 2, 314 para o Id. de Seq. N°: 4, 372 para o Id. de Seq. N°: 14, 157 para o Id. de Seq. N°: 16 etc.). Essas porções biologicamente ativas

30 podem ser preparadas por técnicas recombinantes e avaliadas

quanto a uma ou mais das atividades funcionais de uma proteína nativa relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Como aqui usado, um fragmento compreende pelo menos 5 aminoácidos contíguos dos Ids. de Seq. pares N<sup>os</sup>: 2-22, 36, 5 ou 38. No entanto, a invenção engloba outros fragmentos, por exemplo, qualquer fragmento na proteína acima de 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 ou acima de 500 aminoácidos.

Seqüências da invenção relacionadas à AAR compreendem os Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 19 e 20 que codificam uma proteína de ligação de fibronectina; Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 33, 34, 35 e 36 que codificam proteínas envolvidas na produção de exopolissacarídeos; e Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 37 e 38 que codificam uma proteína envolvida na esterificação de D-alanina de ácido lipoteicóico e ácido teicóico da parede. Em modalidades específicas, uma variante ou um fragmento biologicamente ativo do Id. de Seq. N<sup>o</sup>: 19 ou 20 continuará a ter atividade de ligação à mucosa intestinal, incluindo ligação à fibronectina, mucina ou moléculas da matriz extracelular. São conhecidos métodos para testar essa atividade. Por exemplo, a atividade de ligação à fibronectina da variante pode ser testada com o uso de microesferas fluorescentes cobertas com FN-120, que é um fragmento quimiotróptico de ligação celular de fibronectina plasmática. Veja, por exemplo, Schultz e Armant (1995) *J. Biol. Chem.* 270(19): 11.522-31. Uma variante ou um fragmento biologicamente ativo do Id. de Seq. N<sup>o</sup>: 33, 34, ou 36 continuará a estar envolvido na produção de exopolissacarídeos. A produção de exopolissacarídeo pode ser estimada pelo método quantitativo de fenol/ácido

sulfúrico descrito em Mozi, e cols. (2001) *J. Appl. Microbiol.* 91(1):160-167. Uma variante ou um fragmento biologicamente ativo do Id. de Seq. N°: 37 ou 38 continuará a estar envolvido na inserção de D-alanina no ácido lipotecóico em bactérias. A captação de D-alanina pode ser medida de acordo com os métodos descritos por O'Brien, e cols. (1995) *Microbios* 83(335):119-137.

Outras seqüências da invenção relacionadas à AAR compreendem enzimas envolvidas na produção de AI-2, incluindo os Ids. de Seq. N°s: 1 e 2, que codificam uma nucleosídeo fosforilase (*pfs*); Ids. de Seq. N°s: 3 e 4, que codificam uma metil transferase dependente de SAM (SAM-MT); Ids. de Seq. N°s: 13 e 14, que codificam uma metionina adenosiltransferase (*metE*); Ids. de Seq. N°s: 15 e 16, que codificam uma S-ribosil-homocisteinase (*luxS*); e os Ids. de Seq. N°s: 21 e 22, que codificam uma metionina adenosiltransferase (*metK*). Em modalidades específicas, uma variante ou um fragmento biologicamente ativo dos Ids. de Seq. N°s: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 21 ou 22 continuará a ter a atividade enzimática citada acima, respectivamente. São conhecidos métodos para avaliar a atividade para cada uma dessas enzimas. Por exemplo, a atividade de *metK* pode ser medida quantificando-se a produção de S-adenosiltransferase com o uso de cromatografia líquida de alto eficiência de acordo com os métodos descritos em Posnick e Samson (1999) *J. Bacteriol.* 181(21): 6.756-6.762. A atividade de doação de metil de SAM-MT pode ser testada de acordo com os métodos de Borchardt e cols. (1974) *J. Med. Chem.* 19(9): 1.104-1.110. A atividade de MTA/SAH nucleosídeo pode ser medida seguindo a conversão de <sup>14</sup>C-

metiltioadenosina em  $^{14}\text{C}$ -metiltioribose, como descrito por Della-Ragione e cols. (1995) *Biochem. J.* 232: 335-341 e Cornell e cols. (1996) *Biochem. J.* 317: 285-290. A atividade de MetE pode ser medida de acordo com o ensaio descrito por Hondorp e Matthews (2004) *PLoS Biol.* 2(11): e336. A atividade de LuxS pode ser medida com o uso do ensaio de repórter de *Vibrio harveyi*, como descrito em outra seção nesta especificação.

Variantes das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos estão englobadas pela presente invenção. O termo "variante" significa uma seqüência suficientemente idêntica. Conseqüentemente, a invenção engloba moléculas de ácido nucléico isolado que são suficientemente idênticas às seqüências de nucleotídeos que codificam proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR nos Ids. de Seq. pares N<sup>os</sup>: 2-22, 34, 36 ou 38, ou moléculas de ácido nucléico que hibridizam para uma molécula de ácido nucléico dos Ids. de Seq. ímpares N<sup>os</sup>: 1-21, 33, 35 ou 37, ou um complemento destes, sob condições altamente controladas.

Variantes também incluem polipeptídeos variantes codificados pelas seqüências de nucleotídeos da presente invenção. Além disso, polipeptídeos da presente invenção possuem uma seqüência de aminoácidos que é suficientemente idêntica a uma seqüência de aminoácidos apresentada nos Ids. de Seq. pares N<sup>os</sup>: 2-22, 34, 36 ou 38. O termo "suficientemente idêntica" significa que uma seqüência de aminoácidos ou uma seqüência de nucleotídeos contém um número suficiente ou mínimo de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos equivalente ou idêntico, comparada com uma segunda seqüência de aminoácidos ou seqüência de

nucleotídeos, fornecendo, desse modo, um domínio estrutural comum e/ou indicando uma atividade funcional comum. Variantes conservadoras incluem aquelas seqüências de nucleotídeos que diferem em função da degeneração do código genético.

Em geral, seqüências de aminoácidos ou seqüências de nucleotídeos que possuem pelo menos cerca de 45%, 55% ou 65% de identidade, pelo menos cerca de 70% ou 75% de identidade, pelo menos cerca de 80%, 85% ou 95%, pelo menos cerca de 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade de seqüência para qualquer uma das seqüências de aminoácidos dos Ids. de Seq. pares N<sup>os</sup>: 2-22, 34, 36 ou 38, ou qualquer uma das seqüências de nucleotídeos dos Ids. de Seq. ímpares N<sup>os</sup>: 1-21, 33, 35 ou 37, respectivamente, são aqui definidas como suficientemente idênticas. Proteínas variantes englobadas pela presente invenção são biologicamente ativas, ou seja, retêm a atividade biológica desejada da proteína nativa. Uma variante biologicamente ativa de uma proteína da invenção pode diferir daquela proteína por apenas 1-15 resíduos de aminoácidos, apenas 1-10, por exemplo, 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2, ou até mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Variantes de ocorrência natural podem existir dentro de uma população (por exemplo, a população de bactérias de ácido láctico). Tais variantes podem ser identificadas pela utilização de técnicas conhecidas de biologia molecular como, por exemplo, reação em cadeia de polimerase (PCR), e hibridização, como descrita abaixo. Seqüências nucleotídicas derivadas sinteticamente, por exemplo,

seqüências geradas por mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR que ainda codificam uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR também estão incluídas como variantes. Uma ou mais substituições, 5 adições, ou eliminações de nucleotídeos ou aminoácidos podem ser introduzidas em uma seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos aqui revelada, de tal forma que as substituições, adições, ou eliminações são introduzidas na proteína codificada. As adições (inserções) ou eliminações 10 (truncamentos) podem ser feitas na extremidade N-terminal ou C-terminal da proteína nativa, ou em um ou mais sítios na proteína nativa. Da mesma forma, uma substituição de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos pode ser feita em um ou mais sítios na proteína nativa.

15 Por exemplo, podem ser feitas substituições conservadoras de aminoácidos em um ou mais resíduos de aminoácidos previstos, preferivelmente não essenciais. Um resíduo de aminoácido "não essencial" é um resíduo que pode ser alterado da seqüência do tipo selvagem de uma proteína, 20 sem alterar a atividade biológica, enquanto um aminoácido "essencial" é necessário para a atividade biológica. Uma "substituição conservadora de aminoácidos" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral similar. Famílias de 25 resíduos de aminoácidos que possuem cadeias laterais similares são conhecidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias 30 laterais polares sem carga (por exemplo, glicina,

asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais com ramificações beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Tais substituições não seriam feitas para resíduos de aminoácidos conservados, ou para resíduos de aminoácidos que residem dentro de um motivo conservado, onde tais resíduos são essenciais para a atividade da proteína.

Alternativamente, podem ser feitas mutações aleatoriamente ao longo de todo ou parte do comprimento da seqüência codificadora relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, por exemplo, por mutagênese por saturação. Os mutantes podem ser expressos de forma recombinante, e rastreados quanto àqueles que retêm a atividade biológica testando-se a atividade protetora relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR com o uso de técnicas de ensaio padronizadas. Métodos para mutagênese e alterações de seqüência de nucleotídeos são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel e cols. (1987) *Methods in Enzymol. Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nova York) e as referências neles citadas. As mutações feitas no DNA que codifica a variante não devem romper o quadro de leitura e, preferivelmente, não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundário. Veja a Publicação do Pedido de Patente EP N° 75.444. Diretrizes sobre substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade

biológica da proteína de interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff e cols. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado por referência.

5 Não se espera que as eliminações, inserções e substituições das seqüências de proteína aqui englobadas produzam mudanças radicais nas características da proteína. No entanto, quando for difícil prever o efeito exato da substituição, eliminação ou inserção antes de fazê-la, aqueles habilitados na técnica observarão que o efeito será  
10 avaliado por ensaios de rastreamento rotineiros. Ou seja, a atividade pode ser avaliada comparando-se a atividade da seqüência modificada com a atividade da seqüência original. Por exemplo, a atividade de variantes e fragmentos de  
15 polipeptídeos envolvidos na produção de AI-2 ou na AAR pode ser medida testando-se a produção de AI-2 com a utilização de métodos aqui revelados em outra seção.

Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos variantes da presente invenção também englobam seqüências derivadas  
20 de procedimentos mutagênicos e recombinogênicos, tais como embaralhamento de DNA (*DNA shuffling*). Com um procedimento como esse, uma ou mais regiões codificadoras diferentes de proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR podem ser usadas para criar uma nova proteína relacionada ao AI-2 ou  
25 relacionada à AAR que possua as propriedades desejadas. Dessa forma, são geradas bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes a partir de uma população de polinucleotídeos relacionados à seqüência que compreendem regiões da seqüência que possuem identidade de seqüência substancial e  
30 podem ser recombinados de forma homóloga *in vitro* ou *in*

vivo. Por exemplo, com o uso dessa abordagem, motivos da seqüência que codificam um domínio de interesse podem ser embaralhados entre o gene relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR da invenção e outros genes conhecidos relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR para se obter um novo gene que codifica uma proteína com uma propriedade de interesse aprimorada como, por exemplo, um  $K_m$  aumentado, no caso de uma enzima. Estratégias para esse embaralhamento de DNA são conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10.747-10.751; Stemmer (1994) *Nature* 370: 389-391; Cramer e cols. (1997) *Nature Biotech.* 15: 436-438; Moore e cols. (1997) *J. Mol. Biol.* 272: 336-347; Zhang e cols. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4.504-4.509; Cramer e cols. (1998) *Nature* 391: 288-291; e Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.605.793 e 5.837.458.

Variantes de uma proteína da invenção relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR podem ser identificadas rastreando-se bibliotecas combinatórias de mutantes, por exemplo, mutantes por truncamento, de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Em uma modalidade, é gerada uma biblioteca diversificada de variantes relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR por mutagênese combinatória no nível do ácido nucléico, e ela é codificada por uma biblioteca gênica diversificada. Uma biblioteca diversificada de variantes relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR pode ser produzida, por exemplo, ligando-se enzimaticamente uma mistura de oligonucleotídeos sintéticos em seqüências gênicas de tal forma que um conjunto degenerado de potenciais seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR seja expressível como

polipeptídeos individuais ou, alternativamente, como um conjunto de proteínas de fusão maiores (por exemplo, para exibição de fago) contendo o conjunto de seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. Há vários métodos que podem ser usados para produzir bibliotecas de potenciais variantes relacionadas ao AI-2- ou relacionadas à AAR a partir de uma seqüência degenerada de oligonucleotídeos. A síntese química de uma seqüência gênica degenerada pode ser realizada em um sintetizador automático de DNA, e o gene sintético então ligado em um vetor de expressão apropriado. O uso de um conjunto de genes degenerados permite o fornecimento, em uma mistura, de todas as seqüências que codificam o conjunto desejado de potenciais seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. Métodos para a síntese de oligonucleotídeos degenerados são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura e cols. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura e cols. (1984) *Science* 198: 1.056; Ike e cols. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11: 477).

Além disso, bibliotecas de fragmentos de uma seqüência codificadora de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR podem ser usadas para gerar uma população diversificada de fragmentos relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR para o rastreamento e subsequente seleção de variantes de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Em uma modalidade, pode ser gerada uma biblioteca de fragmentos da seqüência codificadora tratando-se um fragmento de PCR de fita dupla de uma seqüência codificadora relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR com uma nuclease sob condições nas quais ocorra

rompimento (*nicking*) apenas cerca de uma vez por molécula, desnaturando-se o DNA de fita dupla, renaturando-se o DNA para formar DNA de fita dupla que possa incluir pares senso/anti-senso de diferentes produtos rompidos, removendo-se porções de fita simples dos duplexos re-  
5 formados por tratamento com S1 nuclease, e ligando-se a biblioteca de fragmentos resultante em um vetor de expressão. Por esse método, pode-se derivar uma biblioteca de expressão que codifique fragmentos do N-terminal e  
10 internos de vários tamanhos da proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR.

São conhecidas várias metodologias na técnica para o rastreamento de produtos gênicos de bibliotecas combinatórias feitos por mutações ou truncamento em ponto e  
15 para o rastreamento de bibliotecas de cDNA para produtos gênicos que possuem uma propriedade selecionada. Tais técnicas são adaptáveis para um rastreamento rápido das bibliotecas gênicas geradas pela mutagênese combinatória de proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. As  
20 técnicas usadas mais amplamente, que são passíveis de uma análise de alto rendimento, para o rastreamento de grandes bibliotecas gênicas tipicamente incluem a clonagem da biblioteca gênica em vetores de expressão replicáveis, transformação das células apropriadas com a biblioteca de  
25 vetores resultante, e a expressão dos genes combinatórios sob condições nas quais a detecção de uma atividade desejada facilita o isolamento do vetor que codifica o gene cujo produto foi detectado. A mutagênese de montagem recursiva (REM), uma técnica que aumenta a frequência de  
30 mutantes funcionais nas bibliotecas, pode ser usada em

combinação com os ensaios de rastreamento para identificar variantes relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR (Arkin e Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7.811-7.815; Delgrave e cols. (1993) *Protein Engineering* 6(3): 5 327-331).

**ii. Identidade de seqüências**

As seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR são membros de uma família de moléculas com características funcionais conservadas. O termo "família" 10 significa duas ou mais proteínas ou moléculas de ácido nucléico que possuem identidade de seqüências de nucleotídeos ou de seqüências de aminoácidos suficiente. Uma família que contém grupos profundamente divergentes pode ser dividida em subfamílias. Um clã é um grupo de 15 famílias que provavelmente possuem uma ancestralidade comum. Membros de um clã têm uma estrutura terciária similar. O termo "identidade de seqüência" significa que os resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos são os mesmos quando se alinham duas seqüências para uma correspondência 20 máxima sobre pelo menos uma janela de comparação especificada. "Janela de comparação" significa um segmento contíguo das duas seqüências de nucleotídeos ou seqüências de aminoácidos para um alinhamento ótimo, em que a segunda seqüência pode conter adições ou eliminações (ou seja, 25 lacunas - *gaps*), quando comparada com a primeira seqüência. Geralmente, para alinhamentos de ácidos nucléicos, a janela de comparação tem comprimento de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos e, opcionalmente, pode ter 30, 40, 50, 100 ou mais. Para alinhamentos de seqüências de aminoácidos, a 30 janela de comparação tem comprimento de pelo menos 6

aminoácidos contíguos e, opcionalmente, pode ter 10, 15, 20, 30 ou mais. Aqueles habilitados na técnica sabem que, para evitar uma similaridade elevada em consequência da inclusão de lacunas, uma penalidade de lacuna é tipicamente introduzida e é subtraída do o número de combinações.

Os membros da família podem ser da mesma espécie ou de espécies diferentes, e podem incluir homólogos, além de proteínas distintas. Frequentemente, membros de uma família exibem características funcionais comuns. Homólogos podem ser isolados com base em sua identidade em relação às seqüências de ácidos nucleicos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR aqui reveladas com a utilização do cDNA, ou uma porção deste, como sonda de hibridização, de acordo com técnicas de hibridização padronizadas, sob condições de hibridização altamente controladas, como revelado abaixo.

Para determinar o percentual de identidade de duas seqüências de aminoácidos ou de nucleotídeos, é realizado um alinhamento. O percentual de identidade das duas seqüências é uma função do número de resíduos idênticos compartilhados pelas duas seqüências na janela de comparação (ou seja, percentual de identidade = número de resíduos idênticos/número total de resíduos x 100). Em uma modalidade, as seqüências têm o mesmo comprimento. Métodos similares àqueles mencionados abaixo podem ser usados para determinar o percentual de identidade entre duas seqüências. Os métodos podem ser usados com ou sem a permissão de lacunas. O alinhamento também pode ser realizado manualmente por inspeção.

Quando seqüências de aminoácidos diferem em substituições conservadoras, o percentual de identidade

pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para a realização desse ajuste são conhecidos na técnica. Tipicamente, a substituição conservadora é classificada como não  
5 combinação parcial, em vez de não combinação total, aumentando, dessa forma, a percentagem da identidade de seqüência.

Podem ser usados algoritmos matemáticos para determinar o percentual de identidade de duas seqüências.  
10 Exemplos não limitantes de algoritmos matemáticos são o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2.264, modificado em Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5.873-5.877; o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17; o algoritmo de  
15 alinhamento local de Smith e cols. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; o algoritmo de alinhamento global de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453; e o método de pesquisa de alinhamento local de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2.444-2.448.

20 Foram projetadas várias implementações por computador baseadas nesses algoritmos matemáticos para permitir a determinação da identidade de seqüências. Os programas BLAST de Altschul e cols. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 se baseiam no algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *supra*.  
25 Pesquisas para a obtenção de seqüências de nucleotídeos que sejam homólogas às seqüências de nucleotídeos da presente invenção podem ser realizadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, comprimento (*wordlength*) = 12. Para a obtenção de seqüências de aminoácidos homólogas às  
30 seqüências que codificam uma proteína ou polipeptídeo da

presente invenção, o programa BLASTX pode ser usado, pontuação = 50, comprimento (*wordlength*) = 3. Alinhamentos com lacunas podem ser obtidos com o uso de Gapped BLAST (em BLAST 2.0), como descrito em Altschul e cols. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389. Para se detectar relacionamentos distantes entre moléculas, pode ser utilizado PSI-BLAST. Veja Altschul e cols. (1997) *supra*. Para todos os programas BLAST, os parâmetros-padrão dos respectivos programas podem ser usados. Veja *www.ncbi.nlm.nih.gov*. O alinhamento também pode ser feito manualmente por inspeção.

Outro programa que pode ser utilizado para determinar o percentual de identidade de seqüências é o programa ALIGN (versão 2.0), que usa o algoritmo matemático de Myers e Miller (1988) *supra*. Uma tabela de peso de resíduo PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4 podem ser usadas com esse programa quando se comparam seqüências de aminoácidos.

Além dos programas ALIGN e BLAST, os programas BESTFIT, GAP, FASTA e TFASTA são parte do pacote de programas "GCG Wisconsin Genetics Software Package", Versão 10 (disponível por Accelrys Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, Califórnia, EUA), e podem ser usados para a realização de alinhamentos de seqüências. O programa preferido é GAP, versão 10, que utiliza o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *supra*. A menos que estabelecido de forma diferente, os valores de similaridade de identidade de seqüência aqui apresentados referem-se ao valor obtido com a utilização de GAP Versão 10 com os seguintes parâmetros: % de identidade e % de similaridade

para uma seqüência de nucleotídeos com o uso de Peso de GAP de 50 e Peso do Comprimento de 3 e a matriz de pontuação nwsgapdna.cmp; % de identidade e % de similaridade para uma seqüência de aminoácidos com o uso de Peso de GAP de 8 e  
5 Peso de Comprimento de 2, e a matriz de pontuação BLOSUM62; ou qualquer programa equivalente. "Programa equivalente" significa qualquer programa de comparação de seqüências que, para quaisquer duas seqüências em questão, gera um alinhamento que possui combinações idênticas de resíduos de  
10 nucleotídeos ou de aminoácidos, e um percentual de identidade de seqüência idêntico, quando comparado com o alinhamento correspondente gerado por GAP Versão 10.

O alinhamento de uma seqüência em uma base de dados em relação a uma seqüência investigada produzida pelo  
15 algoritmo BLASTN, FASTA, BLASTP ou semelhante é normalmente descrito como um "hit". Hits para uma ou mais seqüências da base de dados por uma seqüência investigada produzida pelo algoritmo de BLASTN, FASTA, BLASTP ou um algoritmo similar alinham e identificam porções similares de uma seqüência.  
20 Um hit para uma seqüência da base de dados geralmente representa uma superposição em relação a uma fração do comprimento da seqüência da seqüência investigada, ou seja, uma porção ou fragmento da seqüência investigada. No entanto, a superposição pode representar todo o comprimento  
25 da seqüência investigada. Os hits em um alinhamento em relação a uma seqüência investigada produzida por algoritmos de BLASTN, FASTA ou BLASTP em relação às seqüências em uma base de dados são comumente dispostos em ordem do grau de similaridade e do comprimento da  
30 superposição de seqüência.

*Hits* de polinucleotídeos e polipeptídeos alinhados pelos algoritmos de BLASTN, FASTA ou BLASTP em relação a uma seqüência investigada produzem valores "Previstos". O valor Previsto (valor E) indica o número de *hits* que se pode "prever" em relação a certo número de seqüências contíguas aleatoriamente quando se pesquisa uma base de dados de determinado tamanho. O valor Previsto é usado como um limiar de significância para se determinar se o *hit* para uma base de dados, por exemplo, a base de dados GENBANK® ou EMBL, indica a similaridade real. Por exemplo, um valor E de 0,1 atribuído a um *hit* de polinucleotídeo é interpretado como significando que, em uma base de dados do tamanho da base de dados GENBANK®, pode-se prever 0,1 de combinações sobre a porção alinhada da seqüência com uma pontuação similar, aleatoriamente. Por esse critério, as porções alinhadas e combinadas das seqüências de polinucleotídeos têm uma probabilidade de 95% de serem as mesmas. Para seqüências que possuem um valor E de 0,01 ou menos sobre porções alinhadas e combinadas, a probabilidade de se encontrar uma combinação aleatoriamente na base de dados GENBANK® é de 1% ou menos, usando o algoritmo de BLASTN ou FASTA.

De acordo com uma modalidade desta invenção, polinucleotídeos e polipeptídeos "variantes" desta invenção compreendem seqüências que produzem um valor E de cerca de 0,01 ou menos, quando comparadas com as seqüências de polinucleotídeos ou de polipeptídeos da presente invenção. Ou seja, um polinucleotídeo variante ou polipeptídeo é qualquer seqüência que tenha pelo menos uma probabilidade de 99% de ser a mesma que o polinucleotídeo ou polipeptídeo

da presente invenção, medida como tendo um valor E de 0,01 ou menos, usando os Algoritmos de BLASTN, FASTA ou BLASTP ajustados com os parâmetros aqui descritos. Em outras modalidades, um polinucleotídeo variante é uma seqüência

5 que possui o mesmo número, ou menos ácidos nucléicos, do que um polinucleotídeo da presente invenção que tenha uma probabilidade de pelo menos 99% de ser a mesma que o polinucleotídeo da presente invenção, medida como tendo um valor E de 0,01 ou menos, usando os algoritmos de BLASTN ou

10 FASTA ajustados com os parâmetros aqui descritos. Da mesma forma, um polipeptídeo variante é uma seqüência que possui o mesmo número, ou menos, de aminoácidos do que um polipeptídeo da presente invenção que tenha uma probabilidade de pelo menos a 99% de ser o mesmo que um

15 polipeptídeo da presente invenção, medido como tendo um valor E de 0,01 ou menos, usando o algoritmo de BLASTP ajustado com os parâmetros aqui descritos.

Como observado anteriormente, o percentual de identidade é determinado alinhando-se seqüências com o uso

20 de um dos algoritmos de BLASTN, FASTA ou BLASTP, ajustados com os parâmetros aqui descritos, e identificando-se o número de ácidos nucléicos ou aminoácidos idênticos sobre as porções alinhadas; dividindo-se o número de ácidos nucléicos ou aminoácidos idênticos pelo número total de

25 ácidos nucléicos ou aminoácidos do polinucleotídeo ou da seqüência polipeptídica da presente invenção; e, a seguir multiplicando-se por 100 para determinar o percentual de identidade. Por exemplo, um polinucleotídeo da presente invenção que possui 220 ácidos nucléicos tem um *hit* para

30 uma seqüência de polinucleotídeos na base de dados GENBANK®

que possui 520 ácidos nucléicos sobre um trecho de 23 nucleotídeos no alinhamento produzido pelo algoritmo de BLASTN usando os parâmetros aqui descritos. O *hit* de 23 nucleotídeos inclui 21 nucleotídeos idênticos, uma lacuna e um nucleotídeo diferente. O percentual de identidade do polinucleotídeo da presente invenção para o *hit* na biblioteca GENBANK® é, portanto, 21/220 vezes 100, ou seja, 9,5%. A seqüência de polinucleotídeos na base de dados GENBANK® não é, portanto, uma variante de um polinucleotídeo da presente invenção.

***iii. Identificação e isolamento de seqüências homólogas***

As seqüências de nucleotídeos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR identificadas com base na sua identidade de seqüência para as seqüências de nucleotídeos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR aqui apresentadas, ou para fragmentos e variantes destas, são englobadas pela presente invenção. Métodos, tais como PCR ou hibridização, podem ser usados para identificar seqüências a partir de uma biblioteca de cDNA ou genômica, por exemplo, que sejam substancialmente idênticas a uma seqüência desta invenção. Veja, por exemplo, Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York) e Innis, e cols. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nova York). Métodos para a construção dessas bibliotecas de cDNA e genômicas são geralmente conhecidos na técnica e também são revelados na referência acima.

Em técnicas de hibridização, as sondas de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA,

fragmentos de RNA, ou outros oligonucleotídeos, e podem consistir em toda seqüência de nucleotídeos conhecida aqui revelada, ou parte dela. Além disso, elas podem ser marcadas com um grupo detectável, por exemplo,  $^{32}\text{P}$ , ou qualquer outro marcador detectável, por exemplo, outros radioisótopos, um composto fluorescente, uma enzima, ou um co-fator de enzima. Sondas para hibridização podem ser feitas por marcação de oligonucleotídeos sintéticos, com base nas seqüências de nucleotídeos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR conhecidas aqui reveladas. Iniciadores degenerados projetados com base em nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos conservados em uma seqüência de nucleotídeos relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR conhecida, ou na seqüência de aminoácidos codificada, podem adicionalmente ser usados. A sonda de hibridização tipicamente compreende uma região da seqüência de nucleotídeos que hibridiza sob condições altamente controladas para pelo menos cerca de 10, preferivelmente cerca de 20, mais preferivelmente cerca de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 ou 400 nucleotídeos consecutivos de uma seqüência de nucleotídeos relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR da invenção, ou um fragmento ou variante desta. Para se obter hibridização específica com diversas condições, tais sondas incluem seqüências que são únicas entre seqüências de proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. Métodos para a preparação de sondas para hibridização são geralmente conhecidos na técnica, e são revelados em Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York), aqui incorporado por referência.

Em uma modalidade, toda a seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR é usada como sonda para identificar seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR e RNAs mensageiros inéditos. Em outra modalidade, a sonda é um fragmento de uma seqüência de nucleotídeos aqui revelada. Em algumas modalidades, a seqüência de nucleotídeos que hibridiza sob condições altamente controladas para a sonda pode ter comprimento de pelo menos cerca de 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1500 ou mais nucleotídeos.

Conseqüentemente, além das seqüências de nucleotídeos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR aqui reveladas, e fragmentos e variantes destas, as moléculas de ácido nucléico isolado da presente invenção também englobam seqüências de DNA homólogas identificadas e isoladas de outros organismos ou células por hibridização com seqüências inteiras ou parciais obtidas das seqüências de nucleotídeos relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR aqui reveladas, ou variantes e fragmentos destas.

Seqüências substancialmente idênticas hibridizarão entre elas sob condições altamente controladas. "Condições altamente controladas" significam condições sob as quais uma sonda hibridizará para sua seqüência-alvo em um grau detectavelmente maior do que para outras seqüências (por exemplo, pelo menos 2 vezes em relação ao nível de fundo). Geralmente, condições altamente controladas englobam aquelas condições para hibridização e lavagem sob as quais nucleotídeos que possuem pelo menos cerca de 60%, 65%, 70%, ou pelo menos cerca de 75% de identidade de seqüência

tipicamente permanecem hibridizados entre eles. Condições altamente rigorosas são conhecidas na técnica e podem ser encontradas em Ausubel e cols., eds. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Nova York). A hibridização tipicamente ocorre por menos de cerca de 24 horas, normalmente cerca de 4 a cerca de 12 horas.

Condições altamente rigorosas dependem da seqüência e diferirão em diferentes circunstâncias. Seqüências de ácidos nucleicos de comprimento total ou parciais podem ser aqui usadas para a obtenção de homólogos e ortólogos englobados pela presente invenção. "Ortólogos" significam genes derivados de um gene ancestral comum e que são encontrados em diferentes espécies como resultado de especiação. Genes encontrados em diferentes espécies são considerados ortólogos quando suas seqüências de nucleotídeos e/ou suas seqüências codificadas de proteína compartilham identidade substancial, como aqui definido em outra seção. As funções de ortólogos são freqüentemente altamente conservadas entre espécies.

Quando se utilizam sondas, condições altamente controladas serão aquelas nas quais a concentração de sal é menos do que cerca de 1,5 M de íon Na, tipicamente uma concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íon Na (ou de outros sais) em pH 7,0 a 8,3, e a temperatura é de pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo, acima de 50 nucleotídeos).

As lavagens pós-hibridização são instrumentais no controle de especificidade. Os dois fatores críticos são força iônica e temperatura da solução de lavagem final.

Para a detecção de seqüências que hibridizam para uma seqüência-alvo de comprimento total ou aproximadamente de comprimento total, a temperatura sob condições altamente controladas é selecionada para ser cerca de 5°C abaixo do ponto térmico de fusão ( $T_m$ ) para a seqüência específica em uma força iônica e um pH definidos. No entanto, condições altamente controladas englobariam temperaturas na faixa de 1°C a 20°C abaixo do  $T_m$ , dependendo do grau de controle desejado, como aqui definido em outra seção. Para híbridos DNA-DNA, o  $T_m$  pode ser determinado usando-se a equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$ ; em que M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é a percentagem de nucleotídeos guanossina e citosina no DNA, % de forma é a percentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido em pares de base. O  $T_m$  é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) na qual 50% de uma seqüência-alvo complementar hibridiza para uma sonda que combina perfeitamente.

A habilidade para detectar seqüências com graus variáveis de homologia pode ser obtida variando-se o rigor das condições de hibridização e/ou lavagem. Para seqüências-alvos que são 100% idênticas (sondagem homóloga), devem ser obtidas condições de rigor que não permitam a não combinação. Ao se permitir a ocorrência de não combinação de resíduos de nucleotídeos, seqüências com um grau menor de similaridade podem ser detectadas (sondagem heteróloga). Para cada 1% de não combinação, o  $T_m$  é reduzido cerca de 1°C; portanto, as condições de hibridização e/ou lavagem podem ser manipuladas para

permitirem hibridização de seqüências de um percentual de identidade-alvo. Por exemplo, caso sejam preferidas seqüências com  $\geq 95\%$  de identidade de seqüência, o  $T_m$  pode ser diminuído em  $10^\circ\text{C}$ . Duas seqüências de nucleotídeos 5 poderiam ser substancialmente idênticas, mas não conseguem hibridizar entre elas sob condições altamente controladas, se os polipeptídeos que codificam forem substancialmente idênticos. Essa situação ocorreria, por exemplo, se a máxima degeneração de códon do código genético fosse usada 10 para criar uma cópia de um ácido nucléico.

Condições de baixo rigor exemplares incluem hibridização com uma solução-tampão de formamida 30-35%, 1 M de NaCl, SDS 1% (sódio dodecil sulfato) a  $37^\circ\text{C}$ , e uma 15 lavagem em SSC 1X a 2X (SSC 20X = 3,0 de M NaCl/0,3 M de citrato trissódico) a 50 a  $55^\circ\text{C}$ . Condições de rigor moderado exemplares incluem hibridização em formamida 40 a 45%, 1,0 M de NaCl, SDS 1% a  $37^\circ\text{C}$  e uma lavagem em SSC 0,5X a 1X a 55 a  $60^\circ\text{C}$ . Condições de alto rigor exemplares incluem hibridização em formamida 50%, 1 M de NaCl, SDS 1% 20 a  $37^\circ\text{C}$  e uma lavagem em SSC 0,1X a 60 a  $65^\circ\text{C}$ . Opcionalmente, tampões de lavagem podem compreender cerca de 0,1% a cerca de 1% de SDS. A duração da hibridização é geralmente menos de cerca de 24 horas, normalmente cerca de 4 a cerca de 12 horas. Um guia detalhado para a 25 hibridização de ácidos nucléicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acids Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nova York); e Ausubel e cols., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 30 (Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova York). Veja

*Sambrook e cols. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York).*

Em uma abordagem de PCR, iniciadores de oligonucleotídeos podem ser projetados para uso em reações de PCR para amplificar seqüências de DNA correspondentes a partir de cDNA ou DNA genômico extraído de qualquer organismo de interesse. Iniciadores de PCR têm preferivelmente comprimento de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos e, principalmente, comprimento de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos. Métodos para o projeto de iniciadores de PCR e clonagem por PCR são geralmente conhecidos na técnica e são discutidos em *Sambrook e cols. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York)*. Veja também *Innis e cols., eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Nova York)*; *Innis e Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, Nova York)*; e *Innis e Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press, Nova York)*. Métodos de PCR conhecidos incluem, sem limitação, métodos que utilizam iniciadores pareados, iniciadores abrigados, iniciadores únicos específicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene-específicos, iniciadores vetor-específicos, iniciadores parcialmente-não combinados, e semelhantes.

#### *iv. Seqüências de nucleotídeos anti-senso*

A presente invenção também engloba moléculas de ácido nucléico anti-senso, ou seja, moléculas que são complementares a um ácido nucléico senso que codifica uma

proteína, por exemplo, complementares à fita codificadora de uma molécula de cDNA de fita dupla, ou complementares a uma seqüência de mRNA. Conseqüentemente, um ácido nucléico anti-senso pode se ligar por hidrogênio a um ácido nucléico 5 senso. O ácido nucléico anti-senso pode ser complementar a toda uma fita codificadora relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, ou a apenas uma porção desta, por exemplo, toda ou parte da região codificadora de proteína (ou quadro aberto de leitura). Uma molécula de ácido 10 nucléico anti-senso pode ser anti-senso para uma região não codificadora da fita codificadora de uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. As regiões não codificadoras são as seqüências 5' e 3' que flanqueiam a região codificadora e 15 não são traduzidas em aminoácidos. Seqüências de nucleotídeos anti-senso são úteis na interrupção da expressão do gene-alvo. Podem ser usadas construções anti-senso que possuem 70%, 80%, ou 85% de identidade de seqüência para a seqüência correspondente.

20 Considerando a seqüência da fita codificadora que codifica uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR aqui revelada (por exemplo, Ids. de Seq. ímpares N<sup>os</sup>: 1-21, 33, 35, ou 37), podem ser projetados ácidos nucléicos anti-senso da invenção de acordo com as regras de 25 pareamento de bases de Watson e Crick. A molécula de ácido nucléico anti-senso pode ser complementar a toda a região codificadora do mRNA relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR, mas, mais preferivelmente, é um oligonucleotídeo que só é anti-senso para uma porção da região codificadora ou 30 não codificadora do mRNA relacionado ao AI-2 ou relacionado

à AAR. Um oligonucleotídeo anti-senso pode ter, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 nucleotídeos de comprimento, ou ele pode ter 100, 200 ou mais nucleotídeos de comprimento. Um ácido nucléico anti-senso da invenção pode ser construído com a utilização de procedimentos de síntese química e ligação enzimática conhecidos na técnica.

Uma molécula de ácido nucléico anti-senso da invenção pode ser uma molécula  $\alpha$ -anomérica de ácido nucléico (Gaultier e cols. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 6.625-6.641). A molécula de ácido nucléico anti-senso também pode compreender um 2'-o-metilribonucleotídeo (Inoue e cols. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 6.131-6.148) ou um análogo quimérico de RNA-DNA (Inoue e cols. (1987) *FEBS Lett.* 215: 327-330). A invenção também engloba ribozimas, que são moléculas catalíticas de RNA com atividade de ribonuclease que são capazes de clivar um ácido nucléico de fita simples como, por exemplo, um mRNA, para as quais possuem uma região complementar. A invenção também engloba moléculas de ácido nucléico que formam estruturas helicoidais triplas. Veja geralmente Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27; e Maher (1992) *Bioassays* 14(12): 807.

Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucléico da invenção podem ser modificadas na porção de base, porção de açúcar ou na estrutura central de fosfato para melhorar, por exemplo, a estabilidade, hibridização ou solubilidade da molécula. Como aqui usados, os termos "ácidos nucléicos peptídicos" ou "PNAs" referem-se aos miméticos de ácido nucléico, por exemplo, miméticos de DNA, nos quais a

estrutura central de desoxirribose fosfato é substituída por uma estrutura central pseudopeptídica, e só são retidas quatro nucleobases naturais. Demonstrou-se que a estrutura central neutra de PNAs permite a hibridização específica para DNA e RNA sob condições de baixa força iônica. A síntese de oligômeros de PNA pode ser realizada com a utilização de protocolos padronizados de síntese peptídica de fase sólida, como descrito, por exemplo, em Hyrup e cols. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe e cols. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14.670.

Em outra modalidade, PNAs de uma molécula relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR podem ser modificados, por exemplo, para aumentar sua estabilidade, especificidade ou captação celular, anexando-se grupos lipofílicos ou outros grupos auxiliares ao PNA, pela formação de quimeras PNA-DNA, ou com o uso de lipossomos ou outras metodologias de liberação de fármacos conhecidas na técnica. A síntese de quimeras PNA-DNA pode ser efetuada como descrito em Hyrup (1996) *supra*; Finn e cols. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3.357-63; Mag e cols. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 5.973; e Peterson e cols. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1.119.

#### **v. Proteínas de fusão**

A invenção também inclui proteínas quiméricas ou de fusão relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR. Uma "proteína quimérica" ou "proteína de fusão" relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR compreende um polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR ligado operacionalmente a um polipeptídeo não relacionado ao AI-2 ou não relacionado à AAR. Um polipeptídeo "relacionado ao

AI-2" ou "relacionado à AAR" refere-se a um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos que corresponde a um polipeptídeo que esteja envolvido na produção de AI-2 ou na AAR, enquanto um polipeptídeo "não relacionado ao AI-2" ou "não relacionado à AAR" refere-se a um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma proteína que não seja substancialmente idêntica a um polipeptídeo que esteja envolvido na produção de AI-2 ou na AAR, e que seja derivado do mesmo organismo ou de um organismo diferente. Dentro de uma proteína de fusão relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, o polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR pode corresponder a toda ou a uma porção de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, incluindo preferivelmente pelo menos uma porção biologicamente ativa de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Dentro da proteína de fusão, o termo "ligado operacionalmente" visa a indicar que o polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR e o polipeptídeo não relacionado ao AI-2 ou não relacionado à AAR estão fundidos estruturalmente entre si. O polipeptídeo não relacionado ao AI-2 ou não relacionado à AAR pode ser fundido ao N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR.

A expressão das seqüências de codificação ligadas resulta em duas seqüências de aminoácidos heterólogas ligadas que formam a proteína de fusão. A seqüência transportadora (o polipeptídeo não relacionado ao AI-2 ou não relacionado à AAR) pode codificar um polipeptídeo transportador que potencializa ou aumenta a expressão da proteína de fusão no hospedeiro bacteriano. A porção da

proteína de fusão codificada pela seqüência transportadora, ou seja, o polipeptídeo transportador, pode ser um fragmento de proteína, uma porção funcional inteira ou uma seqüência de proteína inteira. A região ou o polipeptídeo transportador pode adicionalmente ser projetado para ser usado na purificação da proteína de fusão, tanto com anticorpos quanto com purificação por afinidade específica para aquele polipeptídeo transportador. Da mesma forma, as propriedades físicas do polipeptídeo transportador podem ser exploradas para permitir a purificação seletiva da proteína de fusão.

Polipeptídeos transportadores específicos de interesse incluem superóxido dismutase (SOD), proteína de ligação de maltose (MBP), glutational-S-transferase (GST), um tag de histidina N-terminal (His), e semelhantes. Essa lista não tem a intenção de ser limitante, uma vez que qualquer polipeptídeo transportador que potencialize a expressão da proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR como uma proteína de fusão pode ser usado nos métodos da invenção.

Em uma modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão de GST relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR na qual as seqüências relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR estão fundidas ao C-terminal das seqüências de GST. Em outra modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão de imunoglobulina relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR na qual toda ou parte de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR está fundida a seqüências derivadas de um membro da família da proteína de imunoglobulina. As proteínas de fusão de imunoglobulina relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR da invenção

podem ser usadas como imunógenos para produzirem anticorpos anti-proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR em um indivíduo, para purificar ligantes relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR, e em ensaios de rastreamento para a  
5 identificação de moléculas que inibem a interação de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR com um ligante relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR.

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que o polipeptídeo transportador específico é escolhido tendo em  
10 mente o esquema de purificação. Por exemplo, marcadores His, GST, e proteína de ligação de maltose representam polipeptídeos transportadores que possuem colunas de afinidade facilmente disponíveis às quais podem ser ligados e eluídos. Dessa forma, quando o polipeptídeo transportador  
15 for um marcador His N-terminal, por exemplo, hexahistidina (marcador His<sub>6</sub>), a proteína de fusão relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR poderá ser purificada usando uma matriz que compreende uma resina quelante de metal, por exemplo, ácido níquel nitrilotriacético (Ni-NTA), ácido níquel  
20 iminodiacético (Ni-IDA) e resina contendo cobalto (Co-resina). Veja, por exemplo, Steinert e cols. (1997) *QIAGEN News* 4: 11-15, aqui incorporado por referência em sua totalidade. Quando o polipeptídeo transportador for GST, a proteína de fusão relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR  
25 poderá ser purificada usando uma matriz que compreende glóbulos de glutationa-agarose (Sigma ou Pharmacia Biotech); quando o polipeptídeo transportador for uma proteína de ligação de maltose (MBP), a proteína de fusão relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR poderá ser  
30 purificada usando uma matriz que compreende uma resina de

agarose derivatizada com amilose.

De preferência, uma proteína quimérica ou de fusão da invenção é produzida por técnicas padronizadas de DNA recombinante. Por exemplo, fragmentos de DNA que codificam as diferentes seqüências polipeptídicas podem ser ligados juntos estruturalmente, ou o gene de fusão pode ser sintetizado, por exemplo, com sintetizadores automatizados de DNA. Alternativamente, a amplificação por PCR dos fragmentos gênicos pode ser realizada com o uso de iniciadores de ancoragem que dão origem a protuberâncias complementares entre dois fragmentos gênicos consecutivos, os quais podem subsequenteemente ser endurecidos e re-amplificados para gerar uma seqüência gênica quimérica (veja, por exemplo, Ausubel e cols., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova York). Além disso, um ácido nucléico que codifica uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR pode ser clonado em um vetor de expressão disponível comercialmente de forma a ser ligado estruturalmente a uma porção de fusão existente.

O vetor de expressão da proteína de fusão é tipicamente projetado para facilitar a remoção do polipeptídeo transportador, permitindo que a proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR retenha a atividade biológica nativa a ela associada. Métodos para a clivagem de proteínas de fusão são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Ausubel e cols., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.). A clivagem química da proteína de fusão pode ser obtida com reagentes como brometo de cianogênios, 2-(2-

nitrofenilsulfenil)-3-metil-3'-bromoindolenina, hidroxilamina, ou pH baixo. A clivagem química é freqüentemente obtida sob condições desnaturantes para clivar proteínas de fusão de outra forma insolúveis.

5 Quando for desejada a separação do polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR do polipeptídeo transportador e um sítio de clivagem na junção entre esses polipeptídeos fundidos não for de ocorrência natural, a construção de fusão poderá ser projetada para conter um

10 sítio de clivagem de protease específico para facilitar a clivagem enzimática e a remoção do polipeptídeo transportador. Dessa forma, uma seqüência ligadora que compreende uma seqüência codificadora para um peptídeo que

15 tenha um sítio de clivagem específico para uma enzima de interesse pode ser fundida estruturalmente entre a seqüência codificadora para o polipeptídeo transportador (por exemplo, MBP, GST, SOD ou um marcador His N-terminal) e a seqüência codificadora para o polipeptídeo relacionado

20 ao AI-2 ou relacionado à AAR. Enzimas adequadas que possuem especificidade para sítios de clivagem incluem, sem limitação, fator Xa, trombina, enteroquinase, remina, colagenase e protease do vírus *etch* do tabaco (TEV). Sítios de clivagem para essas enzimas são bem conhecidos na

técnica. Dessa forma, por exemplo, quando fator Xa for

25 utilizado para clivar o polipeptídeo transportador do polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR, a construção de fusão poderá ser projetada para compreender uma seqüência ligadora que codifica um sítio de clivagem

30 sensível ao fator Xa, por exemplo, a seqüência IEGR (veja, por exemplo, Nagai e Thøgersen (1984) *Nature* 309: 810-812,

Nagai e Thøgersen (1987) *Meth. Enzymol.* 153: 461-481 e Pryor e Leiting (1997) *Protein Expr. Purif.* 10(3): 309-319, aqui incorporados por referência). Quando trombina for usada para clivar o polipeptídeo transportador do polipeptídeo relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR, a construção de fusão poderá ser projetada para compreender uma seqüência ligadora que codifica um sítio de clivagem sensível à trombina, por exemplo, a seqüência LVPRGS ou VIAGR (veja, por exemplo, Pryor e Leiting (1997) *Protein Expr. Purif.* 10(3): 309-319, e Hong e cols. (1997) *Chin. Med. Sci. J.* 12(3): 143-147, respectivamente, aqui incorporados por referência). Sítios de clivagem para TEV protease são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, os sítios de clivagem descritos na Patente U.S. N° 5.532.142, aqui incorporada por referência em sua totalidade. Veja também a discussão em Ausubel e cols., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), Capítulo 16.

#### **vi. Anticorpos**

Um polipeptídeo isolado da presente invenção pode ser usado como um imunógeno para a geração de anticorpos que se ligam especificamente às proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, ou estimular a produção de anticorpos contra polipeptídeos relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR *in vivo*. A proteína de comprimento total relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR pode ser usada como um imunógeno ou, alternativamente, fragmentos peptídicos antigênicos de proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, como aqui descritas, podem ser usados. O peptídeo antigênico de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR

compreende pelo menos 8, preferivelmente 10, 15, 20 ou 30 resíduos de aminoácidos da seqüência de aminoácidos mostrada nos Ids. de Seq. pares N<sup>os</sup>: 2-22, 34, 36 ou 38, e engloba um epitopo de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR, de tal forma que um anticorpo desenvolvido contra o peptídeo forme um complexo imune específico com a proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR. Epitopos preferidos englobados pelo peptídeo antigênico são regiões de uma proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR que estão localizadas na superfície da proteína, por exemplo, regiões hidrofílicas.

#### *vii. Ensaios*

São revelados ensaios diagnósticos para detectar a expressão das moléculas de polipeptídeos e/ou de ácido nucléico reveladas, além de sua atividade apresentada em uma amostra. Um método exemplar para detecção da presença ou ausência de um ácido nucléico ou proteína revelada que compreende o polipeptídeo revelado em uma amostra envolve a obtenção de uma amostra de um produto alimentício/laticínio/de ração, cultura de partida (mãe, de origem, massa/conjunto, concentrada, seca, liofilizada, congelada), produto alimentício/laticínio/de ração cultivado, suplemento dietético, fermentado de bioprocessamento ou de um indivíduo que tenha ingerido um material probiótico, e contato da amostra com um composto ou um agente capaz de detectar os polipeptídeos ou ácidos nucléicos revelados (por exemplo, um mRNA ou DNA genômico que compreende o ácido nucléico revelado ou fragmento deste), de tal forma que a presença da seqüência revelada seja detectada na amostra. Os resultados obtidos com uma

amostra do alimento, suplemento, cultura, produto ou indivíduo podem ser comparados com os resultados obtidos com uma amostra de uma cultura, produto ou indivíduo de controle.

5 Um agente para a detecção do mRNA ou DNA genômico que compreende uma seqüência de nucleotídeos revelada é uma sonda marcada de ácido nucléico capaz de hibridizar para a seqüência de nucleotídeos revelada do mRNA ou DNA genômico. A sonda de ácido nucléico pode ser, por exemplo, uma

10 molécula de ácido nucléico revelada, por exemplo, o ácido nucléico dos Ids. de Seq. ímpares N<sup>os</sup>: 1-21, 33, 35, 37, ou uma porção deste, por exemplo, uma molécula de ácido nucléico com comprimento de pelo menos 15, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 ou

15 mais nucleotídeos, e suficiente para hibridizar especificamente sob condições altamente controladas para o mRNA ou DNA genômico que compreende a seqüência de ácidos nucléicos revelada. São aqui descritas outras sondas adequadas para uso nos ensaios diagnósticos da invenção.

20 Um agente para a detecção de uma proteína que compreende uma seqüência polipeptídica revelada é um anticorpo capaz de se ligar ao polipeptídeo revelado, preferivelmente um anticorpo com um marcador detectável. Anticorpos podem ser policlonais ou, mais preferivelmente,

25 monoclonais. Pode ser usado um anticorpo intacto ou um fragmento deste (por exemplo, Fab ou F(abN)<sub>2</sub>). O termo "marcado", com relação à sonda ou anticorpo, visa a englobar a marcação direta da sonda ou do anticorpo por acoplamento (ou seja, ligação física) de uma substância

30 detectável à sonda ou anticorpo, além da marcação indireta

da sonda ou do anticorpo por reatividade com outro reagente que seja marcado diretamente. Exemplos de marcação indireta incluem a detecção de um anticorpo primário com o uso de um anticorpo secundário marcado e marcação terminal de uma sonda de DNA com biotina, de forma que ela possa ser detectada com estreptavidina marcada por fluorescência.

O termo "amostra" visa a incluir tecidos, células e líquidos biológicos presentes ou isolados de um indivíduo, além de células de culturas de partida ou produtos alimentícios que possuem tais culturas, ou derivados do uso de tais culturas. Ou seja, o método de detecção da invenção pode ser usado para detectar mRNA, proteína ou DNA genômico que compreende uma seqüência revelada em uma amostra, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Técnicas *in vitro* para detecção de mRNA que compreendem uma seqüência revelada incluem hibridizações *Northern* e hibridizações *in situ*. Técnicas *in vitro* para detecção de uma proteína que compreendem um polipeptídeo revelado incluem ensaios imunoabsorventes ligados à enzima (ELISAs), *Western blots*, imunoprecipitações e imunofluorescência. Técnicas *in vitro* para detecção de DNA genômico que compreendem as seqüências de nucleotídeos reveladas incluem hibridizações *Southern*. Além disso, técnicas *in vivo* para detecção de uma proteína que compreendem um polipeptídeo revelado incluem a introdução em um indivíduo de um anticorpo marcado contra o polipeptídeo revelado. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização em um indivíduo pode ser detectada por técnicas-padrão de imagem.

Em uma modalidade, a amostra contém proteína moléculas

de um indivíduo de teste que consumiu um material probiótico. Alternativamente, a amostra pode conter mRNA ou DNA genômico de uma cultura de partida.

A invenção também engloba kits para a detecção da  
5 presença de ácidos nucleicos ou proteínas reveladas que compreendem polipeptídeos revelados em uma amostra. Tais kits podem ser usados para determinar se um micróbio que expressa um polipeptídeo da invenção específico está presente em um produto alimentício ou cultura de partida,  
10 ou em um indivíduo que consumiu um material probiótico. Por exemplo, o kit pode compreender um composto ou agente marcado capaz de detectar um polipeptídeo ou mRNA revelado em uma amostra, e meios para a determinação da quantidade do polipeptídeo revelado na amostra (por exemplo, um  
15 anticorpo que reconhece o polipeptídeo revelado ou uma sonda de oligonucleotídeo que se liga ao DNA que codifica um polipeptídeo revelado, por exemplo, Ids. de Seq. ímpares N<sup>os</sup>: 1-21, 33, 35, ou 37). Os kits também podem incluir instruções que detalham o uso de tais compostos.

20 Para kits baseados em anticorpos, o kit pode compreender, por exemplo: (1) um primeiro anticorpo (por exemplo, anexado a um suporte sólido) que se liga a um polipeptídeo revelado; e, opcionalmente, (2) um segundo anticorpo diferente que se liga ao polipeptídeo revelado ou  
25 ao primeiro anticorpo, e está conjugado a um agente detectável. Para kits baseados em oligonucleotídeos, o kit pode compreender, por exemplo: (1) um oligonucleotídeo, por exemplo, um oligonucleotídeo marcado de forma detectável, que hibridiza para uma seqüência de ácidos nucleicos  
30 revelada ou (2) um par de iniciadores úteis na amplificação

de uma molécula de ácido nucléico revelada.

O kit também pode compreender, por exemplo, um agente de tamponamento, um conservante ou um agente estabilizante de proteínas. O kit também pode compreender componentes  
5 necessários para a detecção do agente detectável (por exemplo, uma enzima ou um substrato). O kit também pode conter uma amostra de controle ou uma série de amostras de controle que podem ser testadas e comparadas com a amostra de teste contida. Cada componente do kit está normalmente  
10 embalado em um recipiente individual e todos os vários recipientes estão dentro de uma única embalagem, juntamente com instruções para uso.

Em uma modalidade, o kit compreende diversas sondas em formato de arranjo, tais como aquelas descritas, por  
15 exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.412.087 e 5.545.531, e Publicação Internacional N<sup>o</sup> WO 95/00530, aqui incorporadas por referência. Sondas para uso no arranjo podem ser sintetizadas diretamente sobre a superfície do arranjo, como revelado na Publicação Internacional N<sup>o</sup> WO 95/00530,  
20 ou antes da imobilização sobre a superfície do arranjo (Gait, ed. (1984), *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach* IRL Press Oxford, Inglaterra). As sondas podem ser imobilizadas sobre a superfície com a utilização de técnicas bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica,  
25 tais como aquelas descritas na Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.412.087. As sondas podem ser uma seqüência de ácido nucléico ou de peptídeos, preferivelmente purificados, ou um anticorpo.

Os arranjos podem ser usados para rastrear organismos, amostras ou produtos em busca de diferenças em seu teor  
30 genômico, de cDNA, polipeptídico ou de anticorpo, incluindo

a presença ou ausência de seqüências ou proteínas específicas, bem como a concentração desses materiais. A ligação a uma sonda de captura é detectada, por exemplo, pelo sinal gerado por um marcador anexado à molécula de ácido nucléico que compreende a seqüência de ácidos nucléicos revelada, um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácidos revelada ou um anticorpo. O método pode incluir o contato da molécula que compreende o ácido nucléico, polipeptídeo ou anticorpo revelado com um primeiro arranjo que possui várias sondas de captura e um segundo arranjo que possui um conjunto diferente de sondas de captura. Os resultados de cada hibridização podem ser comparados para analisar as diferenças na expressão entre uma primeira e uma segunda amostras. O primeiro conjunto de sondas de captura pode ser de uma amostra de controle, por exemplo, uma bactéria de ácido láctico do tipo selvagem, ou indivíduo de controle, por exemplo, um alimento, suplemento dietético, amostra de cultura de partida ou um líquido biológico. O segundo conjunto de sondas de captura pode ser de uma amostra experimental, por exemplo, uma bactéria de ácido láctico do tipo mutante, ou de um indivíduo que tenha consumido um material probiótico, por exemplo, uma amostra de cultura de partida, ou um fluido biológico.

Esses ensaios podem ser especialmente úteis em procedimentos de seleção microbiana e de controle de qualidade nos quais a detecção de materiais indesejados é essencial. A detecção de seqüências de nucleotídeos ou polipeptídeos específicos também pode ser útil na determinação da composição genética de alimentos, produtos de fermentação ou micróbios industriais, ou micróbios

presentes no sistema digestivo de animais ou seres humanos que tenham consumido probióticos.

Ensaaios para detectar a expressão das moléculas reveladas de polipeptídeos e/ou ácidos nucleicos também podem incluir a detecção e/ou quantificação de AI-2. Métodos para a detecção de AI-2 são aqui descritos em outra seção. Ensaaios para medir aderência, por exemplo, em resposta às condições adaptáveis de adesão, também podem ser usados para avaliar a expressão dos polipeptídeos da presente invenção. Tais métodos também são aqui descritos em outra seção.

### III. Vetores de expressão recombinante e células hospedeiras

As moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem ser incluídas em vetores, preferivelmente vetores de expressão. "Vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Vetores de expressão incluem uma ou mais seqüências reguladoras, e dirigem a expressão de genes aos quais estão ligadas operacionalmente. O termo "ligada operacionalmente" significa que a seqüência de nucleotídeos de interesse está ligada à(s) seqüência(s) reguladora(s) de tal forma que a expressão da seqüência de nucleotídeos seja permitida (por exemplo, em um sistema *in vitro* de transcrição/tradução ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "seqüência reguladora" visa a incluir promotores controláveis da transcrição, operadores, intensificadores, finalizadores de transcrição e outros elementos de controle da expressão, tais como seqüências de controle da tradução

(por exemplo, seqüência de consenso Shine-Dalgarno, códons de iniciação e terminação). Essas seqüências reguladoras diferirão, por exemplo, dependendo da célula hospedeira que estiver sendo utilizada.

5 Os vetores podem ser replicados autonomamente em uma célula hospedeira (vetores episomais), ou podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira, e replicados juntos com o genoma do hospedeiro (vetores mamíferos não episomais). Vetores de integração tipicamente contêm pelo

10 menos uma seqüência homóloga ao cromossomo bacteriano que permite a ocorrência de recombinação entre o DNA homólogo no vetor e o cromossomo bacteriano. Vetores de integração também podem compreender seqüências de bacteriófago ou de transposon. Vetores episomais, ou plasmídeos, são alças

15 circulares de DNA de fita dupla nas quais segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Plasmídeos capazes de manutenção estável em um hospedeiro são geralmente a forma preferida de vetores de expressão quando se utilizam técnicas de DNA recombinante.

20 As construções ou os vetores de expressão englobados na presente invenção compreendem uma construção de ácido nucléico da invenção em uma forma adequada para expressão do ácido nucléico em uma célula hospedeira. A expressão em células hospedeiras procarióticas é englobada na presente

25 invenção. Será observado por aqueles habilitados na técnica que o projeto do vetor de expressão pode depender de fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, do nível de expressão de proteína desejado etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser

30 introduzidos em células hospedeiras para, desse modo,

produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados por ácidos nucleicos, como aqui descritos (por exemplo, proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, formas mutantes de proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR, proteínas de fusão etc.).

Seqüências reguladoras incluem aquelas que dirigem a expressão constitutiva de uma seqüência de nucleotídeos, bem como aquelas que dirigem a expressão indutível da seqüência de nucleotídeos somente sob certas condições ambientais. Um promotor bacteriano é qualquer seqüência de DNA capaz de se ligar à RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição abaixo (3') de uma seqüência codificadora (por exemplo, gene estrutural) em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação de transcrição, que é normalmente colocada proximal à extremidade 5' da seqüência codificadora. Essa região de iniciação de transcrição tipicamente inclui um sítio de ligação de RNA polimerase e um sítio de iniciação de transcrição. Um promotor bacteriano também pode ter um segundo domínio chamado um operador, que pode se sobrepor a um sítio de ligação de RNA polimerase adjacente no qual começa a síntese de RNA. O operador permite a transcrição regulada negativa (indutível), uma vez que uma proteína do gene repressor pode se ligar ao operador e, dessa forma, inibir a transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos reguladores negativos como, por exemplo, o operador. Além disso, a regulação positiva pode ser obtida por uma seqüência de ligação da proteína ativadora de genes, a qual, se presente, é

normalmente proximal (5') à seqüência de ligação de RNA polimerase.

Um exemplo de uma proteína ativadora de genes é a proteína ativadora de catabólito (CAP), que ajuda a iniciar a transcrição do operon lac em *Escherichia coli* (Raibaud e cols. (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173). A expressão regulada pode, portanto, ser tanto positiva quanto negativa e, assim, aumentar ou reduzir a transcrição. Outros exemplos de elementos reguladores positivos e negativos são bom conhecidos na técnica. Vários promotores que podem ser incluídos no sistema de expressão de proteínas incluem, sem limitação, um promotor híbrido T7/lacO, um promotor trp, um promotor T7, um promotor lac e um promotor bacteriófago lambda. Qualquer promotor adequado pode ser usado para a prática da presente invenção, incluindo o promotor nativo ou um promotor heterólogo. Promotores heterólogos podem ser constitutivamente ativos ou indutíveis. Um exemplo não limitante de um promotor heterólogo é apresentado na Patente U.S. N° 6.242.194 para Kullen e Klaenhammer.

Seqüências que codificam enzimas da via metabólica fornecem seqüências promotoras particularmente úteis. Exemplos incluem seqüências promotoras derivadas de enzimas que metabolizam açúcar, como galactose, lactose (lac) (Chang e cols. (1987) *Nature* 198: 1.056) e maltose. Exemplos adicionais incluem seqüências promotoras derivadas de enzimas biossintéticas, por exemplo, triptofano (trp) (Goeddel e cols. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8: 4.057; Yelverton e cols. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 731; Patente U.S. N° 4.738.921; Publicações EPO N°s 36.776 e 121.775). O sistema promotor beta-lactamase (bla) (Weissmann, (1981)

"The Cloning of Interferon and Other Mistakes", em *Interferon 3* (ed. I. Gresser); PL bacteriófago lambda (Shimatake e cols. (1981) *Nature* 292: 128); o promotor arabinose-indutível araB (Patente U.S. N° 5.028.530); e sistemas promotores T5 (Patente U.S. N° 4.689.406) também fornecem seqüências promotoras úteis. Veja também Balbas (2001) *Mol. Biotech.* 19: 251-267, em que são discutidos sistemas de expressão de *E. coli*.

Além disso, promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também funcionam como promotores bacterianos. Por exemplo, seqüências de ativação da transcrição de um promotor bacteriano ou de bacteriófago podem ser unidas com as seqüências de operon de outro promotor bacteriano ou de bacteriófago, criando um promotor híbrido sintético (Patente U.S. N° 4.551.433). Por exemplo, os promotores tac (Amann e cols. (1983) *Gene* 25: 167; de Boer e cols. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 21) e trc (Brosius e cols. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 3.539-3.541) são promotores híbridos trp-lac compostos tanto pelo promotor trp quanto por seqüências operon de lac que são regulados pelo repressor lac. O promotor tac tem a característica adicional de ser uma seqüência reguladora induzível. Dessa forma, por exemplo, a expressão de uma seqüência codificadora ligada operacionalmente ao promotor tac pode ser induzida em uma cultura de células por adição de isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactosida (IPTG). Além disso, um promotor bacteriano pode incluir promotores de ocorrência natural de origem não bacteriana que possuem a habilidade de se ligar à RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição. Um promotor de ocorrência natural de origem

não bacteriana também pode ser acoplado a uma RNA polimerase compatível para produzir níveis elevados de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema bacteriófago de T7 RNA polimerase/promotor é um exemplo de um sistema de promotor acoplado (Studier e cols. (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; Tabor e cols. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1.074). Além disso, um promotor híbrido pode ser composto por um promotor de bacteriófago e uma região operadora de *E. coli* (Publicação EPO N° 267,851).

10 O vetor pode adicionalmente conter um gene que codifica o repressor (ou indutor) para aquele promotor. Por exemplo, um vetor indutível da presente invenção pode regular a transcrição do operador Lac (LacO) por expressão do gene que codifica a proteína repressora LacI. Outros  
15 exemplos incluem o uso do gene *lexA* para regular a expressão de *pRecA*, e o uso de *trpO* para regular *ptrp*. Alelos de tais genes que aumentam a extensão da repressão (por exemplo, *lacIq*) ou que modificam a forma de indução (por exemplo, *lambda CI857*, que torna *lambda pL*  
20 termicamente indutível ou *lambda CI+*, que torna *lambda pL* quimicamente indutível) podem ser empregados.

Além de uma seqüência promotora funcional, um sítio de ligação de ribossomo eficiente também é útil para a expressão da construção de fusão. Em procariotas, o sítio  
25 de ligação de ribossomo é denominado seqüência Shine-Dalgarno (SD), e inclui um códon de iniciação (ATG) e uma seqüência com comprimento de 3-9 nucleotídeos localizada 3-11 nucleotídeos acima do códon de iniciação (Shine e cols. (1975) *Nature* 254: 34). Acredita-se que a seqüência SD  
30 promova a ligação de mRNA ao ribossomo pelo pareamento de

bases entre a seqüência SD e a extremidade 3' de 16S rRNA bacteriana (Steitz e cols. (1979) "Genetic Signals and Nucleotide Sequences in Messenger RNA", em *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R. F. Goldberger, Plenum Press, NY)).

Proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR também podem ser secretadas pela célula criando-se moléculas quiméricas de DNA que codificam uma proteína que compreende um fragmento de uma seqüência peptídica sinalizadora que permite a secreção dos polipeptídeos relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR em bactérias (Patente U.S. N° 4.336.336). O fragmento de seqüência sinalizadora tipicamente codifica um peptídeo sinalizador composto por aminoácidos hidrofóbicos que dirigem a secreção da proteína pela célula. A proteína é secretada nos meios de crescimento (bactérias gram-positivas) ou no espaço periplásmico, localizada entre a membrana interna e externa da célula (bactérias gram-negativas). De preferência, há sítios de processamento, que podem ser clivados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, codificados entre o fragmento do peptídeo sinalizador e a proteína relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR.

O DNA que codifica seqüências sinalizadoras adequadas pode ser derivado de genes para proteínas bacterianas secretadas, tais como o gene da proteína da membrana externa de *E. coli* (ompA) (Masui e cols. (1983) *FEBS Lett.* 151(1): 159-164; Ghrayeb e cols. (1984) *EMBO J.* 3: 2.437-2.442) e a seqüência sinalizadora de fosfatase alcalina de *E. coli* (phoA) (Oka e cols. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7.212). Outros sinais procarióticos incluem, por

exemplo, a seqüência sinalizadora de penicilinase, Ipp, ou líderes de enterotoxina II termoestável.

Bactérias como *L. acidophilus* geralmente utilizam o códon de partida ATG, que especifica o aminoácido metionina (que é modificado para N-formilmetionina em organismos procarióticos). Bactérias também reconhecem códons de partida alternativos, tais como os códons GTG e TTG, que codificam valina e leucina, respectivamente. Quando eles são usados como o códon de iniciação, no entanto, esses 5  
10  
15  
20  
25  
30  
códons dirigem a incorporação de metionina em vez do aminoácido que eles normalmente codificam. *Lactobacillus acidophilus* NCFM reconhece esses sítios de partida alternativos e incorpora metionina como o primeiro aminoácido.

Tipicamente, seqüências de terminação da transcrição reconhecidas por bactérias são regiões reguladoras localizadas 3' em relação ao códon de parada de tradução e, dessa forma, junto com o promotor, flanqueiam a seqüência codificadora. Essas seqüências dirigem a transcrição de um mRNA que pode ser traduzido no polipeptídeo codificado pelo DNA. Seqüências de terminação da transcrição freqüentemente incluem seqüências de DNA (de cerca de 50 nucleotídeos) que são capazes de formar estruturas em grampo (*stem loop*) que ajudam na terminação da transcrição. Exemplos incluem 20  
25  
30  
seqüências de terminação da transcrição derivadas de genes com promotores fortes como, por exemplo, o gene *trp* em *E. coli*, além de outros genes biossintéticos.

Os vetores de expressão terão diversos sítios de restrição para inserção da seqüência relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR de forma que ela esteja sob regulação de

transcrição pelas regiões reguladoras. Genes de marcador selecionável que asseguram a manutenção do vetor na célula também podem ser incluídos no vetor de expressão. Marcadores selecionáveis preferidos incluem aqueles que conferem resistência a fármacos, tais como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina (neomicina) e tetraciclina (Davies e cols. (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 469). Marcadores selecionáveis também podem permitir que uma célula cresça em meio mínimo, ou na presença de metabólitos tóxicos, e podem incluir genes biossintéticos, tais como aqueles nas vias biossintéticas de histidina, triptofano e leucina.

Como aqui usado, o termo "heterólogo", em relação a uma seqüência, é uma seqüência que se origina de uma espécie estranha ou, se da mesma espécie, é substancialmente modificada em relação à sua forma nativa em composição e/ou lócus genômico por intervenção humana deliberada. Por exemplo, um promotor ligado operacionalmente a um polinucleotídeo heterólogo é de uma espécie diferente da espécie da qual o polinucleotídeo foi derivado ou, se da mesma espécie ou de uma espécie homóloga, um ou ambos são substancialmente modificados em relação à sua forma original e/ou lócus genômico, ou o promotor não é o promotor nativo para o polinucleotídeo ligado operacionalmente.

As regiões reguladoras podem ser nativas (homólogas), ou podem ser estranhas (heterólogas) à célula hospedeira e/ou à seqüência de nucleotídeos da invenção. As regiões reguladoras também podem ser naturais ou sintéticas. Quando a região for "estranha" ou "heteróloga" à célula

hospedeira, isso significará que a região não é encontrada na célula nativa na qual a região é introduzida. Quando a região for "estranha" ou "heteróloga" à seqüência de nucleotídeos relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR da invenção, isso significará a região não é a região nativa ou de ocorrência natural para a seqüência de nucleotídeos relacionada ao AI-2 ou relacionada à AAR ligada operacionalmente da invenção. Por exemplo, a região pode ser derivada de fago. Embora seja preferível expressar as seqüências com a utilização de regiões reguladoras heterólogas, regiões nativas podem ser usadas. Espera-se que tais construções, em alguns casos, alterem os níveis de expressão de proteínas relacionadas ao AI-2 ou relacionadas à AAR na célula hospedeira. Dessa forma, o fenótipo da célula hospedeira poderia ser alterado.

Na preparação do cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados de forma a fazer com que as seqüências de DNA fiquem na orientação adequada e, como apropriado, no quadro de leitura adequado. Para essa finalidade, podem ser empregados adaptadores ou vinculadores para unir os fragmentos de DNA, ou outras manipulações podem estar envolvidas para fornecer sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, ou semelhantes. Para essa finalidade, mutagênese *in vitro*, reparo de iniciador, restrição, endurecimento, re-substituições, por exemplo, transições e transversões, podem estar envolvidos.

A invenção ainda fornece um vetor de expressão recombinante que compreende uma molécula de DNA da invenção clonado no vetor de expressão em uma orientação anti-senso.

Ou seja, a molécula de DNA está ligada operacionalmente a uma seqüência reguladora de tal forma a permitir a expressão (por transcrição da molécula de DNA) de uma molécula de RNA que seja anti-senso ao mRNA relacionado ao AI-2 ou relacionado à AAR. Podem ser escolhidas seqüências reguladoras ligadas operacionalmente a um ácido nucléico clonado na orientação anti-senso para dirigir a expressão contínua ou indutível da molécula de RNA anti-senso. O vetor de expressão anti-senso pode estar na forma de um plasmídeo recombinante ou fagemídeo no qual são produzidos ácidos nucléicos anti-senso sob o controle de uma região reguladora de alta eficiência, cuja atividade pode ser determinada pelo tipo de célula na qual o vetor é introduzido. Para uma discussão da regulação da expressão gênica com o uso de genes anti-senso, veja Weintraub e cols. (1986) *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1).

Alternativamente, alguns dos componentes descritos acima podem ser reunidos em vetores de transformação. Vetores de transformação são tipicamente compostos por um marcador selecionável que seja mantido em um replicon ou seja desenvolvido em um vetor de integração, como descrito acima.

#### **IV. Células hospedeiras microbianas ou bacterianas**

Qualquer bactéria de interesse pode ser usada nos métodos e nas composições da invenção. Em modalidades específicas da invenção, a bactéria empregada nos métodos é uma bactéria probiótica. O termo "probiótica" significa um microorganismo vivo que sobrevive à passagem através do trato gastrintestinal e tem um efeito benéfico sobre o indivíduo. Como aqui usadas, "propriedades probióticas"

compreendem função intestinal e estabilidade aprimoradas; proteção aumentada contra doenças infecciosas e não infecciosas; modulação do sistema imunológico; alívio da intolerância à lactose; melhora da digestão e da absorção de nutrientes; colesterol sanguíneo reduzido; risco 5 reduzido à alergia; e risco reduzido de infecções do trato urinário. Em algumas modalidades, um aumento da adesão, da tolerância ao estresse ou da produção de AI-2 em uma bactéria resulta na melhora de pelo menos uma propriedade 10 probiótica da bactéria.

Em outras modalidades da invenção, a bactéria é uma bactéria de ácido lático. Como aqui usado, o termo "bactéria de ácido lático" significa bactérias de um gênero selecionado dos seguintes: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, 15 *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Melissococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Lactosphaera*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Holzapfel e cols. (2001) *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S-373S; Sneath, ed. (1986) 20 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*, Lippincott, Williams e Wilkins, Hagerstown, MD).

Ainda em outras modalidades, é usado *Lactobacillus*. "*Lactobacillus*" significa qualquer bactéria do gênero *Lactobacillus*, incluindo, sem limitação, *L. casei*, *L.* 25 *rhamnosus*, *L. johnsonni*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus* e várias outras espécies definidas por Wood e cols. (Holzapfel e Wood, eds. (1995) *The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol. 2.*, Springer, Nova York).

30 A produção de bactérias contendo genes heterólogos, a

preparação de culturas de partida de tais bactérias e métodos de substratos de fermentação, particularmente substratos alimentícios, como leite, podem ser realizados de acordo com técnicas conhecidas, incluindo, sem  
5 limitação, aquelas descritas em Mäyrä-Mäkinen e Bigret (1993) *Lactic Acid Bactéria*, Salminen e von Wright eds. Marcel Dekker, Inc. Nova York. 65-96.; Sandine (1996) *Dairy Starter Cultures*, Cogan and Accolas eds. VCH Publishers, Nova York. 191-206; Gilliland (1985) *Bacterial Starter  
10 Cultures for Food*, CRC Press, Boca Raton, Flórida.

O termo "fermentação" significa a quebra metabólica geradora de energia de compostos orgânicos por microorganismos que geralmente evolui sob condições anaeróbicas e com a evolução de gás.

15 Moléculas de ácido nucléico ou seqüências de aminoácidos da invenção podem ser introduzidas em células hospedeiras por métodos conhecidos na técnica. O termo "introdução" significa a introdução em células procarióticas através de técnicas convencionais de  
20 transformação ou transfecção, ou por infecção mediada por fago. Como aqui usados, os termos "transformação", "transdução", "conjugação" e "fusão de protoplasto" referem-se a diversas metodologias reconhecidas na técnica para a introdução de ácido nucléico estranho (por exemplo,  
25 DNA) em uma célula hospedeira, incluindo co-precipitação com fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, lipofecção ou eletroporação. Métodos adequados para a transformação ou transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook e  
30 cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª

ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York) e em outros manuais de laboratório.

Células bacterianas usadas para produzir os polipeptídeos relacionados ao AI-2 ou relacionados à AAR desta invenção são cultivadas em meios adequados, como descrito de forma geral em Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York).

Cepas bacterianas englobadas pela presente invenção incluem aquelas que são culturas biologicamente puras de uma bactéria que compreendem pelo menos uma seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos da presente invenção. Essas cepas podem incluir, sem limitação: *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* ou *L. plantarum*.

Uma seqüência ou um promotor de controle de expressão heteróloga pode ser associado operacionalmente a uma seqüência de nucleotídeos desejada de acordo com técnicas conhecidas como, por exemplo, por inserção direcionada ou "ativação gênica" por recombinação homóloga. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 6.391.633 e 6.569.681.

Uma "bactéria ou célula em questão" é aquela na qual uma alteração genética, por exemplo, transformação, foi efetuada para um gene de interesse, uma célula que descende de uma célula assim alterada e que compreende a alteração, ou é uma bactéria que foi submetida às condições adaptáveis de adesão. Um "controle" ou uma "célula de controle" ou uma "bactéria de controle" fornece um ponto de referência para medida das alterações no fenótipo da bactéria em questão.

Uma bactéria de controle pode compreender, por exemplo: (a) uma bactéria do tipo selvagem, ou seja, do

mesmo genótipo que o material de partida para a alteração genética que resultou na bactéria em questão; (b) uma bactéria do mesmo genótipo que o material de partida, mas que foi transformada com uma construção nula (ou seja, com uma construção que não tem nenhum efeito sobre o traço de interesse, por exemplo, uma construção que compreende um gene marcador); (c) bactérias geneticamente idênticas à bactéria em questão, mas que não são expostas às condições adaptáveis de adesão ou a condições ou estímulos que modulariam a produção de AI-2; ou (d) a própria bactéria em questão, sob condições nas quais gene de interesse não é expresso.

## V. Métodos

### *i. Modulação da resposta adaptável de adesão*

Em uma modalidade, a presente invenção identificou "condições adaptáveis de adesão". Como aqui usado, o termo "condições adaptáveis de adesão" compreende qualquer condição física, química, biológica ou similar que melhore a adesão de bactérias a um substrato. A adesão pode ser modulada, por exemplo, por cultivo de uma bactéria até uma densidade celular desejada, e depois incubação da bactéria sob condições que aumentarão a resposta de adesão da bactéria. Para as finalidades da presente invenção, o termo "cultivo" ou uma "cultura de células" visa a descrever células que crescem em um ambiente sintético. As condições de cultura (por exemplo, meios de crescimento, pH, temperatura) variam amplamente para cada tipo de célula, e a variação de condições para um tipo de célula em particular pode resultar na expressão de diferentes fenótipos. As células são tipicamente cultivadas em

condições favoráveis para promover crescimento celular. As células podem ser cultivadas em meios mínimos (contendo os nutrientes exatos, incluindo quaisquer fatores de crescimento, necessários para o crescimento da bactéria) ou  
5 meios complexos (contendo normalmente toda a gama de fatores de crescimento que podem ser necessários para o crescimento da bactéria). Pode-se também ajustar as condições físicas de um meio de cultura, tais como pH e temperatura, para evitar o crescimento de alguns organismos enquanto aumenta o crescimento de outros.  
10

Em modalidades específicas, as condições de cultura bacteriana compreendem o cultivo anaeróbico a 37°C ou 42°C em meio de Mann-Rogosa-Sharpe (MRS). O meio pode ser modificado para substituir glicose por galactose ou outros  
15 carboidratos adequados como a fonte de açúcar no meio. As células podem ser coletadas na fase log inicial de crescimento (definida como tendo uma densidade óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de até 0,4), fase log médio de crescimento ( $OD_{600}$  de cerca de 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9) ou fase log tardio de crescimento ( $OD_{600}$  acima de 0,9), antes da  
20 exposição às condições adaptáveis de adesão. Em modalidades específicas, as células são coletadas em uma  $OD_{600}$  de cerca de 0,6. As células bacterianas são coletadas, por exemplo, por sedimentação em uma centrífuga ou em outro dispositivo apropriado, e ressuspensas em meios adequados.  
25

As células bacterianas coletadas podem então ser pré-condicionadas por incubação sob condições adaptáveis de adesão (ou seja, por incubação das células bacterianas sob condições adaptáveis de adesão) que resulta em um aumento  
30 da adesão a um substrato-alvo. O termo "incubação" refere-

se à manutenção de uma população de bactérias sob condições específicas (ou seja, condições adaptáveis de adesão) a fim de promover uma reação em particular (por exemplo, uma resposta adaptável de adesão). As condições adaptáveis de adesão podem incluir, por exemplo, incubação de bactérias por um tempo suficiente para aumentar a adesão da bactéria. Em algumas modalidades, as bactérias da presente invenção são incubadas por pelo menos cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100 ou 120 minutos. Em outras modalidades, as bactérias são incubadas sob condições nas quais as células foram concentradas até uma densidade de cerca de  $1,5 \times 10^8$  a cerca de  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/ml) de diluente (por exemplo, meio MRS), incluindo cerca de  $2,0 \times 10^8$ ,  $3,0 \times 10^8$ ,  $4,0 \times 10^8$ ,  $5,0 \times 10^8$ ,  $6,0 \times 10^8$ ,  $7,0 \times 10^8$ ,  $8,0 \times 10^8$ ,  $9,0 \times 10^8$ ,  $1,0 \times 10^9$  ou mais ufc/ml. Em modalidades específicas, a concentração é acima de  $1,0 \times 10^8$  ufc/ml. Modalidades adicionais incluem incubação em um meio que foi ajustado até um pH de menos de 5, incluindo 4,5, 4,0, 3,5 e 3,0. Em modalidades específicas, permite-se que o pH caia naturalmente em um intervalo de cerca de 7,0 a cerca de 4,5. A incubação de células bacterianas sob essas ou outras condições adequadas, antes do contato das bactérias com um substrato-alvo ("pré-condicionamento"), pode tanto aumentar quanto diminuir, dependendo das condições de incubação, a adesão das bactérias pré-condicionadas ao substrato-alvo. Qualquer substrato de interesse pode ser empregado, incluindo, por exemplo, uma célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital.

Um aumento da adesão compreende qualquer aumento

estatisticamente significativo da adesão a um substrato-alvo, quando comparado a um controle apropriado (por exemplo, bactérias que não foram expostas às condições adaptáveis de adesão). Em modalidades específicas, o aumento pode compreender, sem limitação, pelo menos em torno de 90%, 100%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250% ou maior. Um aumento da adesão pode ser testado *in vitro*, por exemplo, por contato da bactéria pré-condicionada a um alvo adequado (ou seja, células epiteliais ou mucosas) e contagem do número de bactérias que aderem ao substrato-alvo. Um aumento da adesão pode ser testado *in vivo* por monitoramento da resposta do hospedeiro à exposição à bactéria pré-condicionada. Por exemplo, a adesão de uma bactéria probiótica que foi pré-condicionada sob condições adaptáveis de adesão pode ser avaliada pelo monitoramento da melhora das propriedades probióticas, por exemplo, função intestinal e estabilidade aumentadas; proteção aumentada contra doenças infecciosas e não infecciosas; modulação do sistema imunológico; alívio da intolerância à lactose; melhora da digestão e da absorção de nutrientes; colesterol sanguíneo reduzido; risco reduzido à alergia; e risco reduzido de infecções do trato urinário. Métodos adicionais para a medida da adesão bacteriana *in vivo* são descritos em Leffler, e cols. (1995) *Methods Enzymol.* 253: 206-220.

Em algumas modalidades, um aumento da adesão compreende a modulação da expressão de pelo menos um dos Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 19, 20, 33, 34, 35, 36, 37 ou 38, ou variantes e fragmentos destes. Modalidades adicionais compreendem a modulação da expressão de 2, 3, 4 ou mais

dessas seqüências. Uma modulação da adesão pode ser medida comparando-se a expressão dos polinucleotídeos da invenção em uma bactéria na qual os polinucleotídeos foram introduzidos com a expressão do mesmo polinucleotídeo(s) em uma bactéria de controle, como definido em outra seção desta especificação. Métodos para a medida da expressão dessas seqüências são conhecidos na técnica e são discutidos em outra seção desta especificação.

*ii. Modulação da produção de AI-2*

10 As composições e os métodos da presente invenção podem ser usados para modular a produção de AI-2 em bactérias. "Modular", "alterar" ou "modificar" significa a supra- ou infra-regulação de uma atividade biológica-alvo, particularmente a supra-regulação da atividade. Moléculas de ácido nucléico e polipeptídeos da invenção são úteis na modificação das atividades biológicas de bactérias de ácido lático, especialmente bactérias de ácido lático que são usadas para a fermentação de alimentos com características nutricionais ou que promovem a saúde. É englobada a supra- ou infra-regulação da expressão por um polinucleotídeo da presente invenção. A supra-regulação pode ser obtida fornecendo-se múltiplas cópias gênicas, modulando-se a expressão por modificação de elementos reguladores, promovendo-se mecanismos de transcrição ou tradução, ou por outros meios. A infra-regulação pode ser obtida com a utilização de técnicas conhecidas anti-senso e de silenciamento gênico.

Em modalidades específicas, a invenção fornece uma bactéria que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucléico heterólogo relacionada ao AI-2 (ou seja, Id. de

Seq. N°: 1, 3, 13, 15 ou 21), ou variantes biologicamente ativas ou fragmentos destas. Modalidades adicionais incluem uma bactéria que compreende pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro ou pelo menos cinco moléculas de ácido nucléico relacionadas ao AI-2, como descrito acima. A expressão dessas seqüências heterólogas na bactéria produz um nível aumentado de auto-indutor-2, quando comparada com uma bactéria de controle adequada. Como aqui usado, um aumento em auto-indutor-2 compreende qualquer aumento significativo em AI-2 em relação ao controle. Em modalidades específicas, o aumento pode compreender, sem limitação, um aumento de pelo menos cerca de 90%, 100%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250% ou mais na produção de AI-2, quando comparado a um controle apropriado. Métodos para testar esse aumento na produção de AI-2 são discutidos detalhadamente em outra seção desta especificação.

As bactérias da invenção que possuem o aumento da produção de AI-2 podem exibir adesão aumentada a um substrato-alvo e/ou também exibir tolerância aumentada ao estresse.

Micróbios que expressam o polipeptídeos da presente invenção são úteis como aditivos no processamento de laticínios e de fermentação. As seqüências de polinucleotídeos, polipeptídeos codificados e microorganismos que os expressam são úteis na fabricação de produtos derivados do leite, tais como queijos, iogurte, produtos fermentados do leite, coalhadas e soro do leite. Microorganismos que expressam polipeptídeos da invenção podem ser organismos probióticos, uma bactéria de ácido láctico ou qualquer outro hospedeiro bacteriano de

interesse.

**iii. Melhora da tolerância ao estresse e/ou da adesão**

Como discutido anteriormente, a presente invenção fornece bactérias que possuem maior tolerância ao estresse e/ou atividade de adesão. Como aqui usado, uma melhora da adesão a um substrato-alvo compreende qualquer aumento significativo da adesão ao substrato-alvo, incluindo, sem limitação, um aumento de 90%, 100%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250% ou mais da adesão, quando comparado a um controle apropriado. Qualquer substrato de interesse pode ser empregado, incluindo, por exemplo, uma célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital. Em modalidades específicas, a célula compreende uma célula epitelial ou uma célula mucosa. Reconhece-se ainda que a célula pode ser colocada em contato com a bactéria tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Como aqui usado, uma maior tolerância ao estresse de uma bactéria compreende qualquer aumento significativo na sobrevivência da bactéria sob condições de estresse, incluindo, sem limitação, um aumento de aproximadamente 90%, 100%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250% ou mais na sobrevivência, quando comparado a um controle apropriado.

Uma bactéria probiótica da invenção que possui adesão aumentada e/ou tolerância ao estresse aumentada é útil na promoção da saúde de um indivíduo. Embora sem se prender a um mecanismo de ação específico, bactérias probióticas que possuem essas características aprimoradas mediante administração a um indivíduo podem bloquear a adesão e competir com patógenos; estimular defesas imunológicas da célula hospedeira; e/ou desencadear eventos de sinalização

celular que "silenciam" a produção de fatores de virulência pelos patógenos. Dessa forma, o aumento da tolerância ao estresse e/ou a atividade de adesão de um organismo probiótico irá ainda auxiliar na redução do risco de infecção do intestino, trato urogenital e locais de feridas.

As bactérias probióticas que possuem a tolerância ao estresse aumentada e/ou adesão aumentada podem ser administradas a qualquer indivíduo que delas necessite. Por exemplo, o indivíduo pode compreender um mamífero, um ser humano, um animal doméstico ou um animal agrícola. A administração pode ser nasal, oral, vaginal ou anal. Nos contextos em que a administração mucosa não é preferida, a bactéria pode ser administrada por outro meio adequado, dentro da capacidade daqueles habilitados na técnica, ou seja, vias parentais (endovenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular).

Reconhece-se que as bactérias da invenção que possuem a tolerância ao estresse aumentada e/ou adesão aumentada podem ainda expressar pelo menos um polinucleotídeo e/ou polipeptídeo que tenha atividade terapêutica. O termo "atividade terapêutica" significa que o efeito biológico, quando o polipeptídeo é liberado a um indivíduo, é benéfico para aquele indivíduo. A administração é preferivelmente em uma "quantidade terapêuticamente eficaz", que é suficiente para mostrar benefício ao indivíduo. Tal benefício pode ser pelo menos a melhora de pelo menos um sintoma. Em um contexto profilático, a quantidade pode ser suficiente para reduzir o efeito deletério sobre o indivíduo de um ataque patogênico subsequente, por exemplo, pela intensificação da

resposta imune. A quantidade efetiva administrada, a taxa e a duração da administração dependerão do objetivo da administração, por exemplo, do efeito biológico buscado à luz da natureza e gravidade do ataque, e é objeto de  
5 otimização de rotina. A prescrição do tratamento, incluindo vacinação profilática, por exemplo, decisões sobre a dosagem etc., está dentro da responsabilidade dos médicos e de outros profissionais da área médica.

Polinucleotídeos e/ou polipeptídeos que têm atividade  
10 terapêutica e podem ser expressos nas bactérias probióticas que possuem atividade de adesão aumentada ou tolerância ao estresse aumentada podem incluir, por exemplo, insulina, hormônio do crescimento, prolactina, calcitonina, hormônio luteinizante, hormônio da paratireóide, somatostatina,  
15 hormônio estimulante da tireóide, polipeptídeo intestinal vasoativo, uma citocina estrutural do grupo 1 que adota uma estrutura em feixe helicoidal antiparalela 4 alfa como, por exemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- $\gamma$ , EPO, G-CSF,  
20 LIF, OSM, CNTF, GH, PRL ou IFN- $\alpha/\beta$ , a família de citocinas TNF, por exemplo, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , CD40, CD27 ou ligantes FAS, a família de citocinas IL-1, a família de fator de crescimento de fibroblastos, os fatores de crescimento derivados de plaquetas, fator de transformação do  
25 crescimento beta e fatores de crescimento de nervos, uma citocina estrutural do grupo 3 que compreende moléculas  $\alpha/\beta$  de cadeia curta, que são produzidas como grandes moléculas precursoras transmembrana em que cada uma contém pelo menos um domínio EGF na região extracelular, por exemplo, a  
30 família de citocinas do fator de crescimento epidérmico, as

quimiocinas caracterizadas por possuírem seqüências de aminoácidos agrupadas em torno de resíduos conservados de cisteína (os subgrupos de quimiocina C--C ou C--X--C) ou as citocinas relacionadas à insulina, uma citocina estrutural do grupo 4 que exhibe estruturas em mosaico, tais como as heregulinas ou neuregulinas compostas por domínios diferentes, por exemplo, EGF, domínios imunoglobulina-like e *kringle*. Alternativamente, o polipeptídeo biologicamente ativo pode ser um receptor ou antagonista para polipeptídeos biologicamente ativos, como definidos acima. Em modalidades específicas, o polipeptídeo que possui atividade terapêutica compreende um antígeno. Para polipeptídeos terapêuticos adicionais que podem ser expressos em bactérias não patogênicas, veja, por exemplo, Pedido U.S. 20030202991; Vandembroucke e cols. (2004) *Gastroenterology* 127: 667-8;. Huyghebaert e cols. (2005) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59: 9-15; Steidler e cols. (2000) *Science* 289: 1.352-1.355; Steidler e cols. (2001) *The Scientific World* 1: 215-217; Pedido U.S. N° 20020019043; cada um deles aqui incorporado por referência em sua totalidade. Reconhece-se que, em aplicações específicas, o polipeptídeo terapêutico pode ser projetado para ser secretado pelas bactérias probióticas.

#### *iv. Método de rastreamento*

São fornecidos métodos de rastreamento para substâncias químicas ou condições ambientais que aumentem a adesão de uma bactéria a um substrato. O método compreende submeter a bactéria a uma condição ambiental suspeita de aumentar a adesão e/ou suspeita de aumentar a produção de AI-2; e o contato da referida bactéria com o substrato. Um

aumento da adesão da bactéria submetida à condição ambiental ao substrato, comparada com a adesão da mesma bactéria que não foi submetida às condições ambientais, indica que a condição ambiental é eficaz no aumento da adesão da bactéria.

Diversos candidatos a substâncias químicas ou condições ambientais podem ser empregados nesse método de rastreamento. Tais condições podem incluir, sem limitação, indutores/supressores de AI-2 ou de qualquer gene envolvido na produção de AI-2, agentes microbiológicos (por exemplo, organismos procarióticos e eucarióticos), temperatura, concentração, tempo de incubação em condições adaptáveis de adesão, composição dos meios de incubação (por exemplo, presença, abundância e/ou tipo de fatores de crescimento, carboidratos, aminoácidos, sal, minerais e semelhantes), densidade celular ou pH. Um agente candidato pode ser um composto químico, uma mistura de compostos químicos ou uma macromolécula biológica. Tais agentes candidatos podem estar contidos em vários agentes bancos incluindo, por exemplo, bibliotecas de compostos, bibliotecas de peptídeos e semelhantes.

As condições ou os compostos identificados por esse processo estimularão bactérias, incluindo bactérias tanto recombinantes quanto não recombinantes do tipo selvagem, para produzir AI-2, ou para promover a adesão ou formação de biopelícula para uso em fermentação ou bactérias probióticas, ou em qualquer outro método aqui descrito.

A presente invenção é explicada com mais detalhes nos exemplos apresentados abaixo.

Exemplo 1Análise "Gapped BlastP" de seqüências de aminoácidos

As seqüências da invenção foram alinhadas usando o método de alinhamento "Gapped BlastP" e parâmetros aqui apresentados. A Tabela 1 resume os resultados de "Top Blast" para essas seqüências.

Um alinhamento "Gapped BlastP" da seqüência de aminoácidos mostrou que o Id. de Seq. N°: 14 (372 aminoácidos, ORF LBA1080) tem cerca de 55% de identidade dos aminoácidos 11-371 com uma proteína de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, que é uma proteína de metionina sintase II (cobalamina-independente) (N° de Acesso ZP\_00064070.1), cerca de 47% de identidade dos aminoácidos 5-372 com uma proteína de *Lactobacillus gasserii*, que é uma proteína de metionina sintase II (cobalamina-independente) (N° de Acesso ZP\_00046311.1), cerca de 46% de identidade dos aminoácidos 7-372 com uma proteína hipotética de *Chlamydomophila pneumoniae* (N° de Acesso NP\_224351.1), 44% de identidade dos aminoácidos 4-372 com uma proteína hipotética de *Lactobacillus johnsonii* (N° de Acesso NP\_965623.1) e 45% de identidade dos aminoácidos 9-372 com uma proteína de *Oenococcus oeni*, que é uma proteína de metionina sintase II (cobalamina-independente) (N° de Acesso ZP\_00069898.1).

Um alinhamento "Gapped BlastP" da seqüência de aminoácidos mostrou que o Id. de Seq. N°: 16 (157 aminoácidos ORF LBA1081) tem cerca de 87% de identidade dos aminoácidos 1-157 com uma proteína de *Lactobacillus johnsonii*, que é uma proteína de produção de auto-indutor-2 LuxS (N° de Acesso NP\_965624.1), cerca de 87% de identidade

dos aminoácidos 1-157 com uma proteína de *Lactobacillus gasseri*, que é uma proteína LuxS envolvida na síntese de auto-indutor AI2 (N° de Acesso ZP\_00046310.1), cerca de 76% de identidade dos aminoácidos 4-157 com uma proteína de

5 *Streptococcus bovis*, que é uma sintase LuxS de auto-indutor 2 (N° de Acesso dbj|BAD06876.1), 77% de identidade dos aminoácidos 1-157 com uma proteína de *Lactobacillus plantarum*, que é uma proteína de produção de auto-indutor (N° de Acesso NP\_784522.1) e 73% de identidade dos

10 aminoácidos 4-157 com uma proteína de *Streptococcus pyogenes*, que é uma proteína de produção de auto-indutor-2 (N° de Acesso NP\_269689.1).

Um alinhamento "Gapped BlastP" da seqüência de aminoácidos mostrou que o Id. de Seq. N°: 18 (444

15 aminoácidos, ORF LBA169) tem cerca de 95% de identidade dos aminoácidos 49-444 com uma proteína de *Lactobacillus acidophilus*, que é um precursor da proteína "S-layer" (N° de Acesso sp|P35829|SLAP\_LACAC), cerca de 67% de identidade dos aminoácidos 49-443 com uma proteína de *Lactobacillus*

20 *helveticus*, que é uma proteína da camada de superfície (N° de Acesso emb|CAA62606.1), cerca de 67% de identidade dos aminoácidos 49-443 com uma proteína de *Lactobacillus helveticus*, que é uma proteína da camada de superfície (N<sup>os</sup> de Acesso emb|CAB46984.1; AJ388558), 66% de identidade dos

25 aminoácidos 49-443 com uma proteína de *Lactobacillus helveticus*, que é uma proteína da camada de superfície (N° de Acesso emb|CAB46985.1) e 66% de identidade dos aminoácidos 49-443 com uma proteína de *Lactobacillus helveticus*, que é uma proteína da camada de superfície (N°

30 de Acesso emb|CAB46986.1).

Um alinhamento "Gapped BlastP" da seqüência de aminoácidos mostrou que o Id. de Seq. N°: 20 (566 aminoácidos, ORF LBA1148) tem cerca de 69% de identidade dos aminoácidos 4-564 com uma proteína hipotética de *Lactobacillus johnsonii* (N° de Acesso NP\_965038.1), cerca de 66% de identidade dos aminoácidos 4-564 com uma proteína de *Lactobacillus gasseri*, que é uma proteína de ligação de RNA prevista homóloga a um snRNP eucariótico (N° de Acesso ZP\_00045959.1), cerca de 41% de identidade dos aminoácidos 4-566 com uma proteína de *Enterococcus faecium*, que é uma proteína de ligação de RNA prevista homóloga a um snRNP eucariótico (N° de Acesso ZP\_00037499.1), cerca de 41% de identidade dos aminoácidos 4-566 com uma proteína de *Enterococcus faecalis*, que é homóloga a uma proteína de ligação de fibronectina/fibrinogênio (N° de Acesso NP\_814975.1) e cerca de 41% de identidade dos aminoácidos 4-557 com uma proteína de *Lactobacillus plantarum*, que é uma proteína de aderência (N° de Acesso NP\_785358.1).

Tabela 1. Resultados de "Top Blast" para seqüências de proteína da invenção

Id. de Seq. N°:	ORF	Percent. de ident.	Interv. De aminoácidos	Organismo	Descrição	N° de Acesso
2	820	69	1 a 229	<i>Lactobacillus gasseri</i>	COG0775: Nucleosídeo fosforilase	Ref ZP_00046270.1
4	931	67	1 a 312	<i>Lactobacillus gasseri</i>	COG2264: proteína ribossômica L11 metilase	ref ZP_00046385.1
6	1.042	49	1 a 219	<i>Streptococcus pneumoniae R6</i>	Transportador ABC permease que transportem a membrana - transporte de glutamina	ref NP_786178.1
8	1.044	49	1 a 219	<i>Streptococcus pneumoniae R6</i>	Transportador ABC permease que transportem a membrana - transporte de glutamina	ref ZP_00046137.1
10	1.045	55	1 a 246	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp.</i>	COG1126: Sistema de transporte de	ref NP_861002.1

12	1.046	59	14 a 285		<i>mesenteroides A TCC</i> 8293	<i>Leuconostoc lactis</i>	aminoácido polar do tipo ABC, ATPase orf J; suposto sistema de transporte de cassette de ligação de ATP; similar à proteína de ligação de substrato e aos componentes do sistema de transporte ABC	ref NP_786170.1				
14	1.080	55	11 a 371		<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	Proteína de metionina sintase II (cobalamina-independente), MetE	ref ZP_00064070.1					
16	1.081	87	1 a 157		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	produção de proteína de auto-indutor-2 LuxS	ref NP_965624.1					
18	169	90	49 a 444		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Precursor da proteína "S-layer"	ref sp 1335829					
20	1.148	69	4 a 564		<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Proteína de ligação de fibronectina, FbpA	ref NP_965038.1					

**Análise PFAM de seqüências de aminoácidos**

O Id. de Seq. N°: 2 (231 aminoácidos, ORF LBA820) contém um domínio PNP\_UDP\_1 previsto em torno dos aminoácidos 2 a 222, e é um membro da família de 5'-5 metiladenosina fosforilase (MTA fosforilase) (Acesso PFAM PF01048).

O Id. de Seq. N°: 4 (314 aminoácidos, ORF LBA931) contém um domínio PrmA em torno dos aminoácidos 6 a 312, e é um membro da família da proteína ribossômica L11 metiltransferase (PrmA) (Acesso PFAM PF06325).

O Id. de Seq. N°: 14 (372 aminoácidos, ORF LBA1080) contém um domínio Methionine\_synt previsto em torno dos aminoácidos 11 a 369, e é um membro da família da proteína metionina sintase independente de vitamina B12 (Acesso PFAM PF01717).

O Id. de Seq. N°: 16 (157 aminoácidos ORF LBA1081) contém um domínio LuxS previsto localizado em torno dos aminoácidos 2 a 155, e é um membro da família da proteína LuxS (LuxS) (Acesso PFAM PF02664).

O Id. de Seq. N°: 20 (566 aminoácidos, ORF LBA1148) contém um domínio FbpA previsto em torno dos aminoácidos 1 a 425, e é um membro da família da proteína de ligação de fibronectina A (FbpA) (Acesso PFAM PF05833).

O Id. de Seq. N°: 22 (399 aminoácidos, ORF LBA1622) contém um domínio N-terminal S-adenosilmetionina sintase previsto em torno dos aminoácidos 2-102 (Acesso PFAM 00438), um domínio central S-adenosilmetionina sintase em torno dos aminoácidos 124-243 (Acesso PFAM 02772) e um domínio C-terminal S-adenosilmetionina sintase em torno dos aminoácidos 245-384 (Acesso PFAM 02773).

### Cepas bacterianas e condições de crescimento

Cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas de forma anaeróbica a 37°C ou 42°C em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) ou, quando apropriado, em MRS 5 suplementado com ágar 1,5%. *Escherichia coli* foi propagada de forma aeróbica em meio de Luria-Bertani (LB, Difco) ou em meio LB suplementado com ágar 1,5% a 37°C. Meio de infusão de coração-cérebro (BHI, Difco) suplementado com ágar 1,5% e 150 µg/ml de eritromicina (Em) foi usado para 10 seleção de transformantes de *E. coli*. Meio de Bioensaio de Auto-Indutor (AB) (Bassler e cols. (1993) *Mol. Microbiol.* 9: 773-786) foi usado para a propagação de todas as cepas de *Vibrio harveyi*. Quando apropriado, cloranfenicol (Cm, 5,0 µg/ml) e Em (5,0 µg/ml ou 150 µg/ml) foram usados para 15 seleção. As Unidades de Formação de Colônias (UFC) por ml foram determinadas com diluições apropriadas usando um "Whitley Automatic Spiral Plater" (Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, Inglaterra).

Tabela 2. Cepas bacterianas e plasmídeos usados

Cepa	Origem ou características relevantes	Fonte ou referência
<i>L. acidophilus</i>		
NCFM	Isolado intestinal humano	(31)
NCK 1377	NCFM::pTRK826 ( <i>slpA</i> integrante)	(1)
NCK 1392	NCFM contendo pTRK669	(29)
NCK 1398	NCFM::pTRK685 ( <i>lacL</i> integrante)	(29)
NCK 1661	NCFM::pTRK833 ( <i>fbpA</i> integrante)	(9)
NCK 1765	NCFM::pTRK854 ( <i>luxS</i> integrante)	Este estudo
<i>V. harveyi</i>		(35)

BB170	<i>LuxN</i> ::Tn5 AI-I sensor <sup>-</sup> AI-3 sensor <sup>+</sup>	
<i>E. coli</i>  EC1000	RepA <sup>+</sup> MC1000, Km <sup>r</sup> , que carrega uma única cópia do pWV01 <i>repA</i> ; hospedeiro para plasmídeos baseados em pORI28	(25)
<b>Plasmídeos</b>  PORI28	Em <sup>r</sup> , ori (pWV01), se replica apenas com <i>repA</i> fornecido em <i>trans</i>	(25)
PTRK669  PTRK854	ori (pWV01), Cm <sup>r</sup> , RepA <sup>+</sup> região interna de 471 bp de <i>luxS</i> (LBA1081) clonada em sítios BgIII-XbaI de pORI28	(29) Este estudo

#### Cultura de tecido

As células Caco-2 (ATCC HTB-37, Rockville, MD) foram usadas apenas entre a 40<sup>a</sup> e a 50<sup>a</sup> passagens. Todos os reagentes usados na manutenção de células Caco-2 foram obtidos de Gibco (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). As células cresceram rotineiramente em atmosfera de 95% de ar -5% de CO<sub>2</sub> em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino 20% (v/v) inativado (56°C, 30 minutos) (FBS), 0,10 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio. As monocamadas foram submetidas à tripsina por 10 minutos, contadas usando um hemocitômetro, e semeadas a 1,3 x 10<sup>5</sup> células/poço em 2,0 ml de meio de cultura de células. As células cresceram em lamínulas plásticas de 15 mm "Thermanox" (Nalge Nunc International,

Rochester, NY) em placas de cultura tratadas de 12 poços "Costar" (Corning Inc., Acton, MA). O meio foi substituído a cada dois dias e todos os ensaios de aderência foram realizados após 14 dias de incubação.

#### 5 Ensaio de aderência

A adesão de cepas de *Lactobacillus* às células Caco-2 foi examinada de acordo com o método descrito previamente (Buck e cols. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8.344-8.351). Resumidamente, células bacterianas em fase log médio (OD<sub>600</sub> 0,6) foram preparadas em 10 ml de MRS com 3,0 µg/ml de Em para manter pressão seletiva sobre os integrantes. As células foram removidas por centrifugação por 10 minutos a 4.000 x g, e lavadas duas vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). Os péletes bacterianos foram ressuspensos em 5 ml de MRS fresco, antes da aderência. Para condições adaptáveis de adesão, péletes celulares de culturas em fase log médio foram ressuspensas em 1 ml de MRS fresco a  $\sim 1,0 \times 10^9$  ufc/ml e incubadas por 1 hora a 37°C. As células foram centrifugadas novamente, e ressuspensas em 5 ml de MRS fresco, antes da adição às monocamadas. Monocamadas de Caco-2 com quinze dias foram lavadas duas vezes com PBS, e tratadas com uma suspensão bacteriana em uma concentração de  $4 \times 10^8$  UFC/ml. As bactérias foram incubadas na monocamada por 1,5 hora a 37°C em uma mistura (1:2 v/v) de MRS e meio de cultura de linhagem celular. Após incubação, as monocamadas foram lavadas cinco vezes com PBS, fixadas em metanol e coradas por Gram. As células bacterianas aderentes foram então enumeradas microscopicamente. As lamínulas em duplicata foram contadas para cada experimento. Os dados finais

apresentados coletivamente representam pelo menos 3 experimentos independentes em duplicata. As contagens totais para cada lamínula foram usadas, e a adesão foi expressa como percentual (%) da cepa de controle NCK1398 (Russell e Klaenhammer (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4.361-4.364) que carrega uma inserção no gene *lacL* ( $\beta$ -galactosidase). Usando esse controle, todas as culturas mutantes e o controle parente puderam ser preparados com Em para manter pressão seletiva sobre o integrante *LuxS*<sup>-</sup>. O protocolo de adesão é apresentado na Figura 2.

#### **Resposta adaptável à adesão**

Dez ml de células em fase log ( $OD_{600}$  0,7) foram coletados por centrifugação e ressuspensos em 1 ou 10 ml de meio de crescimento Mann-Rogosa Sharpe (MRS) fresco e incubados por 1 hora a 37°C. Aquelas ressuspensas em 10 ml são representadas como "condições de controle" (Figura 1A), enquanto aquelas ressuspensas em 1 ml são as "condições adaptáveis de adesão" (Figura 1B). Para as finalidades da presente invenção, tanto as condições de incubação quanto a ressuspensão no volume menor (mais concentrado) de meio (por exemplo, 1 ml de MRS para o grupo de AAR versus 10 ml MRS para o grupo de controle) são consideradas condições adaptáveis de adesão. As células concentradas e incubadas exibiram um aumento significativo na adesão (Figura 1). O nível de aderência para as células concentradas e incubadas foi pelo menos 20 vezes maior do que das células de controle não concentradas e incubadas, embora o mesmo número de células bacterianas tenha sido adicionado inicialmente a cada poço. Em cada experimento, as células foram ressuspensas em 5 ml de MRS fresco, e enumeradas para

determinar a concentração absoluta de células adicionada à monocamada Caco-2. Apenas os dados de aderência resultantes da adição de  $3,8 \times 10^8$ - $4,2 \times 10^8$  UFC/ml foram registrados. Aumentos similares na aderência bacteriana não foram obtidos pela concentração de  $10 \times$  sem incubação, ou incubação (37°C, 1 hora) sem concentração das células mid-log, antes da aderência, ou por incubação (37°C, 1 hora) sem concentração em MRS ajustado até o pH 4,5 com ácido lático (dados não mostrados). Após a incubação de uma hora, o pH das células não concentradas era de 5,5, enquanto as células concentradas reduziram o pH a 4,5. Portanto, a combinação de concentração celular e pH diminuído resultou em uma adaptação das células de *L. acidophilus* a um estado significativamente mais receptivo à aderência. Designamos esse fenômeno uma Resposta Adaptável à Adesão (AAR).

A Figura 3 mostra as propriedades de adesão da cepa de controle e cepas mutantes selecionadas de *L. acidophilus* NCFM, com e sem exposição às condições adaptáveis de adesão. Os dados são registrados como contagem total de células em 17 campos em uma única lamínula. Cada ponto dos dados representa pelo menos dois experimentos em duplicata. *L. acidophilus* NCFM contendo uma integração no gene de  $\beta$ -galactosidase atua como o "controle" a fim de manter a seleção de Em durante crescimento de todos os mutantes.

#### 25 **Análise de microarranjos**

Uma única cultura de 20 ml de *L. acidophilus* cresceu em MRS até OD<sub>600</sub> de 0,6, dividida em duas alíquotas de 10 ml, e coletada por centrifugação por 8 minutos a  $3.150 \times g$ . Uma alíquota foi ressuspensa em 10 ml de MRS fresco, e a outra foi ressuspensa em 1 ml de MRS fresco. Ambas as

culturas foram então incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação e congeladas imediatamente em um banho de gelo seco-etanol. O isolamento de RNA foi efetuado usando TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD) de acordo com o protocolo descrito previamente (Azcarate-Peril e cols. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5.794-5.804). A pureza e a concentração do RNA foram determinadas por eletroforese em géis de agarose e medidas padronizadas do espectrofotômetro.

Quantidades idênticas (25 µg) de RNA total foram marcadas com aminoalil por transcrição reversa com hexâmeros aleatórios na presença de amino-alil dUTP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), usando transcriptase reversa Superscript II (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) a 42°C de um dia para o outro, seguido por marcação por fluorescência de cDNA com aminoalil com ésteres de Cy3 ou Cy5 ativados por *N*-hidroxisuccinimida (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Sondas de cDNA marcadas foram purificadas com o uso do Kit de Purificação por PCR (Qiagen, Valencia, CA). O acoplamento dos corantes Cy3 e Cy5 ao cDNA marcado com AA-dUTP e a hibridização das amostras aos microarranjos foram realizados usando protocolos padronizados. Informações adicionais sobre esses protocolos podem ser encontradas na página da Internet do TIGR em [www.tigr.org/tdb/microarray/protocolsTIGR.shtml](http://www.tigr.org/tdb/microarray/protocolsTIGR.shtml). As intensidades de fluorescência foram adquiridas usando um scanner de microarranjo "Packard Bioscience ScanArray 4000" (Global Medical Instruments, Inc, Ramsey, MN) e processadas como imagens TIFF. As intensidades dos sinais foram

quantificadas com a utilização da suíte de programas "GSI Luminomics QuantArray 3.0" (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA). Duas lâminas (cada uma contendo arranjos em triplicata) foram hibridizadas reciprocamente para sondas marcadas com Cy3 e Cy5 por experimento (*swap* de corante). Os *spots* foram analisados por quantificação adaptiva (Azcarate-Peril e cols., 2005, *supra*). O nível de fundo local foi subsequente subtraído das intensidades registradas do *spot*. Os dados foram normalizados para a mediana. A mediana das seis proporções por gene foi registrada. A proporção entre os valores médios absolutos de *pixels* para os *spots* replicados de cada gene, com e sem tratamento, representava o aumento (em número de vezes) na expressão gênica. Também foram calculados os intervalos de confiança e os valores *P* para os aumentos com o uso de um teste *t* de duas amostras. Valores *P* de 0,05 ou menos foram considerados significativos (Tabela 3).

Tabela 3. ORFs selecionados expressos diferencialmente sob condições adaptáveis de adesão<sup>a</sup>

ORF#	Anotação do gene	Proporção <sup>1</sup>	ORF#	Anotação do gene	Proporção <sup>1</sup>
41	Ribonucleosídeo trifosfato redutase	2,767	1.046	Proteína de ligação de substrato do transportador	4,241
55	D-lactato desidrogenase	3,225		ABC	2,538
132	Suposta família de reg. de trasc. Tetr	0,157	1.078	Sal biliar hidrolase	2,125
144	n-acetilglucosamina-6-P desacetilase	2,385	1.080	MetE	1,852
154	Fosfonato ABC trans. (permease)	0,489	1.081	Proteína LuxS da produção de auto-indutor-2	4,056
160	NTP redutase anaer.	2,383	1.115	Aminoácido permease	0,444
161	NTP redutase anaer. ou redutor	2,507	1.119	Suposta prot. da membrana interna	0,328
165	Endopeptidase neutra	2,348	1.122	DNA topoisomerase IV, subunidade B	0,221
166	Proteína de captação (K <sup>+</sup> )	0,327	1.140	lisina	0,430
199	Inosina-monofosfato desidrogenase	3,000	1.177	proteína de síntese de ferro- enxofre YrvO	0,393
			1.178	[proteína nucleolar]	

204	Aminopeptidase e	2,881	1.197	DNA primase	0,353
205	Choque térmico baixo peso molecular	2,496	1.208	Peptídeo metionina sulfóxido reductase msrA	2,357
234	carboxiviniltransferase	0,487	1.243	Exonuclease DNA-específica RecJ	0,457
262	transportador de aa	0,459	1.247	Proteína de choque térmico DnaK	3,532
266	enzima de adição de d-ala-d-ala	0,321	1.248	Co-fator de co-chaperonina GrpE, Hsp70	3,266
267	RNA helicase ATP-dep. ybdr	0,225	1.249	Repressor de transcrição indutível pelo calor HrcA	3,831
281	lys-trna sintase lysr	0,406	1.269	Fator de alongamento de tradução Ts	0,430
346	reparo de DNA Rada	0,500	1.270	Proteína ribossômica de 30s S2	0,446
358	antiterm. transcr. nusG	0,485	1.300	Prot. de ligação de substrato de oligopeptídeo ABC oppA	3,007
359	prot. rib. 50S L11	0,397	1.341	Aminotrans. de aminoácido de cadeia ramificada IL VE	3,354
395	Suposta desidrogenase	5,362	1.376	Prot. transmembrana	0,192

396	Oxalil-coa descarboxilase	5,525	1.401	Nadh peroxidase (Npx)	6,032
405	Co-chaperonina GroES	8,405	1.433	Diidroxiacetona quinase	2,208
406	chaperonina GroEL	9,273	1.457	Galactose-1-epimerase (mutarotase)	3,434
493	proteína promotora de agregação	0,295	1.458	Galactose-1-fosfato uridililtransferase	3,315
523	ATPase tipo P	2,750	1.460	Precursor da proteína de ligação de muco	2,470
555	Antígeno de reação cruzada à miosina	6,833	1.462	Beta-galactosidase	3,765
617	RNA helicase ATP-dep.	0,498	1.467	Subunidade grande de beta- galactosidade (lactase)	3,868
638	t Clp protease ATP-dep., ClpE	6,577	1.469	Udp-glicose-4-epimerase	3,024
652	>>H+/K+ ATPase até 657<<	3,583	1.551	Fosforibosilamina-glicina ligase PUR2	0,414
655	Sistema de fosfotrans. II pthA	2,187	1.552	Fosforilribosilaminoimidazol PUR9	0,207
672	Prot. de fosf. induzida por inanição YvyD	2,345	1.553	Fosforribosil glicinamida PUR2	0,259
			1.554	Fosforribosil ciclo-ligase	0,219

680	Enzima de ramificação de glicano glgB	3,643	1.555	PUR5 Fosforribosilpirof.	0,203
682	Adenililtransferase glgD	3,489	1.556	Amidotrans. PUR1 Fosforribosilformiglic.	0,187
694	Clp protease P ATP-dependente	2,945	1.557	Sintase PURL Fosforribosilformiglic.	0,387
789	Família aminotransferase - Nifs	0,480	1.559	Sintase PURQ Fosforribosilaminoimid.	0,243
791	Pseudouridilato sintase 16s	0,448	1.564	Sintase PUR7 Suposta prot. da membrana	0,318
822	tRNA-metiltransferase	0,453	1.566	Bacteriocina helvectina J	2,762
847	clpX (protease relacionada ao estresse)	0,465	1.595	Proteína facilitadora da captação de glicerol glpF	0,132
851	diaminopimelato descarboxilase	3,351	1.632	ssdh	5,685
852	tetrahidrodipicolinato descarboxilase	3,348	1.665	Ligação de substrato de oligopeptídeo ABC trans.	2,936
853	aminoácido amidohidrolase	2,961	1.699	exodesoxirribonuclease	7,479
854	diidrodipicolinato sintase	3,637	1.743	hidrolase relacionada à	0,300

855	diidrodipicolinato redutase	2,390	1.744	parede celular	0,232
877	Sistema PTS IIa	2,562	1.768	Suposta glicosidase	0,288
882	Regulador transc. (família GntR)	2,163	1.812	lctP lactato premease	2,952
892	Hidrolase de sal biliar	1,815	1.821	alfa-glicosidase II	0,362
911	aminopeptidase	3,671	1.822	Transportador ABC, componente de ATPase	0,399
913	peroxidase	1,988	1.848	Transportador ABC, componente de ATPase	0,272
925	regulador da transc.	2,036	1.869	Transportador de di-tripeptídeo	6,740
927	Suposta prot. da membrana	0,363	1.870	Beta-fosfoglucomutase	10,17
953	Nucleotídeo fosfodiesterase	0,430	1.879	Maltose fosforilase	2,192
986	Relacionada à galactose mutarotase	3,146	1.883	Fosfometilpirimidina quinase	0,388
994	Aminoacil-histidina dipeptidase	0,326	1.893	Provável proteína secretada da família NLP/P60	0,478
995	Aminoácido permease	0,257	1.910	GMP redutase	2,571
999	ATP de transporte de Na+	2,293		Protease ATP dependente ClpE	

<b>redutase</b>				<b>Suposto precursor da</b>	
1.027 oxidoreductase	2,381	1.943	<b>lipoproteína A/antígeno</b>	0,444	
1.042 transportador ABC permease	3,010	1.945	Transportador de açúcar ABC permease	0,426	
1.044 transportador ABC	2,670	1.974	<b>Piruvato oxidase</b>	4,304	
1.045 ligação de ATP-transportador ABC	4,866	1.999	<b>Cadeia alfa de glicil-tRNA sintetase</b>	0,444	

<sup>a</sup> ORFs mostrados em **negrito** na tabela 2 exibem um padrão de expressão similar a uma análise de microarranjo prévia de *L. acidophilus* NCFM exposto a MRS acidificado até pH 4,5 (3).

A análise de microarranjo de *L. acidophilus* NCFM exposto às condições adaptáveis de adesão (Tabela 3) sugere uma produção aumentada de um sinal interespecie, auto-indutor-2 (AI-2). Os genes iniciais (*metK*) e finais (*luxS*) na via para a produção de AI-2 a partir de metionina (veja a Figura 4) são significativamente induzidos. Adicionalmente, foi induzido um agrupamento transportador ABC supostamente envolvido com a exportação de AI-2.

#### Via biossintética de auto-indutor-2

10 A análise adicional do genoma de *L. acidophilus* NCFM revelou quatro ORFs (LBA1622, LBA0931, LBA0820, LBA1081) que exibem homologia para cada gene na via biossintética para a produção de AI-2 a partir de metionina (Figura 4). MetK converte metionina em S-adenosilmetionina (SAM) e é 15 supostamente codificado por LBA1622 (Id. de Seq. N°: 21). Um grupo metil é removido de SAM por uma metiltransferase dependente de SAM (codificada por LBA931, Id. de Seq. N°: 3), formando S-adenosilhomocisteína (SAH), que é subseqüentemente detoxificada por uma MTA/SAH nucleosidase, 20 Pfs (codificada por LBA820, Id. de Seq. N°: 1), formando S-ribosilhomocisteína (SRH) e adenina. LuxS (codificado por LBA1081, Id. de Seq. N°: 15) converte SRH em homocisteína e 4,5-diidroxí-2,3-pentanodiona, que circulariza, incorporando boro, para formar AI-2 (Winzer e cols. (2002) 25 *Microbiology* 148: 909-922). Homocisteína é finalmente metilada de volta à metionina por MetE (codificado por LBA1080, Id. de Seq. N°: 13) localizado diretamente acima do homólogo de *luxS*, LBA1081. Um terminador entre os dois ORFs com uma energia livre de -16,2 kcal sugere que LBA1080 30 e LBA1081 são expressos separadamente.

A Tabela 4 lista outros lactobacilos, para os quais há disponibilidade de dados de seqüências, com a via completa para a produção de AI-2 a partir de metionina.

Tabela 4				
Organismo	metK	Metil- transferase	pfs	luxS
<i>L. acidophilus</i> NCFM	2	2	1	2
<i>L. gasseri</i>	1	5	1	1
<i>L. johnsonii</i>	1	6	1	1
<i>L. plantarum</i>	1	2	1	1

Os números de ORFs previstos que codificam proteínas que exibem similaridade para cada enzima na via para a síntese de AI-2 a partir de metionina são listados para *L. acidophilus* NCFM (Altermann e cols. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3.906- 3.912), *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (Pridmore e cols. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2.512-2.517) e *Lactobacillus plantarum* WCFS 1 (Kleerebezum e cols. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1.990-1.995). Prevê-se que *L. acidophilus* NCFM abrigue duas cópias de *luxS*, mas um dos ORFs não contém sinais de expressão como, por exemplo, regiões promotoras ou de ligação ribossômica.

#### Produção de AI-2

A detecção de auto-indutor-2 do sobrenadante de cepas bacterianas selecionadas foi realizada como descrito previamente (De Keersmaecker e Vanderleyden, 2003, *supra*), com as seguintes modificações. A detecção de AI-2 produzido por bactéria de ácido lático pode ser problemática, em função do pH diminuído dos sobrenadantes de cultura gastos,

e a repressão de catabólitos por glicose do operon *lux* na cepa repórter de *V. harveyi* BB170 (DeKeersmaecker e Vanderleyden, 2003, *supra*). Conseqüentemente, todas as populações de *Lactobacillus* usadas para detecção de auto-indutor-2 cresceram em MRS modificado (mMRS) contendo galactose 1% em vez de glicose. Em pontos do tempo especificados, foram coletadas alíquotas de 4 ml, a OD<sub>600</sub> foi medida e sobrenadantes livres de células foram isolados por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. O pH do sobrenadante foi neutralizado até o pH 6,5 com 2 N de NaOH e ele foi filtrado através de uma membrana de 0,2 µmm. Os sobrenadantes preparados foram estocados a 4°C até o final da duração dos experimentos, e todas as amostras de cada cultura foram testadas em conjunto em placas de microtitulação de 96 poços separadas. A cepa repórter de *V. harveyi* BB170 (Azcarate-Peril, 2005, *supra*) cresceu de um dia para o outro em meio de bioensaio de auto-indutor (AB), foi lavada com e ressuspensa em AB fresco até OD<sub>600</sub> de 0,5. Dez µl de sobrenadante estéril foram misturados com 90 µl de uma diluição 1/1.000 da cepa repórter BB170 em cada poço de uma placa de 96 poços. A luminescência foi medida a 30°C a cada 10 minutos por 6 horas em uma leitora fluorescente de placa de microtitulação (FLOUStar Optima, BMG Technologies, Durham, NC). O aumento da indução foi calculado obtendo-se a média de pelo menos 6 pontos do tempo padronizados e dividindo-se o valor médio obtido do tipo selvagem pelo valor médio obtido pelo mutante LuxS<sup>-</sup>. Cada amostra foi medida em pelo menos 3 poços independentes, e cada ponto dos dados representa 3 amostras independentes.

A fim de determinar quando AI-2 foi produzido durante a fase de crescimento de *L. acidophilus* NCFM, foram coletados sobrenadantes a 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24 36, e 48 horas de culturas em triplicata. A produção de AI-2 durante o crescimento de *L. acidophilus* é mostrada na Figura 5. Coincidindo com uma queda rápida no pH, ocorre um aumento notável na produção de AI-2 por toda a fase logarítmica de crescimento. Com a entrada na fase estacionária, a atividade de AI-2 no sobrenadante mantém um nível constante por até 48 horas (Figura 5).

#### **Inativação da inserção do gene *luxS***

Usando DNA cromossômico de *L. acidophilus* NCFM como modelo, um fragmento interno de 471 bp de LBA1081 (*luxS*) foi amplificado usando PCR com iniciadores 1081-IF (5'-GATCA GATCT AAGTT AAGGC ACCTT ACG - 3', Id. de Seq. N°: 23) e 1081-IR. (5'-GATCT CTAGA TTTCG AATGG GTCAT CAC - 3', Id. de Seq. N°: 24). O fragmento interno foi clonado no vetor integrativo pORI28 (Law, e cols. (1995) *J. Bacteriol.* 177: 7.011-7.018) e subseqüentemente transformado por eletroporação em *L. acidophilus* NCFM contendo o plasmídeo auxiliar sensível à temperatura pTRK669 (Russell e Klaenhammer, 2001, *supra*). Foram então realizadas etapas de acordo com Russell e Klaenhammer, 2001, *supra* para seleção de integrantes. A integração bem sucedida do plasmídeo foi confirmada por PCR e análise de hibridização *Southern* de fragmentos de junção usando protocolos padronizados.

A cepa mutante *LuxS<sup>-</sup>*, NCK 1765, foi testada quanto à habilidade para se aderir às células Caco-2 usando células bacterianas da fase de crescimento de log médio e células expostas às condições AAR. Quando as células de fase log

médio foram adicionadas diretamente às células Caco-2 da fase log médio, foi observada uma diminuição de 58% na adesão (teste t de Student,  $P < 0,001$ ) para a cepa mutante LuxS<sup>-</sup> (Figura 6), comparada com o controle. Um derivado de *L. acidophilus* NCFM (NCK1398) que abriga uma integração em  $\beta$ -galactosidase foi usado como controle, de forma que a pressão antibiótica pudesse ser mantida sobre o mutante e o controle.

### Conclusões

10 *L. acidophilus* NCFM responde às condições ambientais de um modo que aumenta dramaticamente a habilidade do organismo para aderir às células epiteliais intestinais, *in vitro*. A análise de microarranjo de transcrição de uma população exposta a essas condições adaptáveis de adesão  
15 sugere que a produção de uma molécula de sinalização, AI-2, está aumentada. A análise do genoma de *L. acidophilus* NCFM identificou todos os genes necessários para a produção de AI-2 a partir de metionina. A produção de AI-2 por *L. acidophilus* NCFM foi confirmada com o uso de uma cepa  
20 repórter de *V. harveyi*. Com a inativação do gene final na via, *luxS*, foi observada uma diminuição na adesão em células em fase log, mas não foi observada nenhuma diferença na resposta adaptável de adesão da cepa mutante LuxS<sup>-</sup>, comparada com o controle. Esses dados sugerem que a  
25 adesão de lactobacilos ao epitélio intestinal pode envolver uma interação íntima de vários fatores. Embora a sinalização mediada por AI-2 contribua para a habilidade de adesão de *L. acidophilus* NCFM, ela não é o único meio de comunicação dentro da população responsável pela resposta  
30 adaptável de adesão. Esses dados sugerem que a adesão de

lactobacilos ao epitélio intestinal pode envolver uma interação íntima de vários fatores.

### Exemplo 2

A análise de microarranjo da expressão gênica afetada por LuxS e AI-2 foi realizada em várias espécies microbianas diferentes a fim de determinar a função de LuxS sobre processos celulares. A influência de AI-2 sobre *E. coli* K-12 crescida na presença e ausência de glicose revelou expressão gênica alterada de genes relacionados ao operon *lsr*, ao metabolismo de metionina e à utilização de carbono (12, 32). Outro estudo ligou a produção de LuxS com genes envolvidos no crescimento e divisão celular ao uso de microarranjos de *E. coli* (9). A análise de microarranjo da transcrição de um mutante LuxS<sup>-</sup> de *Porphyromonas gingivalis* e seu tipo selvagem relacionou a participação de LuxS à resposta ao estresse daquele organismo (36). Além de cepas bacterianas patogênicas, várias cepas não patogênicas demonstraram um fenótipo associado à produção de AI-2. Por exemplo, o desempenho ecológico de *Lactobacillus reuteri* no trato gastrintestinal murídeo estava alterado em um mutante LuxS<sup>-</sup> (28). Esse estudo utilizou um microarranjo de genoma inteiro para identificar a expressão gênica influenciada por LuxS em *L. acidophilus* NCFM. Vários genes envolvidos com a resposta ao estresse, crescimento e metabolismo foram expressos diferencialmente em uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup>. A análise fenotípica de uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup> examinou a influência de uma mutação *luxS* sobre a tolerância ao calor e à bile de *L. acidophilus* NCFM.

### **Cepas bacterianas e condições de crescimento**

Cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas de forma

anaeróbica a 37°C ou 42°C em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit MI) ou, quando apropriado, em MRS suplementado com ágar 1,5%. Para detecção de AI-2, os lactobacilos cresceram em MRS modificado, seguindo os

5 ingredientes para MRS, exceto com a substituição de galactose 1% p/v no lugar de glicose. *E. coli* cresceu de forma aeróbica em meio de Luria-Bertani (LB, Difco) ou em meio LB suplementado com ágar 1,5% a 37°C. Meio de Infusão Cérebro Coração (BHI, Difco) suplementado com ágar 1,5% e

10 150 µg/ml de eritromicina (Em) foi usado para seleção de transformantes de *E. coli*. Meio de Bioensaio de auto-indutor (AB) (5) foi usado para a propagação de todas as cepas de *Vibrio harveyi*. Quando apropriado, cloranfenicol (Cm, 5,0 µg/ml) e Em (50 µg/ml ou 150 µg/ml) foram usados

15 para seleção. Foram determinadas unidades formadoras de colônias (UFC) por ml com diluições adequadas em caldo MRS 10% usando um "Whitley Automatic Spiral Plater" (Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, England).

**Tabela 5. Cepas bacterianas e plasmídeos usados**

Cepa	Origem ou características relevantes	Fonte ou referência
<i>L. acidophilus</i>		
NCFM	Isolado intestinal humano	(24)
NCK 1392	NCFM contendo pTRK669	(22)
NCK 1818	NCFM contendo eliminação luxS	Este estudo
NCK 1758	NCFM com <i>labT</i> inativado por inserção	(10)
NCK 235	<i>Lactobacillus delbruekii</i> usado como cepa indicadora em ensaio	ATCC 4797

	de bacteriocina	
<i>V. harveyi</i> BB170	<i>LuxN</i> : :Tn5 AI-I sensor <sup>-</sup> AI-2 sensor <sup>+</sup>	(26)
<i>E. coli</i> EC1000	RepA <sup>+</sup> MC1000, Km <sup>r</sup> , que carrega uma única cópia do pWV01 <i>repA</i> ; hospedeiro para plasmídeos baseados em pOR128	(18)
Plasmídeos pORI28	Em <sup>r</sup> , ori (pWV01), se replica apenas com <i>repA</i> fornecido em <i>trans</i>	(18)
pTRK669	ori (pWV01), Cm <sup>r</sup> , RepA <sup>+</sup>	(22)
pTRK884	pORI28 ligado a <i>luxS</i> contendo uma eliminação de 97 bp e introduzido sítio de restrição EcoRI	Este estudo

#### Técnicas de manipulação de DNA

DNA genômico total de *Lactobacillus* foi isolado de acordo com o método de Walker e Klaenhammer (31). Foram utilizados protocolos padronizados para restrição por endonuclease, ligação, modificação e transformação de DNA (23). As preparações de plasmídeos com a finalidade de rastrear transformantes de *E. coli* seguiram o método de Zhou e cols. (37). Preparações de plasmídeos em larga escala foram realizadas com o kit "QIAprep Spin" de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN Inc., Valencia, CA). As PCRs foram efetuadas de acordo com as recomendações

do fabricante usando um sistema de PCR de Taq DNA polimerase (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Os iniciadores de PCR foram sintetizados por "Integrated DNA Technologies" (Coralville, IA) e, quando apropriado, foram projetados sítios de restrição na extremidade 5' dos iniciadores para facilitar futuras etapas de clonagem. Foram extraídos fragmentos de DNA de géis de agarose 1,0% usando o kit de recuperação "Zymoclean Gel DNA Recovery kit" (Zymo Research, Orange, CA). Foram preparadas células de *Lactobacillus* eletro-competentes como descrito por Walker e cols. (30). A hibridização Southern de DNA genômico foi realizada usando protocolos padronizados.

**Tabela 6. Iniciadores usados neste estudo**

Iniciador	Seqüência <sup>a</sup>
LuxS-EF	5' - GATCTCTAGATGACAGAAGACGATGAATG -3' (Id. de Seq. N°: 25)
LuxS-ER	5' - GATCAGATCTATTGCGACTAAGTTCAGAC -3' (Id. de Seq. N°: 26)
LuxS-delF	5' - GATCGAATTCTCGTTCGGTTGAACTAAACGTAAGTC -3' (Id. de Seq. N°: 27)
LuxS-delR	5' - GATCGAATTCCGAACAGGATTCCACCTAATCGTTTG - 3' (Id. de Seq. N°: 28)
LuxS-XXF	5' - GCCAACTTAGCCTTAAGCACTC -3' (Id. de Seq. N°: 29)
LuxS-XXR	5' - TTGTTCTGCTCCTCAGCCTTC -3' (Id. de Seq. N°: 30)
LuxS-delNF	5' - TGCTTTAGCAACTTCAGTAG -3' (Id. de Seq. N°: 31)
LuxS-delNR	5' - TAAAGTTAAGGCACCTTACG -3' (Id. de Seq. N°: 31)

<sup>a</sup> Sítios de enzima de restrição usados para clonagem estão sublinhados.

#### Inativação de LuxS sem marcador

Uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup> de *L. acidophilus* NCFM foi  
5 construída por eliminação de 97 bp dentro de *luxS* (LBA1081)  
de acordo com os protocolos descritos previamente (2, 6).  
Resumidamente, um fragmento de 1,243 bp contendo *luxS* foi  
amplificado usando iniciadores LuxS-EF e LuxS-ER (Tabela  
6). Cada fragmento foi subseqüentemente ligado a pORI28,  
10 nos sítios XbaI e BgIII. Os transformantes foram  
selecionados em *E. coli* EC1000 e pORI::LuxSbig foi isolado.  
Foi realizada PCR Inversa ("Expand High Fidelity PCR  
system", Roche Applied Science, Indianapolis, IN) naquele  
plasmídeo usando iniciadores LuxS-delF e LuxS-delR (Tabela  
15 6), cada um contendo sítios de reconhecimento de enzima  
EcoRI na extremidade 5'. O produto de PCR de 2,7 kbp  
resultante foi limpo usando o kit de purificação de PCR  
Qiagen, e digerido por 18 horas a 37°C com EcoRI. Após  
purificação em gel com o kit de recuperação "Zymoclean Gel  
20 DNA Recovery Kit" (Zymogen), o produto foi ligado a ele  
próprio por 16 horas a 16°C. O plasmídeo resultante,  
pTRK884, foi então transformado em *E. coli* EC1000, e a  
construção do plasmídeo foi confirmada com amplificação por  
PCR. *L. acidophilus* NCFM contendo o plasmídeo auxiliar  
25 sensível à temperatura, pTRK669, foi então eletro-  
transformado com pTRK884 e integrantes selecionados de  
acordo com o método descrito previamente por Russell e  
Klaenhammer (22). Os integrantes selecionados foram  
passados seis vezes em meios não seletivos para permitir a

ocorrência do segundo evento de entrecruzamento, e depois plaqueados em MRS desprovido de antibióticos. As colônias foram rastreadas quanto à sensibilidade a Em, e a PCR da colônia realizada com a utilização de iniciadores LuxS-delNF e LuxS-delNR, flanqueando a região eliminada. A amplificação por PCR da região eliminada e ensaios de hibridização *Southern* usando um fragmento interno de luxS como sonda confirmaram a eliminação por meio de substituição de gene em NCK1818.

10 Até recentemente, a inativação gênica sítio-específica em lactobacilos era realizada com o uso de estratégias de integração de plasmídeos. A manutenção da integração de plasmídeo exige crescimento em meios seletivos. No entanto, tanto a integração de plasmídeo quanto o crescimento  
15 seletivo podem influenciar os resultados da expressão gênica obtidos por análise de microarranjo. Dessa forma, foi usada uma estratégia sem marcador para inativar luxS (LBA1081) em *L. acidophilus* NCFM usando uma abordagem de recombinação homóloga com entrecruzamento duplo. O gene  
20 luxS da cepa mutante resultante, NCK1818, era desprovido de uma região interna de 97 bp, e continha um sítio de restrição EcoRI adicional. A região de eliminação foi selecionada para romper o quadro de leitura e resulta em um produto gênico não funcional. A substituição gênica foi  
25 confirmada por análise por PCR da região eliminada e hibridização *Southern* usando um fragmento interno de luxS como sonda. NCK1818 era sensível a Em e não produziu AI-2, como determinado pelo ensaio de repórter de *V. harveyi* (5). Previamente, o padrão de expressão de AI-2 por *L.*  
30 *acidophilus* NCFM foi determinado com a utilização de um

mutante de integração *luxS* como controle negativo (8). O mesmo padrão de produção de AI-2 durante o crescimento de *L. acidophilus* NCFM foi observado com o uso de NCK1818 como controle negativo.

## 5 Detecção de AI-2

A detecção de auto-indutor-2 do sobrenadante de cepas bacterianas selecionadas foi realizada como descrito previamente (8). Resumidamente, os sobrenadantes de populações bacterianas coletadas em cada ponto do tempo especificado foram ajustados até o pH 6,5 com 2 N de NaOH, e filtrados através de uma membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . A cepa repórter de *Vibrio harveyi* BB170 (3) cresceu de um dia para o outro em meio de bioensaio de auto-indutor (AB), foi lavada e ressuspensa em AB fresco até  $\text{OD}_{600}$  0,5. Dez  $\mu\text{l}$  de sobrenadante estéril da cultura de teste foram misturados com 90  $\mu\text{l}$  de uma diluição 1/1.000 da cepa repórter BB170 em cada poço de uma placa de 96 poços. A luminescência foi medida a 30°C a cada 10 minutos por 6 horas em uma leitora de placa de microtitulação fluorescente (FLOUStar Optima, BMG Technologies, Durham, NC). O aumento da indução foi calculado obtendo-se a média de pelo menos 6 pontos do tempo padronizados pela curva de luminescência de *V. harveyi* e dividindo-se o valor médio obtido pelo tipo selvagem pelo valor médio obtido pelo mutante  $\text{LuxS}^-$ . Os pontos do tempo foram selecionados quando a luminescência estava em um nível constante, antes de a cepa repórter ter respondido à produção de seu próprio AI-2. Cada amostra foi medida em pelo menos 3 poços independentes, e cada ponto dos dados representa 2 experimentos independentes (Tabela 7).

### Isolamento de RNA

Tanto *L. acidophilus* NCFM quanto NCK1818 foram transferidos duas vezes de culturas de estoque congeladas em meio semidefinido usando galactose como fonte primária de carbono para evitar a repressão de catabólito por glicose do operon *lux* na cepa repórter de *V. harveyi*. Uma cultura de 400 ml de ambas as cepas foi inoculada a 1% de uma fase cultura de estacionária (16 horas) e permitiu-se o crescimento a 37°C. Em OD<sub>600</sub> 0,2, uma amostra de 5 ml foi obtida para determinação de UFC e medida do pH. Seis amostras de 10 ml de cada cepa foram então resfriadas rapidamente em gelo seco, e os péletes celulares coletados a 4°C por centrifugação por 10 minutos a 3.150 x g. O sobrenadante de cada cepa após centrifugação em cada ponto do tempo foi retido para detecção de AI-2. Nos dois pontos de amostragem finais (OD<sub>600</sub> 0,7 e OD<sub>600</sub> 1,2), foram recolhidas amostras de 5 ml de cada cultura para plaqueamento e determinação do pH; duas amostras de 10 ml foram então coletadas de cada cultura, e tratadas como descrito acima. O isolamento de RNA de péletes celulares foi realizado como descrito previamente (3) usando TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD). A pureza e a concentração de RNA foram determinadas por eletroforese em géis de agarose 1,0% e medidas padronizadas com espectrofotômetro. O RNA foi isolado de duas réplicas biológicas de ambas as cepas.

**Tabela 7 Condições de cultura de populações celulares coletadas para análise de microarranjo<sup>a</sup>**

OD <sub>600</sub>	UFC/ml (± DP)	Atividade de AI-2 (± DP)	PH (± DP)
-------------------	---------------	-----------------------------	-----------

---

0,2	$3,26 \times 10^6$	$(\pm 4,27 \times 10^5)$	2,27	$(\pm 0,09)$	6,08	$(\pm 0,04)$
0,7	$2,67 \times 10^7$	$(\pm 3,13 \times 10^6)$	10,78	$(\pm 0,60)$	5,35	$(\pm 0,13)$
1,2	$7,81 \times 10^7$	$(\pm 1,22 \times 10^7)$	30,13	$(\pm 0,25)$	4,89	$(\pm 0,12)$

---

<sup>a</sup> Todos os valores representam a média e um desvio padrão calculados a partir de dados combinados obtidos de *L. acidophilus* NCFM e NCK1818 em três experimentos independentes.

## 5 Produção de cDNA e hibridização de microarranjo

A análise da expressão gênica da cepa mutante LuxS<sup>-</sup> e da cepa do tipo selvagem em cada um dos três pontos de amostragem selecionados foi realizada com a utilização de um microarranjo de DNA de todo o genoma (3). Os produtos de PCR de 1.889 ORFs previstos do genoma de *L. acidophilus* NCFM (1) foram *spotted* em triplicata em lâminas de vidro "ULTRA GAPS" (Corning Inc., Acton, MA). A síntese e a marcação do cDNA da primeira fita foram efetuadas com o sistema de marcação "SuperScript Indirect cDNA Labeling System" (Invitrogen). Resumidamente, quantidades iguais (20 µg) de RNA foram marcadas com aminoalil por transcrição reversa com hexâmeros aleatórios na presença de nucleotídeos modificados com amino, usando transcriptase reversa SuperScript III a 42°C por 3 horas. O cDNA da primeira fita foi purificado com colunas S.N.A.P., precipitado, marcado com ésteres de Cy3 ou Cy5 ativados por N-hidroxisuccinimida (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ), e purificado novamente com colunas S.N.A.P. O cDNA marcado resultante foi hibridizado sobre lâminas de microarranjo de acordo com os protocolos apresentados por TIGR (www.tigr.org/tdb/microarray/protocolsTIGR.shtml). As

hibridizações foram realizadas de acordo com um padrão único *round-robin*, de forma que todas as comparações possíveis de pareamento direto fossem feitas em um design não equilibrado. Foi feito um total de quinze hibridizações diferentes em três pontos de amostragem diferentes ( $OD_{600}$  0,2, 0,7 e 1,2) e duas cepas diferentes (*L. acidophilus* NCFM e NCK1818).

#### **Análise dos dados de microarranjo**

As intensidades de fluorescência foram adquiridas com o uso de um scanner de microarranjo "General Scanning ScanArray 4000" (Packard Biochip BioScience, Biochip Technologies LLC, Mass.) e processadas como imagens TIFF. As intensidades dos sinais foram quantificadas, incluindo a saturação de fundo, e foram obtidas médias dos *spots* replicados com o uso da suíte de programas "QuantArray 3.0" (Packard BioScience). Os dados brutos de intensidade resultantes foram importados em SAS (SAS Institute, Cary, NC), transformados para  $\log_2$  e ajustados para análise de variância de modelo misto de normalização (ANOVA) e fim de centralizar os dados para a intensidade média. Um ANOVA de modelo misto gene-específico foi então realizado nos dados normalizados em que o corante, a cepa e o tempo foram considerados efeitos fixos, e o efeito do arranjo foi considerado um efeito aleatório (34). A diferença resultante entre as estimativas do quadrado mínimo para dois tratamentos diferentes é análoga à proporção transformada para  $\log_2$  da expressão gênica entre aqueles dois tratamentos. Foram calculadas diferenças para efeito do corante, efeito da cepa, efeito do tempo e para o efeito combinado de cepa e tempo,  $cepa \times tempo$ . Foi realizado um

teste  $t$  usando essas diferenças e seus erros-padrão, com  $P < 0,05$  considerado significativo. Foram construídos gráficos Volcano para cada comparação usando a estimativa e  $-\text{Log}_{10}$  (valor  $P$ ) com JMP 5.0 (SAS Institute) a fim de  
5 visualizar o contraste entre tratamentos e significância estatística dos resultados.

A fim de estudar os genes expressos diferencialmente em resposta à produção de LuxS, foi desenvolvido um design de microarranjo que examinasse as diferenças na expressão  
10 entre o tipo selvagem e LuxS<sup>-</sup> mutante na fase de crescimento inicial, média ou tardia - exponencial. A produção de AI-2 durante o crescimento foi determinada previamente para *L. acidophilus* NCFM (8). A partir desses dados, foram selecionados três pontos de crescimento para  
15 isolamento de RNA: OD<sub>600</sub> 0,2, antes de o AI-2 ter se acumulado; OD<sub>600</sub> 0,7, durante a produção rápida de AI-2; e OD<sub>600</sub> 1,2, quando a produção de AI-2 fica lenta e o nível de AI-2 no sobrenadante permanece elevado, mas constante. O RNA foi isolado por ambas as cepas em cada ponto do tempo,  
20 em duplicata, e a atividade de AI-2 determinada usando o ensaio de repórter de *V. harveyi*. No total, foram comparados seis pontos entre eles em todos os pares de comparações possíveis (15 hibridizações). A análise dos dados de expressão foi realizada usando um ANOVA de modelo  
25 misto em dois estágios e as proporções da média do quadrado mínimo foram consideradas significativas com um aumento de 1,8 vezes e  $P < 0,05$  (Tabela 9).

Cada ORF expresso diferencialmente nos primeiros dois pontos do tempo foi agrupado de acordo com sua  
30 classificação COG (Fig. 8). As duas classificações COG com

o maior número de genes superexpressos em NCFM, totalizando 42% do total, foram da estrutura e biogênese ribossômica de tradução (J) e de replicação, recombinação e reparo (L). Em contraste, 40% dos genes superexpressos no mutante LuxS<sup>-</sup> foram categorizados como função desconhecida (S). A expressão aumentada de genes relacionados ao crescimento e metabolismo normais em NCFM, comparado com o mutante LuxS, sugere que LuxS influencia positivamente a expressão de muitos desses genes direta ou indiretamente. A partir desses dados, não está clara a função dos genes cuja expressão foi influenciada negativamente por LuxS. Não houve genes significativamente expressos diferencialmente sob as condições testadas em NCFM ou no mutante LuxS<sup>-</sup> em fase log tardio (OD<sub>600</sub> 1,2), quando o nível de AI-2 no meio não está mais crescendo.

Um design de microarranjo *round-robin* combinado com análise de modelo misto foi usado para comparar o efeito da cepa, tempo e o efeito combinado tanto da cepa quanto de tempo (cepa\*tempo) sobre a expressão gênica de *L. acidophilus* NCFM. Uma comparação cepa a cepa revelou que, antes de AI-2 começar a se acumular apreciavelmente no meio (OD<sub>600</sub> 0,2), 84 ORFs foram significativamente superexpressos em NCFM (Tabela 8a), enquanto somente 13 ORFs foram significativamente superexpressos no mutante LuxS<sup>-</sup> (Tabela 8b). Os genes mais altamente induzidos em NCFM, comparado com o mutante em fase log inicial (OD<sub>600</sub> 0,2), foram *relA* (3,14 vezes), supostamente relacionado à transdução de sinal, e *IF-2* (3,14 vezes), um suposto fator de iniciação da tradução. Na fase log médio (OD<sub>600</sub> 0,7), à medida que AI-2 se acumulava rapidamente, apenas 3 ORFs foram

significativamente superexpressos em NCFM (LBA1497, LBA1796, LBA1798) e 4 ORFs (LBA0026, LBA0089, LBA0568, e LBA1596) superexpressos no mutante LuxS<sup>-</sup>. Curiosamente, o único ORF que era significativamente expresso 5 diferencialmente nos dois primeiros pontos do tempo foi *labT* (LBA1796), um transportador ABC previamente implicado na exportação de bacteriocina (10). Na fase log inicial, *labT* foi superexpresso em NCFM 2,53 vezes, e, em fase log médio, ele foi superexpresso 2,10 vezes, comparado com o 10 mutante LuxS<sup>-</sup>. Um regulador da resposta (LBA1798), de um sistema regulador vizinho de dois componentes, também foi superexpresso em NCFM, comparado com o mutante em fase log médio. Em relação a esse fato, a cepa LuxS<sup>-</sup> foi analisada quanto à produção de bacteriocina, e constatou-se que ela 15 desencadeia o mesmo nível de produção de bacteriocina que o tipo selvagem. Adicionalmente, uma cepa mutante isogênica *labT* foi testada quanto à produção de AI-2, e verificou-se que ela produz AI-2 no mesmo nível que o tipo selvagem.

20 Tabela 8a. Classificação COG de genes expressos diferencialmente

Genes induzidos em <i>L. acidophilus</i> NCFM em fase log inicial (OD <sub>600</sub> 0,2)					
Anotação do gene <sup>a</sup>	ORF	Prop. <sup>b</sup>	Anotação do gene	ORF	Prop.
<i>Produção e conversão de energia</i>					
F1F0-ATPase subunidade a	LBA 0772	1,92	F1F0-ATPase subunidade d	LBA 0775	1,98
F1F0-ATPase subunidade c	LBA 0773	1,99	<i>LctP</i>	LBA 1768	1,97

<i>Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica</i>					
<i>spolHe</i>	LBA 0659	1,95	<i>EpsC</i>	LBA 1735	1,85
<i>ftsZ</i>	LBA 0812	2,18			
<i>Transporte e metabolismo de aminoácidos</i>					
<i>asd2</i>	LBA 0857	1,81	<i>pepP</i>	LBA 1336	2,50
<i>pepT</i>	LBA 1190	2,28			
<i>Transporte e metabolismo de nucleotídeos</i>					
<i>desoxirribose-p aldolase</i>	LBA 0391	2,24	UMP quinase	LBA 1268	2,46
<i>Transporte e metabolismo de carboidratos</i>					
<i>fosfoglucomutase</i>	LBA 0687	1,91	<i>treC</i>	LBA 1014	2,56
<i>Transporte e metabolismo de lipídeos</i>					
<i>thil</i>	LBA 0626	2,07	<i>fabG</i>	LBA 0662	2,28
<i>hmdH</i>	LBA 0627	2,15			
<i>Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas</i>					
<i>Trprs</i>	LBA 0209	1,94	<i>hemK</i>	LBA 0768	2,42
<i>meth-trna sintase</i>	LBA 0213	2,15	<i>pseudouridilato sintase</i>	LBA 0791	1,85
<i>proteína ribossômica S17</i>	LBA 0300	2,24	<i>trna sintase</i>	LBA 0817	1,93

proteína ribossômica L14	LBA 0301	2,34	<i>gida</i>	LBA 0982	2,00
proteína ribossômica L24	LBA 0302	2,53	tRNA ligase	LBA 1198	1,82
proteína ribossômica L36	LBA 0314	2,24	<i>rif</i>	LBA 1267	1,89
proteína ribossômica S13	LBA 0315	2,02	<i>miaA</i>	LBA 1503	1,94
tRNA pseudouridina sintase	LBA 0322	2,12	<i>pheS</i>	LBA 1518	2,31
<i>Amp<sup>M</sup></i>	LBA 0623	1,93	<i>leuS</i>	LBA 1617	1,80
<i>perf I</i>	LBA 0767	2,75	proteína de ligação de GTP	LBA 1824	2,20
<i>Transcrição</i>					
<i>gntR<sub>-</sub></i>	LBA 0393	2,09	<i>nusA</i>	LBA 1259	1,88
prot. de ligação de fibronectina	LBA 1148	1,84	<i>parB</i>	LBA 1828	2,52
<i>Replicação, recombinação e reparo</i>					
<i>recF</i>	LBA 0004	1,88	DNA primase	LBA 1197	2,66
<i>gyrA</i>	LBA 0006	1,89	transposase	LBA 1464	2,33
DNA polimer. III	LBA 0376	1,89	transposase	LBA 1487	1,92
<i>DnlJ</i>	LBA 0529	1,89	<i>dnaB</i>	LBA 1545	2,97

<i>uvrB</i>	LBA 0688	2,35	<i>mutM</i>	LBA 1549	1,90
<i>radC</i>	LBA 0797	2,02	transposase	LBA 1570	2,11
<i>uvrC</i>	LBA 0946	1,96	RNA helicase	LBA 0416	2,06
DNA topoisomerase	LBA 0981	1,87	<i>mutT</i> família proteína	LBA 0819	2,89
DNA topo. sub.B	LBA 1122	2,89			
<i>Biogênese da parede celular, membrana e envelope</i>					
<i>mraW</i>	LBA 0803	2,04	<i>epsB</i>	LBA 1736	1,98
<i>murG</i>	LBA 0809	2,16	<i>gidB</i>	LBA 1829	1,90
<i>bshA</i>	LBA 0892	1,94	<i>dltD</i>	LBA 1923	2,29
<i>eep</i>	LBA 1263	2,23			
<i>Modificação pós-tradução, turnover de proteínas, chaperonas</i>					
<i>clpC</i>	LBA 0283	2,05	<i>hslV</i>	LBA 0984	1,88
<i>radA</i>	LBA	2,04	<i>dnaK</i>	LBA	1,95
<i>clpX</i>	LBA 0847	2,49	<i>grpE</i>	LBA 1248	2,97
<i>Mecanismos de transdução do sinal</i>					
<i>luxS</i>	LBA 1081		<i>relA</i>	LBA 0932	

<i>phoH</i>	LBA 1203				
<i>Mecanismos de defesa</i>					
<i>labT</i>	LBA 1796	2,53	permease	LBA 1839	2,36
<i>Função geral ou função desconhecida</i>					
suposta proteína de transporte	LBA 0635	2,07	diidroacetona quinase	LBA 1310	1,81
suposta hidrolase	LBA 0796	1,97	helicase	LBA 1676	2,39
proteína de ligação de GTP	LBA 0947	2,46	transportador ABC	LBA 1783	2,25
oxidoreductase	LBA 0950	2,39	serina/treonina proteína quinase	LBA 1317	1,85
fosfoglicerato desidrogenase	LBA 0969	2,05	hipotética	LBA 1191	2,04
O-GlcNAc transferase	LBA 0971	1,85	proteína conservada hipotética	LBA 1204	2,10
proteína conservada hipotética	LBA 1202	2,70	hipotética	LBA 1823	1,88

<sup>a</sup> Suposta identificação por anotação manual para aquele gene ou ORF

<sup>b</sup> Proporção de médias de quadrados mínimos de estimativas  $\log_2$  entre *L. acidophilus* NCFM do tipo selvagem e a cepa mutante LuxS<sup>-</sup>. A proporção de corte para a diferença do aumento foi de 1,8 e  $P < 0,05$ .

Tabela 8b. Classificação COG de genes expressos

diferencialmente

Genes induzidos em <i>L. acidophilus</i> NCFM comparados com NCK1818 em fase log médio (OD <sub>600</sub> 0.7)		
Anotação do gene <sup>a</sup>	ORF	Proporção <sup>b</sup>
<i>Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica</i>		
desconhecido	LBA 1497	1,94
<i>Transcrição</i>		
regulador de resposta	LBA 1798	1,92
<i>Mecanismos de defesa</i>		
<i>labT</i>	LBA 1796	2,11
Genes reprimidos em <i>L. acidophilus</i> NCFM comparados com NCK1818 em fase log inicial (OD <sub>600</sub> 0,2)		
<i>Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica</i>		
hipotético	LBA 1156	0,53
<i>Transporte e metabolismo de aminoácidos</i>		
<i>ansA</i>	LBA 1687	0,51
<i>Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas</i>		
prot. rib. L11	LBA 0359	0,52

seril-trna sintase	LBA 1626	0,52
canamicina quinase	LBA 1348	0,54
<i>Modificação pós-tradução, turnover de proteínas, chaperonas</i>		
Tioredoxina redutase	LBA 0422	0,51
<i>Transporte e metabolismo de íons inorgânicos</i>		
proteína de captação de K <sup>+</sup>	LBA 0166	0,47
transportador ABC	LBA 0154	0,54
<i>Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários</i>		
hipotético	LBA 0644	0,53
<i>Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular</i>		
hipotético	LBA 0448	0,52
<i>Função geral ou função desconhecida</i>		
hipotético	LBA 0031	0,50
cons. hipotético	LBA 0217	0,50
hipotético	LBA 0690	0,53

desconhecido	LBA 1127	0,53
<i>LysM</i>	LBA 1850	0,51
cons. Hipotético	LBA 0100	0,55
<b>Genes reprimidos em <i>L. acidophilus</i> NCFM comparados com NCK1818 em fase log médio (OD<sub>600</sub> 0,7)</b>		
<i>Transcrição</i>		
<i>CadX</i>	LBA 0022	0,55
<i>DinG</i>	LBA 1164	0,55
<i>Função geral ou função desconhecida</i>		
malato permease	LBA 0568	0,49
hipotético	LBA 0026	0,53
cons. hipotético	LBA 0089	0,50
desconhecido	LBA 0883	0,55
desconhecido	LBA 1596	0,51

<sup>a</sup> Suposta identificação por anotação manual para aquele gene ou ORF

<sup>b</sup> Proporção de médias de quadrados mínimos de estimativas log<sub>2</sub> entre *L. acidophilus* NCFM do tipo selvagem

e a cepa mutante LuxS<sup>-</sup>. A proporção de corte para a diferença do aumento foi de 1,8 e  $P < 0,05$ .

Tabela 9. Resultados do microarranjo

Proporção Log <sub>2</sub>	Neglog10 P	ORF	Induzido por LuxS a OD 0,2	Classificação COG
0,908863	2,789058	4	recF_4	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,91857	2,412259	6	gyrA_6	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,906325	2,535795	157	[hipo]_157	
0,952818	2,560997	209	trprs_209	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,102485	2,964208	213	meth-trna sintase_213	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,034335	2,704386	283	clpC_283	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
1,161939	2,064488	300	prot. rib. S17_300	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas

1,226609	2,042745	301	prot. rib. L14_301	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,338589	2,269549	302	prot. rib. L24_302	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,161217	2,172414	314	prot. rib. L36_314	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,013961	1,807102	315	prot. rib. S13_315	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,082782	3,417382	322	TRNA pseudouridina sintase_322	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,028134	3,713038	346	radA_346	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
0,919267	2,837944	376	DNA polimer. III_376	[L] Replicação, recombinação e reparo
1,16463	3,348315	391	desoxirribose-p	[F] Transporte e

			aldolase_391	metabolismo de nucleotídeos
1,066688	3,273812	393	gntR_393	[K] Transcrição
1,043288	2,293597	416	RNA helicase_416	[L] Replicação, recombinação e reparo [K] Transcrição [J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
0,916647	2,631659	529	dnlJ_529	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,947941	2,281472	623	ampM_623	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,049686	2,779361	626	thil_626	[I] Transporte e metabolismo de lipídeos
1,102867	3,798347	627	hmdH_627	[I] Transporte e metabolismo de lipídeos
1,051708	3,163317	635	prot. transp._635	[R] Função geral - apenas previsão
0,96165	2,960769	659	spollle_659	[D] Controle do ciclo celular,

				divisão celular, divisão cromossômica
1,189911	2,670923	662	fabG_662	[I] Transporte e metabolismo de lipídeos [Q] Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários [R] Função geral - apenas previsão
0,934721	2,563706	687	fosfoglucomutase_6 87	[G] Transporte e metabolismo de carboidratos
1,23033	3,536662	688	uvrB_688	[L] Replicação, recombinação e reparo
1,459675	4,012875	767	pcrf 1_767	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,272925	3,062158	768	hemK_768	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
0,937439	1,518881	772	f1f0-subunidade a_772	[C] Produção e conversão de

				energia
0,990013	1,729401	773	f1f0-subunidade c_773	[C] Produção e conversão de energia
0,986363	2,065649	775	f1f0-atpase d_775	[C] Produção e conversão de energia
0,890224	3,276722	791	pseudouridilato sintase_791	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
0,97628	2,169948	796	[hidrolase]_796	[R] Função geral - apenas previsão
1,01383	2,563551	797	radC_797	Replicação, recombinação e reparo
1,027217	2,27023	803	mraW_803	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
1,11393	3,597361	809	murG_809	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
1,123854	2,793074	812	ftsZ_812	[D] Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão

				cromossômica
0,947385	2,926403	817	trna sintase_817	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,532751	3,25757	819	[mutT fam.]_819	[L] Replicação, recombinação e reparo [R] Função geral - apenas previsão
1,315755	2,996801	847	clpX_847	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
0,85508	1,789406	857	asd2_857	[E] Transporte e metabolismo de aminoácidos
0,952627	1,944032	892	Ser - sal biliar hidrolase	
1,653786	3,607024	932	relA_932	[T] Mecanismos de transdução de sinal [K] Transcrição
0,971224	2,878558	946	uvrC_946	[L] Replicação, recombinação e reparo
1,296349	3,086563	947	prot. de ligação de GTP_947	[R] Função geral - apenas

				previsão
1,254893	3,559454	950	oxidoreductase_950	[R] Função geral - apenas previsão
1,036386	2,163564	969	fosfoglicerato desidrogenase_969	[R] Função geral - apenas previsão
0,885552	2,936481	971	[O-GlcNAc transferase]_971	[R] Função geral - apenas previsão
0,900508	2,247997	981	DNA topoisomerase_981	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,996435	3,260872	982	gidA_982	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
0,910308	2,240629	984	hsIV_984	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
1,353333	3,018549	1014	treC_1014	[G] Transporte e metabolismo de carboidratos
0,927704	2,595697	1081	luxS_1081	[T] Mecanismos de transdução de sinal
1,531752	4,144249	1122	DNA topo.	[L] Replicação,

			sub.B_1122	recombinação e reparo
0,883132	2,452041	1148	prot. de ligação de fibronectina_1148	[K] Transcrição
1,191554	2,814596	1190	pepT_1190	[E] Transporte e metabolismo de aminoácidos
1,028381	2,091427	1191	prot. hip._1191	[S] Função desconhecida
1,410457	3,521746	1197	DNA primase_1197	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,863943	1,567874	1198	tRNA ligase_1198	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,434644	3,023855	1202	[prot. hipo. cons.]_1202	[R] Função geral - apenas previsão
1,165812	2,784708	1203	phoH_1203	[T] Mecanismos de transdução de sinal
1,067024	2,314515	1204	[prot. hipo. cons.]_1204	[S] Função desconhecida
0,964942	2,007406	1247	dnaK_1247	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína,

				chaperonas
1,572382	3,321345	1248	grpE_1248	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
1,654133	3,369962	1255	IF2_1255	Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
0,912588	2,132805	1259	nusA_1259	Transcrição
1,159717	4,364846	1263	eep_1263	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
0,918947	2,23504	1267	Rrf_1267	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,299436	2,811626	1268	UMP quinase_1268	[F] Transporte e metabolismo de nucleotídeos
0,856016	1,950837	1310	diidroacetona quinase_1310	[R] Função geral - apenas previsão
0,883897	3,248319	1317	serina/treonina prot. quinase_1317	[R] Função geral - apenas previsão [T] Mecanismos de

				transdução de sinal [K] Transcrição [L] Replicação, recombinação e reparo
1,31915	3,478031	1336	PepP_1336	[E] Transporte e metabolismo de aminoácidos
1,218258	2,953197	1464	[transposase]_1464	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,943904	2,598181	1487	transposase_1487	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,959417	3,053409	1503	miaA_1503	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,208877	2,306305	1518	pheS_1518	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,570846	4,172276	1545	dnaB_1545	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,927818	2,828632	1549	mutM_1549	[L] Replicação, recombinação e reparo

1,075383	2,390169	1570	>>transposase para 1569<< 1570	[L] Replicação, recombinação e reparo
0,851554	1,960626	1617	leuS_1617	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
1,255148	3,232223	1676	helicase_1676	[R] Função geral - apenas previsão
0,883658	2,930052	1735	epsC_1735	[D] Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica
0,986686	2,513637	1736	epsB_1736	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
0,977143	2,051172	1768	IctP_1768	[C] Produção e conversão de energia
1,170425	2,543868	1783	Transportador ABC_1783	Função geral - apenas previsão
1,340554	3,77469	1796	plnG_1796	[V] Mecanismos de defesa
0,906982	2,589276	1823	[hipo]_1823	Função desconhecida
1,138859	3,244559	1824	Proteína de	Tradução,

			ligação de GTP_1824	estrutura e biogênese ribossômicas
1,330758	3,754055	1828	parB_1828	Transcrição
0,923493	3,168131	1829	gidB_1829	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
1,24023	3,628774	1839	[permease]_1839	[V] Mecanismos de defesa
1,194538	2,650976	1923	ditD_1923	[M] Biogênese da parede celular, membrana e envelope
1,139065	3,220796	1927	[hipo.cons.]_1927	
			<b>Induzidos por LuxS em OD 0,7</b>	
0,959451	2,040127	1497	[desconhecido]_ 1497	[D] Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica
1,078681	3,075442	1796	pinG_1796	[V] Mecanismos de defesa
0,940321	2,056627	1798	Regulador da resposta _1798	[K] Transcrição [T] Mecanismos de transdução de

				sinal
			<b>Reprimidos por LuxS em OD 0,2</b>	
-0,99406	2,384669	31	prot. hip._31	Função geral - apenas previsão
-0,87543	2,238665	100	>>[hip. cons.]<<_100	
-0,88016	1,472098	154	Transportador ABC_154	[P] Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
-1,09721	3,710204	166	Proteína de captção de K <sup>+</sup> _166	[P] Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
-0,99234	2,213327	217	[prot. hipo. Cons.]_217	Função desconhecida
-0,9436	1,630565	359	Prot. rib. L11_359	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
-0,9722	2,001816	422	tioered. redutase_422	[O] Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas [C] Produção e conversão de energia

-0,94949	2,438256	448	[hipo]_448	[U] Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular
-0,90283	1,84467	644	[hipo]_644	[Q] Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários
-0,92823	2,588025	690	[hipo]_690	[S] Função desconhecida
-0,90539	2,396951	1127	[desconhecido]_1127	
-0,90928	1,738096	1156	[hipo]_1156	[D] Controle do ciclo celular, divisão celular, divisão cromossômica
-0,87686	2,866565	1348	canamicina quinase_1348	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
-0,95519	1,777933	1626	seril-trna sintase_1626	[J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
-0,9827	3,538901	1687	ansA_1687	[E] Transporte e metabolismo de

				aminoácidos [J] Tradução, estrutura e biogênese ribossômicas
-0,9703	1,981019	1850	[lysM]_1850	
			<b>Reprimidos por LuxS em OD 0,7</b>	
-0,864	2,209396	22	CadX_22	[K] Transcrição
-0,92222	1,848892	26	[hipo]_26	SPy2166
-1,006	2,026077	89	[hipo cons.]_89	
-1,02247	2,659564	568	malato permease_568	[R] Função geral - apenas previsão
-0,85612	1,659479	883	[desconhecido]_883	
-0,8652	2,413007	1095	dinG_1164	[K] Transcrição [L] Replicação, recombinação e reparo
-0,95934	1,583834	1596	:: [desconhecido] ::	

A trealose hidrolase, *treC* (LBA1014), foi superexpressa 2,56 vezes em NCFM, comparada com a cepa mutante *LuxS*<sup>-</sup> em fase log inicial. Pesquisa prévia relatou crescimento deficiente em trealose de um mutante de *L. acidophilus* *TreC*<sup>-</sup> (11). Portanto, foi medida a taxa de crescimento máximo de *L. acidophilus* NCFM e do mutante *LuxS*<sup>-</sup> em meio mMRS contendo vários açúcares a fim de

determinar a possível influência de uma mutação *luxS* sobre a utilização de açúcar (Tabela 10). O crescimento não foi afetado pela mutação *luxS* quando as cepas cresciam em MRS ou mMRS contendo glicose ou trealose. No entanto, o mutante 5 *LuxS<sup>-</sup>* exibiu uma menor taxa de crescimento máximo, comparada com NCFM tanto em lactose quanto em sacarose.

**Tabela 10. Taxa de crescimento máximo específico ( $\mu \text{ h}^{-1}$ ) em várias fontes de carboidratos**

Meio		NCFM ( $\mu \pm \text{DP}$ )	<i>LuxS<sup>-</sup></i> ( $\mu \pm \text{DP}$ )
MRS		0,45 ( $\pm 0,005$ )	0,42 ( $\pm 0,006$ )
mMRS <sup>a</sup>	Glicose	0,34 ( $\pm 0,04$ )	0,32 ( $\pm 0,05$ )
mMRS <sup>a</sup>	Trealose	0,28 ( $\pm 0,003$ )	0,29 ( $\pm 0,02$ )
mMRS <sup>a</sup>	Lactose	0,28 ( $\pm 0,004$ ) *	0,19 ( $\pm 0,006$ )
mMRS <sup>a</sup>	Sacarose	0,33 ( $\pm 0,003$ ) *	0,23 ( $\pm 0,003$ )

\* Identifica taxas de crescimento significativamente 10 diferentes, como determinado pelo teste t de Student ( $P < 0,01$ )

<sup>a</sup> Composição do meio descrita acima

O perfil de transcrição de cada cepa da fase log inicial a tardio também foi examinado (Fig. 9). Um número 15 similar de genes, 27 em NCFM e 41 no mutante *LuxS<sup>-</sup>*, aumentou em expressão da fase log inicial a médio em ambas as cepas. A expressão de 12 genes aumentou em ambas as cepas, e incluiu genes do metabolismo de açúcar (LBA0874, LBA1012, LBA1812, e LBA1974), e um suposto antígeno que 20 apresenta reação cruzada com miosina (LBA555). Apenas 24 genes na cepa do tipo selvagem, comparados com 97 genes na cepa mutante, diminuíram em expressão da fase log inicial a médio. Novamente, da fase log médio a tardio, a expressão

de um número similar de genes aumentou em ambas as cepas, mas 45 genes diminuíram em expressão durante essa fase de crescimento no tipo selvagem, e somente 15 no mutante LuxS<sup>-</sup>. Esses resultados sugerem que AI-2 poderia ser responsável pelo aumento ou manutenção da expressão de genes durante os estágios iniciais de crescimento. Quando AI-2 está deficiente no meio, a expressão de um número significativo de genes parece estar diminuída durante a fase log inicial.

#### **Experimentos de estresse**

10 *L. acidophilus* NCFM e NCK1818 cresceram em caldo MRS a 37°C, até que a população alcançasse OD<sub>600</sub> 0,2, 0,7 e 1,2, e nesse ponto as células foram coletadas para experimentos de tolerância ao estresse.

15 *Tolerância à bile.* Nos pontos de amostragem predeterminados, cada cultura foi diluída e plaqueada em duplicata em ágar MRS suplementado com 0,75, 1,0, ou 2,0% p/p de Oxgall (BD Biosciences, San Jose, CA). As placas foram incubadas de forma anaeróbica por 48 horas, e foram calculados a UFC/ml e o percentual de sobrevivida. Cada  
20 ensaio foi realizado em triplicata.

*Tolerância ao calor.* Cada cepa cresceu em 250 ml de caldo MRS e, em cada ponto de amostragem, foram coletados 10 ml de células de cada população por centrifugação a 3.150 x g por 10 minutos a 21°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os péletes celulares ressuspensos em 10 ml de MRS fresco, pré-incubados a 55°C. Foram coletadas amostras em 0, 10, 20, 30 e 45 minutos, e elas foram diluídas e plaqueadas em duplicata. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

30 *Análise estatística.* Os dados obtidos dos experimentos

acima foram analisados usando o teste t de Student, com  $P < 0,05$  sendo considerado significativo.

Foi testado o envolvimento de LuxS com várias respostas ao estresse de *L. acidophilus* NCFM. O crescimento em ágar MRS suplementado com Oxgall 2,0% (bile fresca desidratada) diminuiu significativamente o crescimento do mutante LuxS<sup>-</sup>, comparado com NCFM, quando as populações bacterianas foram plaqueadas a OD<sub>600</sub> 0,2. Quando as células foram plaqueadas de populações de OD<sub>600</sub> 0,7, foi observada uma diminuição significativa no crescimento na cepa LuxS<sup>-</sup> em MRS suplementado com Oxgall 1,0%. As células coletadas do ponto do tempo final, OD<sub>600</sub> 1,2, não mostraram diferenças no crescimento em Oxgall (Fig 10). Esses resultados indicam que a produção de AI-2 correlaciona-se com a tolerância à bile pela fase log médio, mas à medida que a população de LuxS<sup>-</sup> alcança a fase estacionária, a sensibilidade à bile em função da ausência de AI-2 não está presente.

Adicionalmente, quando populações colhidas de OD<sub>600</sub> 0,2 e OD<sub>600</sub> 0,7 foram expostas ao estresse por calor de 55°C, o mutante LuxS<sup>-</sup> foi mais sensível (Figura 11). As populações de células do mutante LuxS<sup>-</sup> colhidas do ponto do tempo final, OD<sub>600</sub> 1,2, não evidenciaram uma diminuição significativa, quando comparadas com NCFM. Esse padrão de sobrevivência ao estresse por calor implica ainda mais o envolvimento de AI-2 com a resposta ao estresse durante as fases de crescimento de log inicial e médio, mas não à medida que a população se aproxima da fase de crescimento estacionário, quando as células eram inerentemente mais tolerantes ao calor.

30 **Produção de bacteriocina**

Cinco  $\mu$ l de *L. acidophilus* NCFM e NCK1818 foram espalhados sobre ágar MRS e incubados a 37°C de um dia para o outro em uma câmara anaeróbica. No dia seguinte, 100  $\mu$ l da cepa indicadora *Lactobacillus delbrueckii* (NCK235) foram  
5 adicionados a 10 ml de ágar revestido com MRS derretido (0,75% p/v) e derramados igualmente sobre a superfície da placa de ágar. Após 24 horas de incubação, foram avaliadas zonas de inibição que indicam atividade antagonística de lactacina B.

#### 10 **Curvas de crescimento**

*L. acidophilus* NCFM e NCK1818 foram transferidos três vezes de culturas de estoque congeladas em MRS e MRS modificado (mMRS). O meio mMRS usado neste estudo seguiu os ingredientes do MRS disponível comercialmente (Becton,  
15 Dickinson and Company, Sparks, MD), substituindo dextrose com 1% p/v de glicose, lactose, trealose ou sacarose. As curvas de crescimento foram realizadas a 37°C em placas de 96 poços (Corning) contendo 200  $\mu$ l de cada meio semidefinido suplementado ou caldo MRS. Permitiu-se que as  
20 culturas crescessem por 16 horas, e a OD<sub>600</sub> foi medida a cada 15 minutos em poços em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C, e o crescimento foi automaticamente monitorado pela determinação das alterações na A<sub>600</sub> como uma função do tempo usando uma leitora de placa de  
25 microtitulação "FLUOStar OPTIMA" (BMG Labtech). A taxa de crescimento específico máximo foi calculada a partir da inclinação de uma linha de regressão linear durante o crescimento exponencial com um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,99. Cada ponto representava a média de três  
30 culturas independentes.

## Conclusões

Este pedido é o primeiro a relatar uma análise da transcrição do régulon LuxS em diferentes estágios de crescimento. Estudos de microarranjo prévios da expressão gênica modulada por AI-2 estudavam a resposta de uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup> ao AI-2 exógeno (De Lisa, e cols. (2001) *Journal of Bacteriology* 183: 5.239-5.247), ou identificavam um único ponto de crescimento e analisavam a diferença de transcrição entre um mutante de inserção e o tipo selvagem (Merritt, e cols. (2003) *Infect Immun.* 71: 1.972-9; Wang, e cols. (2005) *Journal of Bacteriology* 187: 8.350-8.360; Yuan, e cols. (2005) *Infect. Immun.* 73: 4.146-4.154). Embora essas abordagens possam identificar com sucesso genes regulados por AI-2 em pontos isolados, o perfil de expressão representa somente uma visão instantânea do régulon LuxS. A fim de se obter uma compreensão mais completa da expressão gênica influenciada por LuxS, selecionamos três pontos do tempo ao longo da fase de crescimento de *L. acidophilus* NCFM para análise da transcrição. No primeiro ponto de amostragem, OD<sub>600</sub> 0,2, a atividade de AI-2 detectada nos meios de crescimento era mínima, uma vez que as populações estavam nos estágios iniciais da fase de crescimento logarítmico. O segundo ponto de amostragem, durante crescimento de log médio (OD<sub>600</sub> 0,7), foi obtido durante o acúmulo rápido de AI-2 no meio. As células foram coletadas em OD<sub>600</sub> 1,2, fase log tardio, para o ponto de amostragem final, que era aproximadamente 30 minutos após os níveis de AI-2 alcançarem seu pico no meio. Esses pontos foram escolhidos para representar a expressão gênica antes, durante e depois da produção de AI-

2, como descrito acima. A cepa LuxS<sup>-</sup> usada neste estudo era um mutante de eliminação de gene e, portanto, supostamente livre de quaisquer efeitos pleiotrópicos causados por integrações ou adição de componentes exógenos selecionados ao meio.

O maior número de genes expressos diferencialmente foi identificado durante a fase log inicial de crescimento. Um número relativamente elevado de genes foi induzido no tipo selvagem, comparado com a cepa LuxS<sup>-</sup>, indicando que AI-2 facilita a expressão de certos genes durante as fases iniciais de crescimento. A maioria desses genes foi relacionada à transcrição, tradução e replicação. Três genes (LBA772, LBA773, e LBA775) do operon que codifica a F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase (Mullen e Klaenhammer (1999) *Mol. Microbiol.* 33: 1.152-1.161) (LBA772-LBA779) foram superexpressos na cepa do tipo selvagem. A trealose hidrolase (*treC*, LBA1014) também aumentou a expressão no tipo selvagem, embora trealose não estivesse presente no meio. A ausência de AI-2 não afetou o crescimento de NCFM em trealose (Tabela 5), enquanto nem uma cepa mutante TreB<sup>-</sup> (transportador) nem TreC<sup>-</sup> foram capazes de crescer em trealose (Duong, e cols. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1.218-1.225). A expressão diferencial desses supostos sistemas de produção de energia associa LuxS ao crescimento e metabolismo. Resultados similares obtidos por DeLisa e cols. (2001, *Journal of Bacteriology* 183: 5.239-5.247) implicaram AI-2 à regulação da divisão celular, processamento de DNA e processos morfológicos.

Além do crescimento normal e de processos metabólicos, LuxS afetou a expressão de vários fatores da superfície

celular. Dois genes (LBA1735 e LBA1736) de um suposto operon de exopolissacarídeo (EPS) também foram expressos diferencialmente no tipo selvagem em fase log inicial. Uma suposta proteína de ligação de fibronectina, proteína essa que, conforme se constatou previamente, participa da adesão às células Caco-2 (Buck, e cols. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8.344-8.351), também foi induzida durante fase log inicial por AI-2. A fibronectina é um componente da matriz extracelular intestinal humana (ECM) e poderia ser um alvo para a adesão de células bacterianas no ambiente intestinal (Kapczynski e cols. (2000) *Curr. Microbiol.* 41: 136-41). Uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup> de *Lactobacillus reuteri* exibiu desempenho ecológico diminuído no trato gastrintestinal murídeo (Tannock, 2005, *supra*). A regulação da expressão de fatores da superfície celular no início da fase de crescimento pode pré-adaptar a bactéria à interação com uma comunidade microbiana diversa ou ao desempenho ecológico no trato intestinal.

Moléculas associadas à superfície celular de microorganismos intestinais são reconhecidas pelo hospedeiro e podem ser importantes tanto na resposta inflamatória quanto na manutenção da homeostasia intestinal (Rakoff-Nahoum, e cols. (2004) *Cell* 118: 229-241). Uma dessas moléculas da superfície bacteriana, o ácido lipoteicóico, está ligada à membrana celular e se estende através da parede celular para apresentar a si mesmo ao ambiente da bactéria. O gene *dltD* (LBA1923), um membro do operon *dlt* responsável pela D-alanação adequada de ácidos lipoteicóicos em lactobacilos, foi induzido na presença de LuxS na fase log inicial de crescimento. Quando um mutante

Dlt<sup>-</sup> de *Lactobacillus plantarum* foi exposto às células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), a secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-12 foi diminuída (Grangette, e cols. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 5 102: 10.321-10.326). A expressão de IL-10 pelos PBMCs era aumentada após exposição ao mutante Dlt<sup>-</sup>, desviando o perfil de citocina para uma resposta antiinflamatória. A regulação por AI-2 da estrutura desses ácidos lipoteicóicos poderia participar das interações hospedeiro-micróbio no 10 trato intestinal.

Acredita-se também que AI-2 participe da regulação de respostas ao estresse em bactérias (Wen, e cols. (2004) *J. Bacteriol.* 186: 2.682-91; Xavier, e cols. (2005) *J. Bacteriol.* 187: 238-248). Conseqüentemente, a expressão de 15 múltiplos genes supostamente relacionados às respostas ao estresse foi influenciada por AI-2, incluindo *dnaK* (LBA1247), *grpE* (LBA1248) e *clpX* (LBA847) envolvidos com a remoção de proteínas dobradas erroneamente e polipeptídeos prematuros produzidos durante o estresse por calor. A 20 análise da influência de AI-2 sobre a sobrevivência por estresse por calor revelou que, quando comparada com a cepa do tipo selvagem, a cepa mutante LuxS<sup>-</sup> de *L. acidophilus* NCFM era mais sensível ao estresse por calor de 55 °C (Fig 11). Essa sensibilidade só foi observada quando as 25 populações bacterianas eram estressadas da fase de crescimento de log inicial médio. Esses resultados são consistentes com a expressão aumentada dos genes da resposta ao choque térmico nos estágios iniciais do crescimento. Em um estudo recente de *Porphyromonas* 30 *gingivalis*, uma cepa mutante LuxS<sup>-</sup> foi mais resistente do

que o tipo selvagem ao estresse por calor (Xavier, 2005 *supra*), sugerindo uma alteração cepa-dependente da resposta ao estresse por AI-2.

Bactérias intestinais devem sobreviver à passagem  
5 através das condições hostis do trato gastrintestinal a fim de persistir no intestino. Um dos obstáculos que devem ser superados é a exposição à bile na região gástrica. Uma suposta hidrolase de sal biliar (LBA0892) foi induzida por LuxS em fase log inicial. A cepa mutante LuxS<sup>-</sup> foi testada  
10 quanto à sua tolerância à bile, e constatou-se que é mais sensível quando as culturas foram coletadas da fase log inicial ou médio de crescimento. Culturas coletadas da fase log tardio não exibiram diferenças na tolerância à bile em relação ao tipo selvagem. Esses resultados indicam que AI-2  
15 poderia atuar para preparar a célula para as condições estressantes ao influenciar positivamente a expressão de genes que têm uma função relacionada ao crescimento e à sobrevivência em diferentes condições ambientais.

Foi relatado que AI-2 é um fator sensível ao quorum  
20 que se acumula no ambiente à medida que a densidade celular aumenta, embora a fase de crescimento na qual AI-2 afeta a expressão gênica não tenha sido relatada. Nossos resultados sugerem que AI-2 atua sobre populações celulares nos estágios iniciais de crescimento logarítmico, antes do  
25 acúmulo apreciável de AI-2. O número elevado de genes que tiveram sua expressão diminuída da fase de crescimento de log inicial a log médio na cepa mutante LuxS<sup>-</sup>, comparada com o tipo selvagem, apóia a hipótese de que LuxS influencia positivamente a expressão gênica precocemente na  
30 fase de crescimento. Quando a expressão gênica foi

examinada por toda a fase de crescimento, pareceu que LuxS prepara a população para os estresses e para as condições interativas encontradas naturalmente durante crescimento planctônico. É evidente que AI-2 tem um impacto sobre a expressão de genes relacionados ao crescimento rápido e à resposta ao estresse de *L. acidophilus* NCFM, além de possivelmente influenciar interações hospedeiro-micróbio.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Buck, B. Logan  
Azcarate-Peril, M. Andrea  
Altermann, Eric  
Klaenhammer, Todd R.

<120> VIA SINTÉTICA DE AUTO-INDUTOR-2 EM BACTÉRIAS DE ÁCIDO LÁTICO

<130> 035051/308683

<150> 60/671,887  
<151> 2005-04-15

<160> 38

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1  
<211> 693  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus acidophilus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(693)  
<223> MTA/SAH nucleosidase (E.C.3.2.2.9) ORF Lba820

<400> 1

atg aag att gcg att atc gtt cca atg gct gaa gaa gct gaa ttt tat	48
Met Lys Ile Ala Ile Ile Val Pro Met Ala Glu Glu Ala Glu Phe Tyr	
1 5 10 15	
cgt aat cat ttc cat tca gaa aat aaa gaa atg ttc gga tca act gaa	96
Arg Asn His Phe His Ser Glu Asn Lys Glu Met Phe Gly Ser Thr Glu	
20 25 30	
ttc gaa cat ttt tct gtt aat ggc aat gat gta tat ttg ggt tta agt	144
Phe Glu His Phe Ser Val Asn Gly Asn Asp Val Tyr Leu Gly Leu Ser	
35 40 45	
ggt att ggt aaa gtc caa gca gct atg aat ctt tca agt ttg tta aca	192
Gly Ile Gly Lys Val Gln Ala Ala Met Asn Leu Ser Ser Leu Leu Thr	
50 55 60	
agt gtt gac ata gat gta ata ttt atg act ggt tca gct ggt gca ctt	240
Ser Val Asp Ile Asp Val Ile Phe Met Thr Gly Ser Ala Gly Ala Leu	
65 70 75 80	
aag gaa gat gtt cat caa gaa gat cta gtt tta cca aat gca ttt gcc	288
Lys Glu Asp Val His Gln Glu Asp Leu Val Leu Pro Asn Ala Phe Ala	
85 90 95	
tat tat gat gcc cat aat act gca gct ggt gat tat gta gaa gga caa	336
Tyr Tyr Asp Ala His Asn Thr Ala Ala Gly Asp Tyr Val Glu Gly Gln	
100 105 110	
att cct caa cag cca gct caa ttt gta ctt gat tca cca gag cgt gca	384
Ile Pro Gln Gln Pro Ala Gln Phe Val Leu Asp Ser Pro Glu Arg Ala	
115 120 125	

gct ttt gca aat tac tta aag aag caa aag gtt gct ttt cgt gaa gga 432  
 Ala Phe Ala Asn Tyr Leu Lys Lys Gln Lys Val Ala Phe Arg Glu Gly  
 130 135 140  
 ttg gtt gta aca ggt gat tca ttt att gct tca aat gag caa aaa gat 480  
 Leu Val Val Thr Gly Asp Ser Phe Ile Ala Ser Asn Glu Gln Lys Asp  
 145 150 155 160  
 atg ata aag aag aac ttt cca gat gcc tta tgt gtt gaa atg gaa gga 528  
 Met Ile Lys Lys Asn Phe Pro Asp Ala Leu Cys Val Glu Met Glu Gly  
 165 170 175  
 gca gct ttt gcg caa gtc gct aat gca ttt aag aaa cca tta gtt gct 576  
 Ala Ala Phe Ala Gln Val Ala Asn Ala Phe Lys Lys Pro Leu Val Ala  
 180 185 190  
 atg cga gca att tct gat aat ggt gat ggc tca gct aac gaa gac ttt 624  
 Met Arg Ala Ile Ser Asp Asn Gly Asp Gly Ser Ala Asn Glu Asp Phe  
 195 200 205  
 gat act ttt gta aag aaa gta gga gct aag gca gct aaa tta att agt 672  
 Asp Thr Phe Val Lys Lys Val Gly Ala Lys Ala Ala Lys Leu Ile Ser  
 210 215 220  
 gat tac gta gaa gag ttg aat 693  
 Asp Tyr Val Glu Glu Leu Asn  
 225 230

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 231

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 2

Met Lys Ile Ala Ile Ile Val Pro Met Ala Glu Glu Ala Glu Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 Arg Asn His Phe His Ser Glu Asn Lys Glu Met Phe Gly Ser Thr Glu  
 20 25 30  
 Phe Glu His Phe Ser Val Asn Gly Asn Asp Val Tyr Leu Gly Leu Ser  
 35 40 45  
 Gly Ile Gly Lys Val Gln Ala Ala Met Asn Leu Ser Ser Leu Leu Thr  
 50 55 60  
 Ser Val Asp Ile Asp Val Ile Phe Met Thr Gly Ser Ala Gly Ala Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Asp Val His Gln Glu Asp Leu Val Leu Pro Asn Ala Phe Ala  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Asp Ala His Asn Thr Ala Ala Gly Asp Tyr Val Glu Gly Gln  
 100 105 110  
 Ile Pro Gln Gln Pro Ala Gln Phe Val Leu Asp Ser Pro Glu Arg Ala  
 115 120 125  
 Ala Phe Ala Asn Tyr Leu Lys Lys Gln Lys Val Ala Phe Arg Glu Gly  
 130 135 140  
 Leu Val Val Thr Gly Asp Ser Phe Ile Ala Ser Asn Glu Gln Lys Asp  
 145 150 155 160  
 Met Ile Lys Lys Asn Phe Pro Asp Ala Leu Cys Val Glu Met Glu Gly  
 165 170 175  
 Ala Ala Phe Ala Gln Val Ala Asn Ala Phe Lys Lys Pro Leu Val Ala  
 180 185 190  
 Met Arg Ala Ile Ser Asp Asn Gly Asp Gly Ser Ala Asn Glu Asp Phe

	195					200						205				
Asp	Thr	Phe	Val	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Ile	Ser	
	210					215					220					
Asp	Tyr	Val	Glu	Glu	Leu	Asn										
225					230											

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 942

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(942)

&lt;223&gt; metiltransferase dependente de SAM ORF LBA931

&lt;400&gt; 3

atg	aaa	tta	ttg	att	att	aaa	att	gat	act	agt	tat	gaa	gta	gag	gat	48
Met	Lys	Leu	Leu	Ile	Ile	Lys	Ile	Asp	Thr	Ser	Tyr	Glu	Val	Glu	Asp	
1				5				10						15		
gca	tta	ggc	ggt	ttt	gca	act	gat	aat	tta	aaa	gcg	tta	ggc	att	gag	96
Ala	Leu	Gly	Val	Phe	Ala	Thr	Asp	Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Glu	
			20					25					30			
tcc	aga	aaa	cgt	agt	gat	ttt	gaa	caa	gct	ggt	tgg	tta	cat	gat	tca	144
Ser	Arg	Lys	Arg	Ser	Asp	Phe	Glu	Gln	Ala	Gly	Trp	Leu	His	Asp	Ser	
		35					40					45				
act	ggt	gta	gaa	atg	gat	gac	att	aaa	gac	ttg	cct	aaa	gat	act	tat	192
Thr	Val	Val	Glu	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	
	50					55					60					
ttt	tat	gct	tac	ttt	gat	gaa	gaa	gct	gat	aaa	gat	gag	ctt	gta	gag	240
Phe	Tyr	Ala	Tyr	Phe	Asp	Glu	Glu	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Leu	Val	Glu	
65					70					75				80		
aaa	ttt	caa	gca	aaa	ctt	gaa	gag	ctt	aag	agt	tat	ggt	tta	aat	act	288
Lys	Phe	Gln	Ala	Lys	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr	
				85					90					95		
ggt	gaa	ggt	aaa	att	aca	act	tct	tat	att	gaa	gat	caa	gat	tgg	aat	336
Gly	Glu	Gly	Lys	Ile	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp	Gln	Asp	Trp	Asn	
			100					105					110			
aca	gct	tgg	caa	aag	tat	tat	cat	gta	ata	gac	ttt	tcg	cgg	cac	tta	384
Thr	Ala	Trp	Gln	Lys	Tyr	Tyr	His	Val	Ile	Asp	Phe	Ser	Arg	His	Leu	
		115					120					125				
gct	att	ggt	cct	gaa	tgg	gaa	gat	tat	caa	cca	gct	ttt	agc	gat	caa	432
Ala	Ile	Val	Pro	Glu	Trp	Glu	Asp	Tyr	Gln	Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Gln	
	130					135					140					
caa	ctc	att	aag	ctt	gat	cca	ggt	tta	gca	ttc	ggt	aca	gga	aat	cat	480
Gln	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Pro	Gly	Leu	Ala	Phe	Gly	Thr	Gly	Asn	His	
145					150					155				160		
aaa	aca	act	caa	ttg	gca	atg	atg	gga	att	gag	cgt	gct	atg	gta	aaa	528
Lys	Thr	Thr	Gln	Leu	Ala	Met	Met	Gly	Ile	Glu	Arg	Ala	Met	Val	Lys	
				165				170						175		





ggt ggg gca tat atg gca gaa ggt ttt acc ggt gga ttt aat ggt gta 336  
 Gly Gly Ala Tyr Met Ala Glu Gly Phe Thr Gly Gly Phe Asn Gly Val  
                   100                                  105                                  110

act aag agc caa att aat agt ggt aag gct tta ggg atg aat aga tta 384  
 Thr Lys Ser Gln Ile Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Met Asn Arg Leu  
                   115                                  120                                  125

caa ctt gct aga tat gtt gtc ttt cca cag ggg gta gca ctc agt gta 432  
 Gln Leu Ala Arg Tyr Val Val Phe Pro Gln Gly Val Ala Leu Ser Val  
                   130                                  135                                  140

cca gca ctt gcc gcc aat ata atc ttt tta att aaa gaa aca tca atc 480  
 Pro Ala Leu Ala Ala Asn Ile Ile Phe Leu Ile Lys Glu Thr Ser Ile  
 145                                  150                                  155                                  160

ttt tct gtc att gca att cca gaa ttg act aac aca gcg atg gac ttg 528  
 Phe Ser Val Ile Ala Ile Pro Glu Leu Thr Asn Thr Ala Met Asp Leu  
                                   165                                  170                                  175

atc gga atg tat tat cgt tca aac gaa tac tta ttt atg ctg gta gtt 576  
 Ile Gly Met Tyr Tyr Arg Ser Asn Glu Tyr Leu Phe Met Leu Val Val  
                                   180                                  185                                  190

gca tat gca gta att ttg att cca tta att tta att tta aat tgg tta 624  
 Ala Tyr Ala Val Ile Leu Ile Pro Leu Ile Leu Ile Leu Asn Trp Leu  
                                   195                                  200                                  205

gaa aag aga gtt cgt tat ggt gca ttc ggg aat 657  
 Glu Lys Arg Val Arg Tyr Gly Ala Phe Gly Asn  
                   210                                  215

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 6

Met Asn Trp Thr Ile Ile Gln Gln Ala Met Pro Ala Phe Met Ala Gly  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Phe Lys Leu Thr Leu Trp Leu Ser Leu Val Gly Ile Ile Gly Ser Ile  
                                   20                                  25                                  30  
 Ile Val Gly Ile Ile Val Ser Leu Phe Gln Tyr Phe Lys Val Pro Val  
                                   35                                  40                                  45  
 Leu Ser Gln Ile Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Ala Arg Asn Thr Pro  
 50                                  55                                  60  
 Leu Leu Ile Gln Leu Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Phe Pro Ile Phe Gly  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Lys Met Ser Ala Glu Val Cys Gly Ile Ile Gly Leu Ile Phe Leu  
                                   85                                  90                                  95  
 Gly Gly Ala Tyr Met Ala Glu Gly Phe Thr Gly Gly Phe Asn Gly Val  
                                   100                                  105                                  110  
 Thr Lys Ser Gln Ile Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Met Asn Arg Leu  
                                   115                                  120                                  125  
 Gln Leu Ala Arg Tyr Val Val Phe Pro Gln Gly Val Ala Leu Ser Val  
                                   130                                  135                                  140  
 Pro Ala Leu Ala Ala Asn Ile Ile Phe Leu Ile Lys Glu Thr Ser Ile  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Phe Ser Val Ile Ala Ile Pro Glu Leu Thr Asn Thr Ala Met Asp Leu  
                                   165                                  170                                  175



	165		170		175	
aat gta gga caa caa att att gaa gct aat aat caa aaa tat cca aca						576
Asn Val Gly Gln Gln Ile Ile Glu Ala Asn Asn Gln Lys Tyr Pro Thr						
	180		185		190	
ggt gta ttt tgg att tat ggt ttt att ttc att tta tat ttc att tta						624
Gly Val Phe Trp Ile Tyr Gly Phe Ile Phe Ile Leu Tyr Phe Ile Leu						
	195		200		205	
gat tat cca tta tca gca tgg gca aag cgg tta aca gca aat aaa gag						672
Asp Tyr Pro Leu Ser Ala Trp Ala Lys Arg Leu Thr Ala Asn Lys Glu						
	210		215		220	

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 224

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 8

Met Val His Ser Gly Ile Asn Val Leu Phe Glu Gly Thr Asn Leu Ala															
1		5					10							15	
Arg Leu Met Ala Gly Leu Trp Ala Ser Ile Trp Ile Ala Ala Ile Ser															
	20						25							30	
Leu Val Ile Gly Leu Leu Leu Gly Thr Ile Leu Gly Ile Leu Arg Thr															
	35						40							45	
Met Pro Asn Lys Ile Val Arg Phe Val Leu Arg Leu Tyr Leu Glu Phe															
	50						55							60	
Phe Arg Ile Val Pro Thr Ile Val Leu Leu Tyr Leu Val Tyr Tyr Ile															
	65						70							75	80
Leu Pro Arg Thr Phe His Val Asn Trp Ser Ala Thr Trp Met Ala Val															
							85							90	95
Leu Ala Phe Ala Leu Trp Val Ala Ala Glu Phe Ser Asp Ile Val Arg															
							100							105	110
Gly Ala Leu Glu Ser Val Pro Lys Asn Gln Arg Glu Ser Gly Leu Ala															
	115						120							125	
Leu Gly Leu Ser Asn Ile Gln Leu Phe Arg Tyr Val Leu Leu Pro Gln															
	130						135							140	
Ala Ile Lys Leu Glu Leu Pro Ala Thr Ile Asn Leu Ala Thr Arg Val															
	145						150							155	160
Ile Lys Thr Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Asn Ile Met Glu Val Ile															
							165							170	175
Asn Val Gly Gln Gln Ile Ile Glu Ala Asn Asn Gln Lys Tyr Pro Thr															
	180						185							190	
Gly Val Phe Trp Ile Tyr Gly Phe Ile Phe Ile Leu Tyr Phe Ile Leu															
	195						200							205	
Asp Tyr Pro Leu Ser Ala Trp Ala Lys Arg Leu Thr Ala Asn Lys Glu															
	210						215							220	

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(738)

&lt;223&gt; proteína de ligação de ATP de transportador ABC ORF LBA1045

<400> 9

atg aca gaa gaa att tta aag gta gaa cat tta gat aaa ttt tac ggt 48  
Met Thr Glu Glu Ile Leu Lys Val Glu His Leu Asp Lys Phe Tyr Gly  
1 5 10 15

gat tgg cgg gct tta cat gat att aac ttc aat ctt aaa aag ggt gaa 96  
Asp Trp Arg Ala Leu His Asp Ile Asn Phe Asn Leu Lys Lys Gly Glu  
20 25 30

gtt tta acc ctt ctc ggc cca tca ggc tcg ggc aag agt acg ctt tta 144  
Val Leu Thr Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu  
35 40 45

cgt act tta aat ggc tta gaa gat tat caa aag ggt agt att tat ttt 192  
Arg Thr Leu Asn Gly Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Gly Ser Ile Tyr Phe  
50 55 60

cat gat aaa aaa att gat cct act cca aaa gaa tgg caa tta tta aga 240  
His Asp Lys Lys Ile Asp Pro Thr Pro Lys Glu Trp Gln Leu Leu Arg  
65 70 75 80

caa aag att ggt atg gtt ttc cag agc tat gat cta ttt cct aac tta 288  
Gln Lys Ile Gly Met Val Phe Gln Ser Tyr Asp Leu Phe Pro Asn Leu  
85 90 95

acc gta atg gac aat att tta ctt gct cca gta aaa gtg caa cat cga 336  
Thr Val Met Asp Asn Ile Leu Leu Ala Pro Val Lys Val Gln His Arg  
100 105 110

aaa gaa gat gaa gtt aga aag caa gct gaa gaa ttg cta aaa cgg gta 384  
Lys Glu Asp Glu Val Arg Lys Gln Ala Glu Glu Leu Leu Lys Arg Val  
115 120 125

ggg atg caa gat tat gca tca tca tat cca aga gaa tta tcc ggt ggt 432  
Gly Met Gln Asp Tyr Ala Ser Ser Tyr Pro Arg Glu Leu Ser Gly Gly  
130 135 140

caa aaa caa aga gta gca att gtc cgt gca atg gct atg aat ccc gaa 480  
Gln Lys Gln Arg Val Ala Ile Val Arg Ala Met Ala Met Asn Pro Glu  
145 150 155 160

att ttg cta tta gac gaa att act gca tct ctt gat cca gaa atg gtt 528  
Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ile Thr Ala Ser Leu Asp Pro Glu Met Val  
165 170 175

cgc ggt gtt caa gaa att gta gag cat tta tct aat aga gat cat atg 576  
Arg Gly Val Gln Glu Ile Val Glu His Leu Ser Asn Arg Asp His Met  
180 185 190

acc atg att gtc gta act cac cag atg aat ttc gct gaa aag att gca 624  
Thr Met Ile Val Val Thr His Gln Met Asn Phe Ala Glu Lys Ile Ala  
195 200 205

gat gaa gta cta ttc ctt gaa aat ggt aaa atc ttg gaa gat aca cca 672  
Asp Glu Val Leu Phe Leu Glu Asn Gly Lys Ile Leu Glu Asp Thr Pro  
210 215 220

gga aaa gag ttc ttt aag aac ccc caa act gct cgt gct cgt gaa ttc 720  
Gly Lys Glu Phe Phe Lys Asn Pro Gln Thr Ala Arg Ala Arg Glu Phe  
225 230 235 240

cta gac agc atg gat ttc  
 Leu Asp Ser Met Asp Phe  
 245

738

<210> 10  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus acidophilus

<400> 10  
 Met Thr Glu Glu Ile Leu Lys Val Glu His Leu Asp Lys Phe Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Trp Arg Ala Leu His Asp Ile Asn Phe Asn Leu Lys Lys Gly Glu  
 20 25 30  
 Val Leu Thr Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu  
 35 40 45  
 Arg Thr Leu Asn Gly Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Gly Ser Ile Tyr Phe  
 50 55 60  
 His Asp Lys Lys Ile Asp Pro Thr Pro Lys Glu Trp Gln Leu Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Ile Gly Met Val Phe Gln Ser Tyr Asp Leu Phe Pro Asn Leu  
 85 90 95  
 Thr Val Met Asp Asn Ile Leu Leu Ala Pro Val Lys Val Gln His Arg  
 100 105 110  
 Lys Glu Asp Glu Val Arg Lys Gln Ala Glu Glu Leu Leu Lys Arg Val  
 115 120 125  
 Gly Met Gln Asp Tyr Ala Ser Ser Tyr Pro Arg Glu Leu Ser Gly Gly  
 130 135 140  
 Gln Lys Gln Arg Val Ala Ile Val Arg Ala Met Ala Met Asn Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Leu Leu Leu Asp Glu Ile Thr Ala Ser Leu Asp Pro Glu Met Val  
 165 170 175  
 Arg Gly Val Gln Glu Ile Val Glu His Leu Ser Asn Arg Asp His Met  
 180 185 190  
 Thr Met Ile Val Val Thr His Gln Met Asn Phe Ala Glu Lys Ile Ala  
 195 200 205  
 Asp Glu Val Leu Phe Leu Glu Asn Gly Lys Ile Leu Glu Asp Thr Pro  
 210 215 220  
 Gly Lys Glu Phe Phe Lys Asn Pro Gln Thr Ala Arg Ala Arg Glu Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Asp Ser Met Asp Phe  
 245

<210> 11  
 <211> 858  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus acidophilus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(858)  
 <223> proteína de ligação de substrato de transportador ABC ORF  
 LBA1046

<400> 11  
 atg aaa gtt aag aac att ttc aat tgg act atc agc ata cta gct att  
 Met Lys Val Lys Asn Ile Phe Asn Trp Thr Ile Ser Ile Leu Ala Ile  
 1 5 10 15

48

tta ctc gtg att atc tct gct tat ttt ggt ttt gcg caa aaa ggt tta	96
Leu Leu Val Ile Ile Ser Ala Tyr Phe Gly Phe Ala Gln Lys Gly Leu	
20 25 30	
aat agt ggt act tct gct agc cga tgg agt aat caa aac gga gtt tct	144
Asn Ser Gly Thr Ser Ala Ser Arg Trp Ser Asn Gln Asn Gly Val Ser	
35 40 45	
gaa att aaa aga cgc ggc tac tta aga gta gcg gtt ttt ggt gat tta	192
Glu Ile Lys Arg Arg Gly Tyr Leu Arg Val Ala Val Phe Gly Asp Leu	
50 55 60	
cca cct tat ggc tgg gtt aat tca aat ggt aag cgt gta ggt tat gat	240
Pro Pro Tyr Gly Trp Val Asn Ser Asn Gly Lys Arg Val Gly Tyr Asp	
65 70 75 80	
gtt tac ttg gca cac cgt atg acc cag gat tta ggg gtg aaa att aga	288
Val Tyr Leu Ala His Arg Met Thr Gln Asp Leu Gly Val Lys Ile Arg	
85 90 95	
ttt gtt caa gtt aat gct aac aat cgt gtt gac act ttg aat tca aat	336
Phe Val Gln Val Asn Ala Asn Asn Arg Val Asp Thr Leu Asn Ser Asn	
100 105 110	
aaa gct gat atc att ttg gct aac ttt aca gtt aca cct gaa cga aaa	384
Lys Ala Asp Ile Ile Leu Ala Asn Phe Thr Val Thr Pro Glu Arg Lys	
115 120 125	
gat gta gta gac ttt gct aaa cca tat atg aag gtt tct gtt ggt gtc	432
Asp Val Val Asp Phe Ala Lys Pro Tyr Met Lys Val Ser Val Gly Val	
130 135 140	
att tcg cct aag agt gca cca ata act tct gct aat cag tta aag aat	480
Ile Ser Pro Lys Ser Ala Pro Ile Thr Ser Ala Asn Gln Leu Lys Asn	
145 150 155 160	
aaa aaa tta att gtt act aag ggt acg act gct gaa aac tac ttc tca	528
Lys Lys Leu Ile Val Thr Lys Gly Thr Thr Ala Glu Asn Tyr Phe Ser	
165 170 175	
caa caa aag aat gta aac tta tta aaa ttc gat tct aaa acg cag caa	576
Gln Gln Lys Asn Val Asn Leu Leu Lys Phe Asp Ser Lys Thr Gln Gln	
180 185 190	
ttc aac gct ctt aag aat ggt cgt ggt gca gct tta gct gat gat aac	624
Phe Asn Ala Leu Lys Asn Gly Arg Gly Ala Ala Leu Ala Asp Asp Asn	
195 200 205	
tca tac ctt tac gct tgg gta aaa caa aat cct aaa tat act gta gga	672
Ser Tyr Leu Tyr Ala Trp Val Lys Gln Asn Pro Lys Tyr Thr Val Gly	
210 215 220	
att aag agt att ggt ccc aaa caa tat att tct cca gca gtt aaa aaa	720
Ile Lys Ser Ile Gly Pro Lys Gln Tyr Ile Ser Pro Ala Val Lys Lys	
225 230 235 240	
ggg aat cgt tca cta tta aaa tgg aca aat aaa gag att act aaa ttg	768
Gly Asn Arg Ser Leu Leu Lys Trp Thr Asn Lys Glu Ile Thr Lys Leu	
245 250 255	



&lt;222&gt; (1)...(1116)

&lt;223&gt; metE ORF LBA1080

&lt;400&gt; 13

atg agt aaa act tta gta cat tat gac att gtt ggt agt ttc tta aga	48
Met Ser Lys Thr Leu Val His Tyr Asp Ile Val Gly Ser Phe Leu Arg	
1 5 10 15	
cca gaa gaa ttg aaa aag gca cgt gct gat ttt gca gcg ggt aac att	96
Pro Glu Glu Leu Lys Lys Ala Arg Ala Asp Phe Ala Ala Gly Asn Ile	
20 25 30	
tca aaa act gac ttg aaa aag gtt gaa gat gaa gaa atc gct aaa tta	144
Ser Lys Thr Asp Leu Lys Lys Val Glu Asp Glu Glu Ile Ala Lys Leu	
35 40 45	
gtt aaa aaa gaa gaa aaa gct ggt tta aag att gta act gat ggt gaa	192
Val Lys Lys Glu Glu Lys Ala Gly Leu Lys Ile Val Thr Asp Gly Glu	
50 55 60	
ttc aga aga agt tat tgg cac ctt gat act ttt tgg ggc ttc ggt gga	240
Phe Arg Arg Ser Tyr Trp His Leu Asp Thr Phe Trp Gly Phe Gly Gly	
65 70 75 80	
att aag cac act act caa gaa cat ggc tac ttc ttc cac gat gaa gaa	288
Ile Lys His Thr Thr Gln Glu His Gly Tyr Phe Phe His Asp Glu Glu	
85 90 95	
act cgt aat gat tct gct caa gtt gag gga aag att aaa ttt aca ggt	336
Thr Arg Asn Asp Ser Ala Gln Val Glu Gly Lys Ile Lys Phe Thr Gly	
100 105 110	
gat cat cca gat tta gaa gca ttt aag ttt ttg aag agt tta acc gat	384
Asp His Pro Asp Leu Glu Ala Phe Lys Phe Leu Lys Ser Leu Thr Asp	
115 120 125	
ggc agt gat gta act cca cgt caa agc att cct tca cca gcc caa ttt	432
Gly Ser Asp Val Thr Pro Arg Gln Ser Ile Pro Ser Pro Ala Gln Phe	
130 135 140	
tac gca gaa ctc gtc cgt ggc cca gaa aat gtt gca gca gtg aag aaa	480
Tyr Ala Glu Leu Val Arg Gly Pro Glu Asn Val Ala Ala Val Lys Lys	
145 150 155 160	
gtt tac gat acc gaa gac gaa ctt tta aac gat att tca aaa gca tat	528
Val Tyr Asp Thr Glu Asp Glu Leu Leu Asn Asp Ile Ser Lys Ala Tyr	
165 170 175	
tat gat tta atc atc gca ctt tac aaa gca ggt tgt cgc gat gtg aaa	576
Tyr Asp Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Lys Ala Gly Cys Arg Asp Val Lys	
180 185 190	
ttg gat gac tgt act tgg gga atg gtc gta gat gat gat ttc tgg gca	624
Leu Asp Asp Cys Thr Trp Gly Met Val Val Asp Asp Asp Phe Trp Ala	
195 200 205	
aca atg gtt aaa caa ggt ttt gac cgt gac gaa ctt caa gaa aaa tac	672
Thr Met Val Lys Gln Gly Phe Asp Arg Asp Glu Leu Gln Glu Lys Tyr	
210 215 220	
ctt cgt gtt aac aat ggc gca ctt aaa gat cta cca gct gat tta aga	720

Leu Arg Val Asn Asn Gly Ala Leu Lys Asp Leu Pro Ala Asp Leu Arg  
 225 230 235 240  
 act tca act cat att tgt cga ggc aat tac cac tca act tgg gct gct 768  
 Thr Ser Thr His Ile Cys Arg Gly Asn Tyr His Ser Thr Trp Ala Ala  
 245 250 255  
 aaa ggt ggt tat gga ccg gtt gcc aaa tac gtt ttt gca caa gaa aat 816  
 Lys Gly Gly Tyr Gly Pro Val Ala Lys Tyr Val Phe Ala Gln Glu Asn  
 260 265 270  
 gtc gat gca ttc tat ctt gaa ttt gat aat gaa aga tca ggt aac ttc 864  
 Val Asp Ala Phe Tyr Leu Glu Phe Asp Asn Glu Arg Ser Gly Asn Phe  
 275 280 285  
 gat cca atc aag gaa att cct gct gat aaa gaa gta gta ctt ggt tta 912  
 Asp Pro Ile Lys Glu Ile Pro Ala Asp Lys Glu Val Val Leu Gly Leu  
 290 295 300  
 gta act agt aag aaa cct gaa ttg gaa aag cca gag gat ttg att gct 960  
 Val Thr Ser Lys Lys Pro Glu Leu Glu Lys Pro Glu Asp Leu Ile Ala  
 305 310 315 320  
 cgt atc aat gaa gca agt aag ttc cac gat tta gcc aac tta gcc tta 1008  
 Arg Ile Asn Glu Ala Ser Lys Phe His Asp Leu Ala Asn Leu Ala Leu  
 325 330 335  
 agc act caa tgt ggt ttt gca tca acc gag gaa gga aac caa ttg aca 1056  
 Ser Thr Gln Cys Gly Phe Ala Ser Thr Glu Glu Gly Asn Gln Leu Thr  
 340 345 350  
 gaa gac gat gaa tgg aaa aag att ggc tta gta atc gat act gct aag 1104  
 Glu Asp Asp Glu Trp Lys Lys Ile Gly Leu Val Ile Asp Thr Ala Lys  
 355 360 365  
 caa gtt tgg aag 1116  
 Gln Val Trp Lys  
 370

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 14

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



cgt gac cgt ctt gat ggt gta atc gat tgt tca cca ttt ggt tgc cga 240  
 Arg Asp Arg Leu Asp Gly Val Ile Asp Cys Ser Pro Phe Gly Cys Arg  
 65 70 75 80

aca gga ttc cac cta atc gtt tgg ggt gaa cat tca act act gaa gtt 288  
 Thr Gly Phe His Leu Ile Val Trp Gly Glu His Ser Thr Thr Glu Val  
 85 90 95

gct aaa gca ttg aag tct tca tta gag gaa att cgt gac aca att act 336  
 Ala Lys Ala Leu Lys Ser Ser Leu Glu Glu Ile Arg Asp Thr Ile Thr  
 100 105 110

tgg gaa gat gta cca ggt aca act att aag act tgt ggt aac tac cgt 384  
 Trp Glu Asp Val Pro Gly Thr Thr Ile Lys Thr Cys Gly Asn Tyr Arg  
 115 120 125

gat cac tca ttg ttc acc gca aaa gaa tgg tgt cgt gat att ctt gaa 432  
 Asp His Ser Leu Phe Thr Ala Lys Glu Trp Cys Arg Asp Ile Leu Glu  
 130 135 140

aaa gga att agt gat gac cca ttc gaa aga aat gtg att 471  
 Lys Gly Ile Ser Asp Asp Pro Phe Glu Arg Asn Val Ile  
 145 150 155

<210> 16

<211> 157

<212> PRT

<213> Lactobacillus acidophilus

<400> 16

Met Ala Lys Val Glu Ser Phe Thr Leu Asp His Thr Lys Val Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Tyr Val Arg Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Pro Lys Gly Asp Lys  
 20 25 30  
 Ile Ser Asn Tyr Asp Leu Arg Leu Val Gln Pro Asn Glu Asn Ala Ile  
 35 40 45  
 Pro Thr Gly Gly Leu His Thr Ile Glu His Leu Leu Ala Ser Leu Leu  
 50 55 60  
 Arg Asp Arg Leu Asp Gly Val Ile Asp Cys Ser Pro Phe Gly Cys Arg  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Phe His Leu Ile Val Trp Gly Glu His Ser Thr Thr Glu Val  
 85 90 95  
 Ala Lys Ala Leu Lys Ser Ser Leu Glu Glu Ile Arg Asp Thr Ile Thr  
 100 105 110  
 Trp Glu Asp Val Pro Gly Thr Thr Ile Lys Thr Cys Gly Asn Tyr Arg  
 115 120 125  
 Asp His Ser Leu Phe Thr Ala Lys Glu Trp Cys Arg Asp Ile Leu Glu  
 130 135 140  
 Lys Gly Ile Ser Asp Asp Pro Phe Glu Arg Asn Val Ile  
 145 150 155

<210> 17

<211> 1332

<212> DNA

<213> Lactobacillus acidophilus

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (1)...(1332)

&lt;223&gt; splA ORF LBA169

&lt;400&gt; 17

atg aag aaa aat tta aga atc gtt agc gct gct gct gct gct tta ctt	48
Met Lys Lys Asn Leu Arg Ile Val Ser Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu	
1 5 10 15	
gct gtt gct cca gtt gct gct tct gct gta tct act gtt agc gct gct	96
Ala Val Ala Pro Val Ala Ala Ser Ala Val Ser Thr Val Ser Ala Ala	
20 25 30	
act act att aac gca agt tca tca gca atc aat acc aac act aat gct	144
Thr Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser Ala Ile Asn Thr Asn Thr Asn Ala	
35 40 45	
aag tac gat gtt gat gta act cct agt gtt tct gca gtt gct gca aat	192
Lys Tyr Asp Val Asp Val Thr Pro Ser Val Ser Ala Val Ala Ala Asn	
50 55 60	
act gct aac aac act cca gct att gcc ggt aac ctt act ggt act att	240
Thr Ala Asn Asn Thr Pro Ala Ile Ala Gly Asn Leu Thr Gly Thr Ile	
65 70 75 80	
tca gca agt tac aat ggt aag act tat act gct aac tta aag gca gat	288
Ser Ala Ser Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Thr Ala Asn Leu Lys Ala Asp	
85 90 95	
act gaa aat gcc act att act gct gct ggt agc act act gcc gtt aaa	336
Thr Glu Asn Ala Thr Ile Thr Ala Ala Gly Ser Thr Thr Ala Val Lys	
100 105 110	
cct gct gaa tta gct gca ggt gtg gct tac act gta act gtt aac gat	384
Pro Ala Glu Leu Ala Ala Gly Val Ala Tyr Thr Val Thr Val Asn Asp	
115 120 125	
gtt tca ttt aac ttc ggt tca gaa aat gca ggt aag act gtt acc ctt	432
Val Ser Phe Asn Phe Gly Ser Glu Asn Ala Gly Lys Thr Val Thr Leu	
130 135 140	
ggt tca gct aac tca aat gta aaa ttc acc ggt aca aac agt gat aat	480
Gly Ser Ala Asn Ser Asn Val Lys Phe Thr Gly Thr Asn Ser Asp Asn	
145 150 155 160	
caa act gaa act aat gtt tct act ttg aaa gtt aag tta gac caa aac	528
Gln Thr Glu Thr Asn Val Ser Thr Leu Lys Val Lys Leu Asp Gln Asn	
165 170 175	
ggt gtt gct tca ctt act aat gtt tca att gca aac gta tac gca att	576
Gly Val Ala Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ala Asn Val Tyr Ala Ile	
180 185 190	
aac act act gat aac agt aac gta aac ttc tac gac gta act agt ggt	624
Asn Thr Thr Asp Asn Ser Asn Val Asn Phe Tyr Asp Val Thr Ser Gly	
195 200 205	
gct act gta act aac ggt gcc gtt tca gtt aat gct gat aac caa ggt	672
Ala Thr Val Thr Asn Gly Ala Val Ser Val Asn Ala Asp Asn Gln Gly	
210 215 220	
caa gtt aat gtt gca aac gta gtt gca gca att aat tca aaa tac ttt	720

Gln Val Asn Val Ala Asn Val Val Ala Ala Ile Asn Ser Lys Tyr Phe  
225 230 235 240

gca gca caa tac gca gat aag aag tta aat act cgt act gct aat act 768  
Ala Ala Gln Tyr Ala Asp Lys Lys Leu Asn Thr Arg Thr Ala Asn Thr  
245 250 255

gaa gat gct att aag gca gcc tta aag gac caa aag att gat gta aac 816  
Glu Asp Ala Ile Lys Ala Ala Leu Lys Asp Gln Lys Ile Asp Val Asn  
260 265 270

tca gta ggt tac ttc aaa gca cct cat act ttc act gtt aac gtt aaa 864  
Ser Val Gly Tyr Phe Lys Ala Pro His Thr Phe Thr Val Asn Val Lys  
275 280 285

gca act tca aat act aat ggt aag tca gct act ttg cca gta gtt gtt 912  
Ala Thr Ser Asn Thr Asn Gly Lys Ser Ala Thr Leu Pro Val Val Val  
290 295 300

act gtt cct aat gtt gct gag cca act gta gcc agc gta agc aag aga 960  
Thr Val Pro Asn Val Ala Glu Pro Thr Val Ala Ser Val Ser Lys Arg  
305 310 315 320

att atg cac aac gca tac tac tac gac aag gac gct aag cgt gtt ggt 1008  
Ile Met His Asn Ala Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asp Ala Lys Arg Val Gly  
325 330 335

act gac agc gtt aag cgt tac aac tca gta agc gta ttg cca aac act 1056  
Thr Asp Ser Val Lys Arg Tyr Asn Ser Val Ser Val Leu Pro Asn Thr  
340 345 350

act act atc aac ggt aag act tac tac caa gta gtt gaa aac ggt aag 1104  
Thr Thr Ile Asn Gly Lys Thr Tyr Tyr Gln Val Val Glu Asn Gly Lys  
355 360 365

gct gtt gac aag tac atc aac gct gca aac atc gat ggt act aag cgt 1152  
Ala Val Asp Lys Tyr Ile Asn Ala Ala Asn Ile Asp Gly Thr Lys Arg  
370 375 380

act ttg aag cac aac gct tac gtt tac gca tca tca aag aag cgt gct 1200  
Thr Leu Lys His Asn Ala Tyr Val Tyr Ala Ser Ser Lys Lys Arg Ala  
385 390 395 400

aac aag gtt gta ttg aag aag ggt gaa gtt gta act act tac ggt gct 1248  
Asn Lys Val Val Leu Lys Lys Gly Glu Val Val Thr Thr Tyr Gly Ala  
405 410 415

tca tac aca ttc aag aac ggc caa aag tac tac aag atc ggt gac aac 1296  
Ser Tyr Thr Phe Lys Asn Gly Gln Lys Tyr Tyr Lys Ile Gly Asp Asn  
420 425 430

act gac aag act tac gtt aag gtt gca aac ttt aga 1332  
Thr Asp Lys Thr Tyr Val Lys Val Ala Asn Phe Arg  
435 440

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

<400> 18

Met Lys Lys Asn Leu Arg Ile Val Ser Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ala Pro Val Ala Ala Ser Ala Val Ser Thr Val Ser Ala Ala  
 20 25 30  
 Thr Thr Ile Asn Ala Ser Ser Ser Ala Ile Asn Thr Asn Thr Asn Ala  
 35 40 45  
 Lys Tyr Asp Val Asp Val Thr Pro Ser Val Ser Ala Val Ala Ala Asn  
 50 55 60  
 Thr Ala Asn Asn Thr Pro Ala Ile Ala Gly Asn Leu Thr Gly Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Ser Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Thr Ala Asn Leu Lys Ala Asp  
 85 90 95  
 Thr Glu Asn Ala Thr Ile Thr Ala Ala Gly Ser Thr Thr Ala Val Lys  
 100 105 110  
 Pro Ala Glu Leu Ala Ala Gly Val Ala Tyr Thr Val Thr Val Asn Asp  
 115 120 125  
 Val Ser Phe Asn Phe Gly Ser Glu Asn Ala Gly Lys Thr Val Thr Leu  
 130 135 140  
 Gly Ser Ala Asn Ser Asn Val Lys Phe Thr Gly Thr Asn Ser Asp Asn  
 145 150 155 160  
 Gln Thr Glu Thr Asn Val Ser Thr Leu Lys Val Lys Leu Asp Gln Asn  
 165 170 175  
 Gly Val Ala Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ala Asn Val Tyr Ala Ile  
 180 185 190  
 Asn Thr Thr Asp Asn Ser Asn Val Asn Phe Tyr Asp Val Thr Ser Gly  
 195 200 205  
 Ala Thr Val Thr Asn Gly Ala Val Ser Val Asn Ala Asp Asn Gln Gly  
 210 215 220  
 Gln Val Asn Val Ala Asn Val Val Ala Ala Ile Asn Ser Lys Tyr Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Gln Tyr Ala Asp Lys Lys Leu Asn Thr Arg Thr Ala Asn Thr  
 245 250 255  
 Glu Asp Ala Ile Lys Ala Ala Leu Lys Asp Gln Lys Ile Asp Val Asn  
 260 265 270  
 Ser Val Gly Tyr Phe Lys Ala Pro His Thr Phe Thr Val Asn Val Lys  
 275 280 285  
 Ala Thr Ser Asn Thr Asn Gly Lys Ser Ala Thr Leu Pro Val Val Val  
 290 295 300  
 Thr Val Pro Asn Val Ala Glu Pro Thr Val Ala Ser Val Ser Lys Arg  
 305 310 315 320  
 Ile Met His Asn Ala Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asp Ala Lys Arg Val Gly  
 325 330 335  
 Thr Asp Ser Val Lys Arg Tyr Asn Ser Val Ser Val Leu Pro Asn Thr  
 340 345 350  
 Thr Thr Ile Asn Gly Lys Thr Tyr Tyr Gln Val Val Glu Asn Gly Lys  
 355 360 365  
 Ala Val Asp Lys Tyr Ile Asn Ala Ala Asn Ile Asp Gly Thr Lys Arg  
 370 375 380  
 Thr Leu Lys His Asn Ala Tyr Val Tyr Ala Ser Ser Lys Lys Arg Ala  
 385 390 395 400  
 Asn Lys Val Val Leu Lys Lys Gly Glu Val Val Thr Thr Tyr Gly Ala  
 405 410 415  
 Ser Tyr Thr Phe Lys Asn Gly Gln Lys Tyr Tyr Lys Ile Gly Asp Asn  
 420 425 430  
 Thr Asp Lys Thr Tyr Val Lys Val Ala Asn Phe Arg  
 435 440

<210> 19

<211> 1689

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1689)

&lt;223&gt; fbpA ORF LBA1148

&lt;400&gt; 19

```

atg gca ttt gac gga tta ttt atc cat agt tta cta caa gat ttg acc 48
Met Ala Phe Asp Gly Leu Phe Ile His Ser Leu Leu Gln Asp Leu Thr
  1                5                10                15

cct aca tta gta gat ggt cga tta tca aaa att tac caa cca ttt gaa 96
Pro Thr Leu Val Asp Gly Arg Leu Ser Lys Ile Tyr Gln Pro Phe Glu
                20                25                30

caa gat cta ata tta act ttt aga aaa aat aga aag aat tat caa tta 144
Gln Asp Leu Ile Leu Thr Phe Arg Lys Asn Arg Lys Asn Tyr Gln Leu
                35                40                45

tta att tca gcc aac gct caa tat cct aga atg tat tta act gag cag 192
Leu Ile Ser Ala Asn Ala Gln Tyr Pro Arg Met Tyr Leu Thr Glu Gln
                50                55                60

act att gct aat cca gac aaa gca cct att ttt gtt atg gtt tta aga 240
Thr Ile Ala Asn Pro Asp Lys Ala Pro Ile Phe Val Met Val Leu Arg
  65                70                75                80

aag tat ttg gaa ggt tca gtc tta caa tct att gaa caa att ggt gtg 288
Lys Tyr Leu Glu Gly Ser Val Leu Gln Ser Ile Glu Gln Ile Gly Val
                85                90                95

aac cga att ata aac ctt cat ttc agt aat cga aac gaa tta ggt gat 336
Asn Arg Ile Ile Asn Leu His Phe Ser Asn Arg Asn Glu Leu Gly Asp
                100                105                110

caa gta aaa tta gta tta tcc gtt gaa tta atg gga cga cat agt aat 384
Gln Val Lys Leu Val Leu Ser Val Glu Leu Met Gly Arg His Ser Asn
                115                120                125

gta att ctc tat gat caa cag aat ggt cat att att gat cta ttg aag 432
Val Ile Leu Tyr Asp Gln Gln Asn Gly His Ile Ile Asp Leu Leu Lys
  130                135                140

cga ata aat cct gat gaa aat aga gct cgt att tta tta cct aag gca 480
Arg Ile Asn Pro Asp Glu Asn Arg Ala Arg Ile Leu Leu Pro Lys Ala
  145                150                155                160

aaa tat gag ctt ccc cct ctt aaa cct ggt ata aat ggt tta gta gta 528
Lys Tyr Glu Leu Pro Pro Leu Lys Pro Gly Ile Asn Gly Leu Val Val
                165                170                175

act gaa aat caa ttt aaa aag tta agc aat gaa aaa agc att cca gat 576
Thr Glu Asn Gln Phe Lys Lys Leu Ser Asn Glu Lys Ser Ile Pro Asp
                180                185                190

tta gtg aaa tca atg gat ggt tta gac aga gac gat cgt gaa gaa tta 624
Leu Val Lys Ser Met Asp Gly Leu Asp Arg Asp Asp Arg Glu Glu Leu
                195                200                205

```

act ggt tat ctt gaa gat gat ttt agc tat tct tca ttt aag act ttc	672
Thr Gly Tyr Leu Glu Asp Asp Phe Ser Tyr Ser Ser Phe Lys Thr Phe	
210 215 220	
ttt gat cag ttt aat aat cca aga gct ttc gtt tta aaa act cca aga	720
Phe Asp Gln Phe Asn Asn Pro Arg Ala Phe Val Leu Lys Thr Pro Arg	
225 230 235 240	
aat aaa cgt aag att ttc tgt tat ctt ccc tat cat tta gat tta gag	768
Asn Lys Arg Lys Ile Phe Cys Tyr Leu Pro Tyr His Leu Asp Leu Glu	
245 250 255	
aaa gaa aat tct aat cct gat tta aat aaa ggt tta gat gaa ttt tat	816
Lys Glu Asn Ser Asn Pro Asp Leu Asn Lys Gly Leu Asp Glu Phe Tyr	
260 265 270	
gaa tac caa gca aca cgt gat tgg gtt aaa caa cgt gct agt cag gtt	864
Glu Tyr Gln Ala Thr Arg Asp Trp Val Lys Gln Arg Ala Ser Gln Val	
275 280 285	
gaa cgt gtc gtc aaa aac gaa cag aac aaa cta agt aag aag att aag	912
Glu Arg Val Val Lys Asn Glu Gln Asn Lys Leu Ser Lys Lys Ile Lys	
290 295 300	
aaa tta gaa aag caa tta aac tta gca gaa aat tct gag ggc tat cgt	960
Lys Leu Glu Lys Gln Leu Asn Leu Ala Glu Asn Ser Glu Gly Tyr Arg	
305 310 315 320	
atc aag ggt gaa ata tta aat gct aat tta gga caa gta aaa cca gga	1008
Ile Lys Gly Glu Ile Leu Asn Ala Asn Leu Gly Gln Val Lys Pro Gly	
325 330 335	
atg act gag gtt tcc tta cct aac tat tat gaa aat aat aaa cct ata	1056
Met Thr Glu Val Ser Leu Pro Asn Tyr Tyr Glu Asn Asn Lys Pro Ile	
340 345 350	
agc att aaa ctt gat cca gct tta tct ccg gct cga aat gca caa aaa	1104
Ser Ile Lys Leu Asp Pro Ala Leu Ser Pro Ala Arg Asn Ala Gln Lys	
355 360 365	
tat ttc act cgc tat aaa aaa tta cgt gat tct atc aaa cac gtt aac	1152
Tyr Phe Thr Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asp Ser Ile Lys His Val Asn	
370 375 380	
gaa caa att aaa atc gct aaa gaa aat ctt cgc tat ttt gat tct atc	1200
Glu Gln Ile Lys Ile Ala Lys Glu Asn Leu Arg Tyr Phe Asp Ser Ile	
385 390 395 400	
caa aca gct att gat aat gct gat cca caa gat att gat caa ata act	1248
Gln Thr Ala Ile Asp Asn Ala Asp Pro Gln Asp Ile Asp Gln Ile Thr	
405 410 415	
gac gaa ttg att aat caa ggt tat att aga aag caa caa aaa aat aga	1296
Asp Glu Leu Ile Asn Gln Gly Tyr Ile Arg Lys Gln Gln Lys Asn Arg	
420 425 430	
cgt aag aag aaa att act gaa cgc aat cta aat gaa ttc cag ctt tct	1344
Arg Lys Lys Lys Ile Thr Glu Arg Asn Leu Asn Glu Phe Gln Leu Ser	
435 440 445	
tct gga aaa cat gtc tta gtg ggt aaa aat aat tac caa aat gac tgg	1392

Ser Gly Lys His Val Leu Val Gly Lys Asn Asn Tyr Gln Asn Asp Trp  
450 455 460

ctt act cta aaa aaa gct aat aaa tta gat tat tgg ttc cac gtt aaa 1440  
Leu Thr Leu Lys Lys Ala Asn Lys Leu Asp Tyr Trp Phe His Val Lys  
465 470 475 480

aat atg cct ggt tca cat gtt att ttg cga gat gat caa cct acc gat 1488  
Asn Met Pro Gly Ser His Val Ile Leu Arg Asp Asp Gln Pro Thr Asp  
485 490 495

caa gat att aaa gaa gct gca gag att gct gca ttt ttc tct aaa gcc 1536  
Gln Asp Ile Lys Glu Ala Ala Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ser Lys Ala  
500 505 510

aaa aat tct gcc cac gtt caa gtt gac tac gtt caa gat aag cgt gta 1584  
Lys Asn Ser Ala His Val Gln Val Asp Tyr Val Gln Asp Lys Arg Val  
515 520 525

aag aag cct aat ggg gct aag cca gga ttc gta att tac aca gga cag 1632  
Lys Lys Pro Asn Gly Ala Lys Pro Gly Phe Val Ile Tyr Thr Gly Gln  
530 535 540

aat tca atc gaa gtt aca cct aaa gaa gac gaa att atg gct aaa aaa 1680  
Asn Ser Ile Glu Val Thr Pro Lys Glu Asp Glu Ile Met Ala Lys Lys  
545 550 555 560

atc aat aaa 1689  
Ile Asn Lys

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 563

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 20

Met Ala Phe Asp Gly Leu Phe Ile His Ser Leu Leu Gln Asp Leu Thr  
1 5 10 15  
Pro Thr Leu Val Asp Gly Arg Leu Ser Lys Ile Tyr Gln Pro Phe Glu  
20 25 30  
Gln Asp Leu Ile Leu Thr Phe Arg Lys Asn Arg Lys Asn Tyr Gln Leu  
35 40 45  
Leu Ile Ser Ala Asn Ala Gln Tyr Pro Arg Met Tyr Leu Thr Glu Gln  
50 55 60  
Thr Ile Ala Asn Pro Asp Lys Ala Pro Ile Phe Val Met Val Leu Arg  
65 70 75 80  
Lys Tyr Leu Glu Gly Ser Val Leu Gln Ser Ile Glu Gln Ile Gly Val  
85 90 95  
Asn Arg Ile Ile Asn Leu His Phe Ser Asn Arg Asn Glu Leu Gly Asp  
100 105 110  
Gln Val Lys Leu Val Leu Ser Val Glu Leu Met Gly Arg His Ser Asn  
115 120 125  
Val Ile Leu Tyr Asp Gln Gln Asn Gly His Ile Ile Asp Leu Leu Lys  
130 135 140  
Arg Ile Asn Pro Asp Glu Asn Arg Ala Arg Ile Leu Leu Pro Lys Ala  
145 150 155 160  
Lys Tyr Glu Leu Pro Pro Leu Lys Pro Gly Ile Asn Gly Leu Val Val  
165 170 175  
Thr Glu Asn Gln Phe Lys Lys Leu Ser Asn Glu Lys Ser Ile Pro Asp

			180					185					190			
Leu	Val	Lys	Ser	Met	Asp	Gly	Leu	Asp	Arg	Asp	Asp	Arg	Glu	Glu	Leu	
		195					200					205				
Thr	Gly	Tyr	Leu	Glu	Asp	Asp	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Thr	Phe	
	210					215					220					
Phe	Asp	Gln	Phe	Asn	Asn	Pro	Arg	Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Arg	
225					230					235					240	
Asn	Lys	Arg	Lys	Ile	Phe	Cys	Tyr	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Asp	Leu	Glu	
				245					250					255		
Lys	Glu	Asn	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Leu	Asp	Glu	Phe	Tyr	
			260				265						270			
Glu	Tyr	Gln	Ala	Thr	Arg	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Ser	Gln	Val	
		275					280					285				
Glu	Arg	Val	Val	Lys	Asn	Glu	Gln	Asn	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	Ile	Lys	
	290					295					300					
Lys	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Asn	Leu	Ala	Glu	Asn	Ser	Glu	Gly	Tyr	Arg	
305					310					315					320	
Ile	Lys	Gly	Glu	Ile	Leu	Asn	Ala	Asn	Leu	Gly	Gln	Val	Lys	Pro	Gly	
				325					330					335		
Met	Thr	Glu	Val	Ser	Leu	Pro	Asn	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Asn	Lys	Pro	Ile	
			340					345					350			
Ser	Ile	Lys	Leu	Asp	Pro	Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Arg	Asn	Ala	Gln	Lys	
		355					360					365				
Tyr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Asp	Ser	Ile	Lys	His	Val	Asn	
	370					375					380					
Glu	Gln	Ile	Lys	Ile	Ala	Lys	Glu	Asn	Leu	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ser	Ile	
385					390					395					400	
Gln	Thr	Ala	Ile	Asp	Asn	Ala	Asp	Pro	Gln	Asp	Ile	Asp	Gln	Ile	Thr	
				405					410					415		
Asp	Glu	Leu	Ile	Asn	Gln	Gly	Tyr	Ile	Arg	Lys	Gln	Gln	Lys	Asn	Arg	
			420					425					430			
Arg	Lys	Lys	Lys	Ile	Thr	Glu	Arg	Asn	Leu	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Ser	
		435					440					445				
Ser	Gly	Lys	His	Val	Leu	Val	Gly	Lys	Asn	Asn	Tyr	Gln	Asn	Asp	Trp	
	450				455						460					
Leu	Thr	Leu	Lys	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Phe	His	Val	Lys	
465					470					475					480	
Asn	Met	Pro	Gly	Ser	His	Val	Ile	Leu	Arg	Asp	Asp	Gln	Pro	Thr	Asp	
				485					490					495		
Gln	Asp	Ile	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Phe	Phe	Ser	Lys	Ala	
			500					505					510			
Lys	Asn	Ser	Ala	His	Val	Gln	Val	Asp	Tyr	Val	Gln	Asp	Lys	Arg	Val	
		515						520				525				
Lys	Lys	Pro	Asn	Gly	Ala	Lys	Pro	Gly	Phe	Val	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	
	530					535					540					
Asn	Ser	Ile	Glu	Val	Thr	Pro	Lys	Glu	Asp	Glu	Ile	Met	Ala	Lys	Lys	
545					550					555					560	
Ile	Asn	Lys														

<210> 21  
 <211> 1212  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus acidophilus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)...(1212)  
 <223> metK ORF LBA1622

&lt;400&gt; 21

```

agggggacta at atg gaa aaa cgt tta ttt act tca gaa tca gtt tct gaa 51
      Met Glu Lys Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu
            1             5             10

gga cat cca gat aaa gtt gct gac caa att tca gat gca att tta gat 99
Gly His Pro Asp Lys Val Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Ile Leu Asp
      15             20             25

gcg atg ttg aaa aaa gat cct aat tca cac gta gct tgt gaa acg att 147
Ala Met Leu Lys Lys Asp Pro Asn Ser His Val Ala Cys Glu Thr Ile
      30             35             40             45

gta act aca gga atg gtt ttt gta ttt ggt gaa att tca aca agt gca 195
Val Thr Thr Gly Met Val Phe Val Phe Gly Glu Ile Ser Thr Ser Ala
            50             55             60

tat gtt gat att caa gat gta gta cga aaa acc att tta aaa ata ggc 243
Tyr Val Asp Ile Gln Asp Val Val Arg Lys Thr Ile Leu Lys Ile Gly
            65             70             75

tat gat cgt cca gag tta ggt ttc gat ggt aat aac tgt gct gta atg 291
Tyr Asp Arg Pro Glu Leu Gly Phe Asp Gly Asn Asn Cys Ala Val Met
            80             85             90

gtg gat att gat gaa caa tca cct gat atc gct gat ggt gtt gat cac 339
Val Asp Ile Asp Glu Gln Ser Pro Asp Ile Ala Asp Gly Val Asp His
            95             100             105

tca ctt gaa act aga gaa aat aag tct gat aac gat gaa ttg gac caa 387
Ser Leu Glu Thr Arg Glu Asn Lys Ser Asp Asn Asp Glu Leu Asp Gln
      110             115             120             125

att ggt gca ggt gac caa ggt tta atg ttt gga ttt gct att aag gaa 435
Ile Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Phe Ala Ile Lys Glu
            130             135             140

act cca gaa ctt atg ccg cta cca att tca ctt tcg cat cgt tta atg 483
Thr Pro Glu Leu Met Pro Leu Pro Ile Ser Leu Ser His Arg Leu Met
            145             150             155

agg cgt gtg gct tca ctt aga aaa gac cat act tta gaa tgg ctt cgt 531
Arg Arg Val Ala Ser Leu Arg Lys Asp His Thr Leu Glu Trp Leu Arg
            160             165             170

cca gat gct aaa gct caa gtt act gta gaa tac gac gaa aat ggt aaa 579
Pro Asp Ala Lys Ala Gln Val Thr Val Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Lys
            175             180             185

cca ctt tgt gtt gat act gtg gtt atc tct act caa act gat gca gaa 627
Pro Leu Cys Val Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln Thr Asp Ala Glu
      190             195             200             205

gta tca aat gaa gaa atc tgt cgt gca atg atc gac cta gta att aaa 675
Val Ser Asn Glu Glu Ile Cys Arg Ala Met Ile Asp Leu Val Ile Lys
            210             215             220

gaa gtt att cca gct aag tat ttg gac gaa aat act aag ttc ttg atc 723
Glu Val Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Lys Phe Leu Ile
            225             230             235

```



Pro Glu Leu Gly Phe Asp Gly Asn Asn Cys Ala Val Met Val Asp Ile  
 85 90 95  
 Asp Glu Gln Ser Pro Asp Ile Ala Asp Gly Val Asp His Ser Leu Glu  
 100 105 110  
 Thr Arg Glu Asn Lys Ser Asp Asn Asp Glu Leu Asp Gln Ile Gly Ala  
 115 120 125  
 Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Phe Ala Ile Lys Glu Thr Pro Glu  
 130 135 140  
 Leu Met Pro Leu Pro Ile Ser Leu Ser His Arg Leu Met Arg Arg Val  
 145 150 155 160  
 Ala Ser Leu Arg Lys Asp His Thr Leu Glu Trp Leu Arg Pro Asp Ala  
 165 170 175  
 Lys Ala Gln Val Thr Val Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Lys Pro Leu Cys  
 180 185 190  
 Val Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln Thr Asp Ala Glu Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Glu Glu Ile Cys Arg Ala Met Ile Asp Leu Val Ile Lys Glu Val Ile  
 210 215 220  
 Pro Ala Lys Tyr Leu Asp Glu Asn Thr Lys Phe Leu Ile Asn Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Lys Gly Asp Ser Gly Leu Thr Gly  
 245 250 255  
 Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Tyr Ala Arg His Gly Gly  
 260 265 270  
 Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Thr Lys Val Asp Arg Ser Ala Ser  
 275 280 285  
 Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala  
 290 295 300  
 Tyr Arg Cys Glu Val Gln Leu Ala Tyr Ala Ile Gly Val Ala His Pro  
 305 310 315 320  
 Val Ser Ile Met Ile Asp Thr Ala Gly Thr Gly Thr Val Asp Asp Glu  
 325 330 335  
 Leu Leu Thr Glu Ala Val Arg Asn Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Gly  
 340 345 350  
 Ile Ile Lys Met Leu Asp Leu Arg Arg Pro Ile Tyr Glu Gln Thr Ala  
 355 360 365  
 Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Thr Asp Val Asp Leu Pro Trp Glu Lys  
 370 375 380  
 Thr Asp Lys Thr Gln Ala Leu Leu Asp Tyr Ile Lys Asn Asn Gln  
 385 390 395

<210> 23  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 23  
 gatcagatct aagttaaggc accttacg

28

<210> 24  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 24  
 gatctctaga tttcgaatgg gtcacac 28

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 25  
 gatctctaga tgacagaaga cgatgaatg 29

<210> 26  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 26  
 gatcagatct attgcgacta agttcagac 29

<210> 27  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 27  
 gatcgaattc tcgttcgggt gaactaaacg taagtc 36

<210> 28  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 28  
 gatcgaattc cgaacaggat tccacctaata cgtttg 36

<210> 29  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Oligonucleotídeo

<400> 29  
 gccaaacttag ccttaagcac tc 22

<210> 30  
 <211> 22  
 <212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo

<400> 30

ttggttctgc tcctcagcct tc

22

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo

<400> 31

tgcttttagca acttcagtag

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo

<400> 32

taaagttaag gcaccttagc

20

<210> 33

<211> 794

<212> DNA

<213> Lactobacillus acidophilus

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(794)

<223> ORF LBA1735

<400> 33

aggaggacaa a atg cca tta ttt aag aaa aag cgt ggt aca gat gaa act 50  
 Met Pro Leu Phe Lys Lys Lys Arg Gly Thr Asp Glu Thr  
 1 5 10

att aaa cat ggt gct aag tta atc act gta gct aag cca aag agt cca 98  
 Ile Lys His Gly Ala Lys Leu Ile Thr Val Ala Lys Pro Lys Ser Pro  
 15 20 25

ata gct gaa caa ttc cgt act gtt cgt act aat att aac ttt atg gca 146  
 Ile Ala Glu Gln Phe Arg Thr Val Arg Thr Asn Ile Asn Phe Met Ala  
 30 35 40 45

gtg gat cat gac att aag tct tta gca ttt act tct gct aat att agt 194  
 Val Asp His Asp Ile Lys Ser Leu Ala Phe Thr Ser Ala Asn Ile Ser  
 50 55 60

gaa ggt aaa tct act gtg gct gct aac gtt gct gtt act tat gct caa 242  
 Glu Gly Lys Ser Thr Val Ala Ala Asn Val Ala Val Thr Tyr Ala Gln  
 65 70 75

gca ggt cgt aaa gtc tta ttg gtc gat gcc gac tta cgt aga cct aca 290  
 Ala Gly Arg Lys Val Leu Leu Val Asp Ala Asp Leu Arg Arg Pro Thr  
                   80                                  85                                  90

gtg cac tca acc ttt aac tta agt aat cat gtt ggt ctt agt acg gtt 338  
 Val His Ser Thr Phe Asn Leu Ser Asn His Val Gly Leu Ser Thr Val  
           95                                  100                                  105

atc tct tca act gct aag gaa gtt gat ctt gat agc gta gta caa gag 386  
 Ile Ser Ser Thr Ala Lys Glu Val Asp Leu Asp Ser Val Val Gln Glu  
 110                                  115                                  120                                  125

agc ggc gta gat aat ctt tac gtg tta acg gct ggt ccg atg cca cct 434  
 Ser Gly Val Asp Asn Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Pro Met Pro Pro  
                                   130                                  135                                  140

aac ccg gca gaa ctg ata ggt tct aag cgt atg cgt gac ttt gtt aaa 482  
 Asn Pro Ala Glu Leu Ile Gly Ser Lys Arg Met Arg Asp Phe Val Lys  
                                   145                                  150                                  155

ctt act gaa gaa cac tac gat tta gtt att atc gac tta gct cct gtt 530  
 Leu Thr Glu Glu His Tyr Asp Leu Val Ile Ile Asp Leu Ala Pro Val  
                   160                                  165                                  170

ctt gaa gta tct gat aca caa gaa ctt gct agt cac tta gat ggg gtt 578  
 Leu Glu Val Ser Asp Thr Gln Glu Leu Ala Ser His Leu Asp Gly Val  
           175                                  180                                  185

gtc tta gta gtt cgc caa ggg aag acg caa aag atg gcc att aag cgt 626  
 Val Leu Val Val Arg Gln Gly Lys Thr Gln Lys Met Ala Ile Lys Arg  
 190                                  195                                  200                                  205

gct gtt gaa atg ctt gaa ttt gca aag gca cgt atc ttg ggt tac atc 674  
 Ala Val Glu Met Leu Glu Phe Ala Lys Ala Arg Ile Leu Gly Tyr Ile  
                                   210                                  215                                  220

atg aat gat gta agt tct gat aat gcg ggt tat ggc tat ggt tac ggc 722  
 Met Asn Asp Val Ser Ser Asp Asn Ala Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly  
                                   225                                  230                                  235

tac ggc tat ggt tat ggc tac gga gaa gaa gat aca aag aaa aaa gga 770  
 Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Glu Glu Asp Thr Lys Lys Lys Gly  
                   240                                  245                                  250

ttg ttc tct aaa ttt agg aag taa 794  
 Leu Phe Ser Lys Phe Arg Lys \*  
           255                                  260

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 260

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 34

Met Pro Leu Phe Lys Lys Lys Arg Gly Thr Asp Glu Thr Ile Lys His  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Gly Ala Lys Leu Ile Thr Val Ala Lys Pro Lys Ser Pro Ile Ala Glu  
                   20                                  25                                  30  
 Gln Phe Arg Thr Val Arg Thr Asn Ile Asn Phe Met Ala Val Asp His  
           35                                  40                                  45

Asp Ile Lys Ser Leu Ala Phe Thr Ser Ala Asn Ile Ser Glu Gly Lys  
 50 55 60  
 Ser Thr Val Ala Ala Asn Val Ala Val Thr Tyr Ala Gln Ala Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Lys Val Leu Leu Val Asp Ala Asp Leu Arg Arg Pro Thr Val His Ser  
 85 90 95  
 Thr Phe Asn Leu Ser Asn His Val Gly Leu Ser Thr Val Ile Ser Ser  
 100 105 110  
 Thr Ala Lys Glu Val Asp Leu Asp Ser Val Val Gln Glu Ser Gly Val  
 115 120 125  
 Asp Asn Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Pro Met Pro Pro Asn Pro Ala  
 130 135 140  
 Glu Leu Ile Gly Ser Lys Arg Met Arg Asp Phe Val Lys Leu Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Glu His Tyr Asp Leu Val Ile Ile Asp Leu Ala Pro Val Leu Glu Val  
 165 170 175  
 Ser Asp Thr Gln Glu Leu Ala Ser His Leu Asp Gly Val Val Leu Val  
 180 185 190  
 Val Arg Gln Gly Lys Thr Gln Lys Met Ala Ile Lys Arg Ala Val Glu  
 195 200 205  
 Met Leu Glu Phe Ala Lys Ala Arg Ile Leu Gly Tyr Ile Met Asn Asp  
 210 215 220  
 Val Ser Ser Asp Asn Ala Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Tyr Gly Tyr Gly Glu Glu Asp Thr Lys Lys Lys Gly Leu Phe Ser  
 245 250 255  
 Lys Phe Arg Lys  
 260

<210> 35

<211> 887

<212> DNA

<213> Lactobacillus acidophilus

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(887)

<223> ORF LBA1736

<400> 35

aggaaagaga t atg gaa caa aaa caa gaa caa gaa aat aca atc gat ctt 50  
 Met Glu Gln Lys Gln Glu Gln Glu Asn Thr Ile Asp Leu  
 1 5 10  
 acc caa tta tta cgc att tgc cgt aag cat atc tgg gca ttg att ctt 98  
 Thr Gln Leu Leu Arg Ile Cys Arg Lys His Ile Trp Ala Leu Ile Leu  
 15 20 25  
 tgg agt gta ggt ctt gcc tta gtg ggc tgg gga gtt tca gaa ttt gta 146  
 Trp Ser Val Gly Leu Ala Leu Val Gly Trp Gly Val Ser Glu Phe Val  
 30 35 40 45  
 att tct cct aaa tat act tca act gct caa tta tta gtt aac caa aag 194  
 Ile Ser Pro Lys Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Leu Leu Val Asn Gln Lys  
 50 55 60  
 agt cgt aac aat gat cca aac gca gct tat gcg act caa caa gct aac 242  
 Ser Arg Asn Asn Asp Pro Asn Ala Ala Tyr Ala Thr Gln Gln Ala Asn  
 65 70 75



&lt;400&gt; 36

```

Met Glu Gln Lys Gln Glu Gln Glu Asn Thr Ile Asp Leu Thr Gln Leu
 1          5          10          15
Leu Arg Ile Cys Arg Lys His Ile Trp Ala Leu Ile Leu Trp Ser Val
 20          25          30
Gly Leu Ala Leu Val Gly Trp Gly Val Ser Glu Phe Val Ile Ser Pro
 35          40          45
Lys Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Leu Leu Val Asn Gln Lys Ser Arg Asn
 50          55          60
Asn Asp Pro Asn Ala Ala Tyr Ala Thr Gln Gln Ala Asn Met Gln Met
 65          70          75          80
Val Thr Thr Tyr Lys Asp Ile Val Thr Ser Asn Lys Ile Leu Thr Glu
 85          90          95
Ala Ser Asn Arg Leu Ala Asn Pro Thr Val Val Val Lys Lys Ala Gln
100          105          110
Lys Ala Val Tyr Arg Thr Asp Glu Asn Gly Arg Arg Arg Leu Val Arg
115          120          125
Lys Ala Gln Pro Ala Val Ile Glu Arg Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Val
130          135          140
Ser Ala Ser Glu Leu Ala Lys Ser Ile Ser Val Gly Thr Gln Gln Gln
145          150          155          160
Ser Gln Val Phe Ser Ile Ser Ala Glu Ala Asp Thr Pro Ala Lys Ala
165          170          175
Lys Ala Glu Val Asn Ala Val Ala Glu Thr Phe Arg Lys Glu Ile Pro
180          185          190
Thr Ile Met Ser Val Asn Asn Val Thr Ile Val Ala Asn Gly Thr Asn
195          200          205
Gly Val Gln Ser Ser Pro Asn Val Lys Leu Phe Thr Leu Ala Gly Phe
210          215          220
Val Val Gly Leu Val Leu Ser Phe Ala Val Val Ile Ile Arg Glu Met
225          230          235          240
Ser Asn Thr Thr Val Arg Asp Asp Glu Phe Leu Thr Arg Glu Leu Gly
245          250          255
Leu Thr Asn Leu Gly Gln Ile Ala His Phe His Leu Ser Ser Ser Phe
260          265          270
Thr Ile Lys Lys Ser Ala Asn Met Thr Asn Arg Gly Gln Ala Lys Arg
275          280          285
Arg Arg Val
290

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 1287

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1287)

&lt;223&gt; ORF LBA1923

&lt;400&gt; 37

```

atg agt aat aaa cgc cgg ctg tgg caa att ttt ggc cca gtt ctt tgc 48
Met Ser Asn Lys Arg Arg Leu Trp Gln Ile Phe Gly Pro Val Leu Cys
 1          5          10          15

gct ttt atc ctt tta tta gtt gta ttt ctt att ccc tgg gaa aga act 96
Ala Phe Ile Leu Leu Leu Val Val Phe Leu Ile Pro Trp Glu Arg Thr
 20          25          30

```

ttt tct aag caa act atc tat gaa gca gct gcc tca caa aat agt act	144
Phe Ser Lys Gln Thr Ile Tyr Glu Ala Ala Ala Ser Gln Asn Ser Thr	
35 40 45	
gta ttt aag ggc agt aca atg aag caa gaa gct tat aaa gat ggt tat	192
Val Phe Lys Gly Ser Thr Met Lys Gln Glu Ala Tyr Lys Asp Gly Tyr	
50 55 60	
gta cca ttc tat ggt tca agt gaa ttg tct aga ttt gat cca ctt cac	240
Val Pro Phe Tyr Gly Ser Ser Glu Leu Ser Arg Phe Asp Pro Leu His	
65 70 75 80	
cct agt gtt att gct gaa aag tat cac aga aat tac cgt cca ttt ctt	288
Pro Ser Val Ile Ala Glu Lys Tyr His Arg Asn Tyr Arg Pro Phe Leu	
85 90 95	
cta ggt gga cca ggt agt caa tct ttg gct caa ttc ttg ggg atg cag	336
Leu Gly Gly Pro Gly Ser Gln Ser Leu Ala Gln Phe Leu Gly Met Gln	
100 105 110	
ggt aca act aaa cag ctt aaa aac aaa aag gct gta gtg att att tca	384
Gly Thr Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Ala Val Val Ile Ile Ser	
115 120 125	
cca caa tgg ttt acc aag aaa ggc caa gat cct aat gca ttt gct tta	432
Pro Gln Trp Phe Thr Lys Lys Gly Gln Asp Pro Asn Ala Phe Ala Leu	
130 135 140	
tat tat tca cca ctt caa gca tgt aac ttc ttg tta agt gct aag aat	480
Tyr Tyr Ser Pro Leu Gln Ala Cys Asn Phe Leu Leu Ser Ala Lys Asn	
145 150 155 160	
aat aag act gat cgt tat gct gct aag cgt ctg ctt gat atg cca gat	528
Asn Lys Thr Asp Arg Tyr Ala Ala Lys Arg Leu Leu Asp Met Pro Asp	
165 170 175	
gta aag ggt gaa att aga aac agt ctt aag caa att gct gca ggt aaa	576
Val Lys Gly Glu Ile Arg Asn Ser Leu Lys Gln Ile Ala Ala Gly Lys	
180 185 190	
aag cta act act ttt gaa aga ttt tat tta gaa aat cgt cgt aga atg	624
Lys Leu Thr Thr Phe Glu Arg Phe Tyr Leu Glu Asn Arg Arg Arg Met	
195 200 205	
tta cgt aac gaa gat aac ttc ttt agt tca ttc caa tta cgc gat cgt	672
Leu Arg Asn Glu Asp Asn Phe Phe Ser Ser Phe Gln Leu Arg Asp Arg	
210 215 220	
gta aat aag att caa aat aga gct aaa gta tta cct aat act tat tct	720
Val Asn Lys Ile Gln Asn Arg Ala Lys Val Leu Pro Asn Thr Tyr Ser	
225 230 235 240	
gta gct gct ttg aac aag gtg gct gaa gaa cag gct gca gca cat act	768
Val Ala Ala Leu Asn Lys Val Ala Glu Glu Gln Ala Ala Ala His Thr	
245 250 255	
act tca aat aac ttg gga att gac aat act ttc tat aga act cgt ttg	816
Thr Ser Asn Asn Leu Gly Ile Asp Asn Thr Phe Tyr Arg Thr Arg Leu	
260 265 270	
cct aga aag gta tta aag aga ctc aag ggt agt caa cgt cac ttt gat	864

Pro Arg Lys Val Leu Lys Arg Leu Lys Gly Ser Gln Arg His Phe Asp  
275 280 285

tac gtt aga tct gtt gaa tat ggc gac ttc cag tta atg ctg gaa caa 912  
Tyr Val Arg Ser Val Glu Tyr Gly Asp Phe Gln Leu Met Leu Glu Gln  
290 295 300

ttt gcc aag caa cat act aat gtg ttg ttc att att cca cca att aat 960  
Phe Ala Lys Gln His Thr Asn Val Leu Phe Ile Ile Pro Pro Ile Asn  
305 310 315 320

ggg aag tgg atg aag tat act ggt tta tca caa aaa atg tat caa gaa 1008  
Gly Lys Trp Met Lys Tyr Thr Gly Leu Ser Gln Lys Met Tyr Gln Glu  
325 330 335

tca gtt gct aaa att gaa caa caa ttg act agt caa ggt ttt gaa aat 1056  
Ser Val Ala Lys Ile Glu Gln Gln Leu Thr Ser Gln Gly Phe Glu Asn  
340 345 350

att gca gat ctt tct aaa cgt ggt aat gaa aag tac ttc atg caa gat 1104  
Ile Ala Asp Leu Ser Lys Arg Gly Asn Glu Lys Tyr Phe Met Gln Asp  
355 360 365

act att cac ctt ggt tgg aaa ggc tgg gta gct gtt gat caa gct gtt 1152  
Thr Ile His Leu Gly Trp Lys Gly Trp Val Ala Val Asp Gln Ala Val  
370 375 380

aga cca ttt atg aag ttg cct aac gaa cgt tac aac tat gat atg tct 1200  
Arg Pro Phe Met Lys Leu Pro Asn Glu Arg Tyr Asn Tyr Asp Met Ser  
385 390 395 400

aac tac tac ttc tca aag aag tgg cag aat aaa gat aac gtt aaa cgt 1248  
Asn Tyr Tyr Phe Ser Lys Lys Trp Gln Asn Lys Asp Asn Val Lys Arg  
405 410 415

gta aat tta aat aat aaa gat cgt tta aaa gtg aag tag 1287  
Val Asn Leu Asn Asn Lys Asp Arg Leu Lys Val Lys \*  
420 425

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 428

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus acidophilus

&lt;400&gt; 38

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



**REIVINDICAÇÕES**

1. Método de aumento da adesão em uma bactéria de ácido lático caracterizado pelo fato de compreender a exposição da bactéria a condições adaptáveis de adesão que  
5 compreendem incubação das referidas células em uma concentração de pelo menos  $1 \times 10^9$  cfu/ml por um tempo suficiente para aumentar a adesão da bactéria de ácido lático.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
10 caracterizado pelo fato de que as condições adaptáveis de adesão compreendem uma concentração de cerca de  $1 \times 10^9$  cfu/ml das células por cerca de 1 hora.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
15 caracterizado pelo fato de que as condições adaptáveis de adesão aumentam a expressão de pelo menos um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste em Id. de Seq. N°: 19, 33, 35 ou 37, ou um polinucleotídeo que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência à seqüência de Id. de Seq. N°: 19, 33, 35 ou 37.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende o contato das bactérias de ácido lático a um substrato.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4,  
25 caracterizado pelo fato de que o substrato compreende uma célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma célula epitelial ou uma célula mucosa.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1,  
30 caracterizado pelo fato de que a adesão aumentada melhora

pelo menos uma propriedade probiótica das bactérias de ácido lático.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria de ácido lático expressa um polipeptídeo terapêutico.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo terapêutico é heterólogo à bactéria.

11. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital é de um ser humano, animal doméstico ou um animal de agricultura.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a tolerância ao estresse da bactéria de ácido lático é melhorada.

13. Bactéria de ácido lático caracterizada pelo fato de ser produzida pelo método da reivindicação 1.

14. Bactéria de ácido lático caracterizada pelo fato de ser produzida método da reivindicação 2.

15. Cultura de bactérias caracterizada pelo fato de compreender a bactéria de ácido lático da reivindicação 13.

16. Método de liberação de um polipeptídeo terapêutico a um indivíduo caracterizado pelo fato de compreender:

a) o fornecimento de uma bactéria de ácido lático que tem um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo terapêutico;

b) exposição das referidas bactérias de ácido lático a condições adaptáveis de adesão que compreendem incubação das referidas células em uma concentração de pelo menos  $1 \times 10^9$  cfu/ml por um tempo suficiente para aumentar a adesão da referida bactéria de ácido lático;

c) administração da referida bactéria de ácido lático da etapa (b) ao indivíduo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as condições adaptáveis de adesão compreendem uma concentração de cerca de  $1 \times 10^9$  cfu/ml das referidas células por cerca de 1 hora.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, and *L. plantarum*.

19. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o indivíduo compreende um ser humano, animal doméstico ou um animal de agricultura

20. Método de indução ou aumento da produção de "auto-indutor-2" em uma bactéria caracterizado pelo fato de compreender a introdução na bactéria de pelo menos duas moléculas de ácido nucleico heterólogo selecionadas do grupo que consiste em:

(a)(i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°:1;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (a)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem a hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em

0,1 X SSC em 60°C a 65°C;

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 1; ou,

5 (iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 2;

(b) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de  
10 Seq. N°: 3;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (b)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em  
15 0,1 X SSC a 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 3; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um  
20 polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 4;

(c) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende a seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°:15;

25 (ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (c)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

30 (iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo

menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 15; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de  
5 Seq. N°: 16;

(d) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 21;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao  
10 complemento do ácido nucleico de (d)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo  
15 menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 21; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 22; e,

(e) (i) uma molécula de ácido nucleico que  
20 compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 13;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao  
25 complemento do ácido nucleico de (e)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo  
30 menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 13;

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 14;

em que a bactéria produz maiores quantidades de "auto-indutor-2" do que a bactéria de controle correspondente.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ainda compreender a exposição da bactéria a condições adaptáveis de adesão que compreendem incubação das células em uma concentração de pelo menos  $1 \times 10^9$  cfu/ml por um tempo suficiente para aumentar a adesão da bactéria de ácido lático.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que as condições adaptáveis de adesão compreendem uma concentração de cerca de  $1 \times 10^9$  cfu/ml das células por cerca de 1 hora.

23. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a bactéria é uma bactéria de ácido lático.

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a bactéria é probiótica.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a adesão aumentada melhora pelo menos uma propriedade probiótica da bactéria.

26. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a bactéria de ácido lático é selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a bactéria de ácido lático expressa um polipeptídeo terapêutico.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo terapêutico é heterólogo à bactéria.

29. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a tolerância ao estresse da bactéria de ácido lático é melhorada.

30. Bactéria caracterizada pelo fato de compreender pelo menos duas moléculas de ácido nucleico heterólogo selecionadas do grupo que consiste em:

10 (a) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 1;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (a)(i) sob condições 15 severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos 20 apresentada em Id. de Seq. N°: 1; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 2;

25 (b) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 3;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (b)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em 30 formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em

0,1 X SSC em 60°C a 65°C; and

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 3; ou,

5 (iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 4;

(c) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de  
10 Seq. N°:15;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (c)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em  
15 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 15; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um  
20 polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 16;

(d) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 21;

25 (ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (d)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

30 (iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo

menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 21; ou,

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de  
5 Seq. N°: 22; e,

(e) (i) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°: 13;

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao  
10 complemento do ácido nucleico de (e)(i) sob condições severas, as condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C; e

(iii) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo  
15 menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 13;

(iv) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°: 14;

20 em que a referida bactéria produz maiores quantidades de "auto-indutor-2" que a bactéria de tipo selvagem correspondente.

31. Bactéria, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a bactéria é uma bactéria de  
25 ácido lático.

32. Bactéria, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a bactéria é probiótica.

33. Bactéria, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que a bactéria de ácido lático é  
30 selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus*

*acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*.

34. Bactéria, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que a bactéria de ácido láctico expressa um polipeptídeo terapêutico.

5 35. Bactéria, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo terapêutico é heterólogo à bactéria.

36. Bactéria, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que a tolerância ao estresse da  
10 bactéria de ácido láctico é melhorada.

37. Cultura de bactérias caracterizada pelo fato de compreender as bactérias da reivindicação 30.

38. Método de rastreamento de condições ambientais que aumentem a adesão da bactéria de ácido láctico a um  
15 substrato caracterizado pelo fato de compreender:

a) a submissão da bactéria a uma condição ambiental suspeita de aumentar a adesão; e,

b) contato da bactéria ao substrato;

em que um aumento na adesão da bactéria submetida à  
20 condição ambiental ao substrato comparada à adesão de uma bactéria de controle que não foi submetida às condições ambientais indica que a condição ambiental é eficaz no aumento da adesão da bactéria.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38,  
25 caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*.

40. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o substrato compreende uma  
30 célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma célula epitelial ou uma célula mucosa.

42. Método para modular a adesão em uma bactéria caracterizada pelo fato de compreender a introdução na bactéria de pelo menos uma molécula de ácido nucleico heterólogo selecionada do grupo que consiste em:

a) uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos como apresentada em Id. de Seq. N°:1, 3, ou 21;

b) uma molécula de ácido nucleico que hibridiza ao complemento do ácido nucleico de (a) sob condições severas, as referidas condições severas compreendem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,1 X SSC em 60°C a 65°C;

c) uma molécula de ácido nucleico que tem pelo menos 90% de identidade à seqüência de nucleotídeos apresentada em Id. de Seq. N°: 1, 3 ou 21; ou,

d) uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade a Id. de Seq. N°:2, 4 ou 22;

em que a adesão na bactéria é modulada quando comparada à adesão em uma bactéria que não compreende a molécula de ácido nucleico heterólogo de (a), (b), (c), ou (d).

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada do grupo que consiste em *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42,

caracterizado pelo fato de que o substrato compreende uma célula do trato gastrointestinal ou do trato urogenital.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma  
5 célula epitelial ou uma célula mucosa.

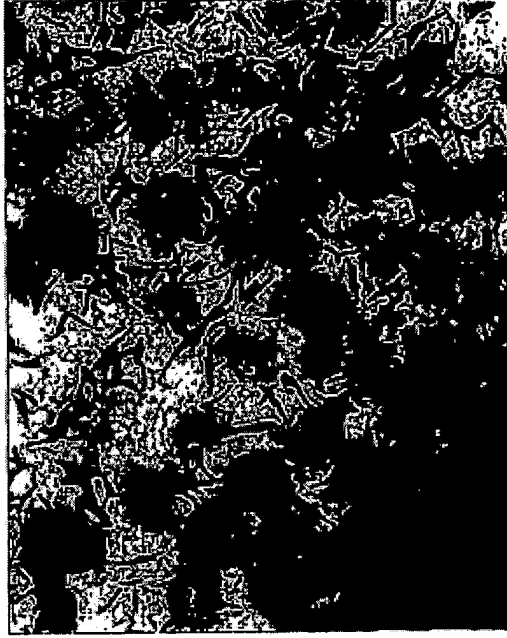


FIG. 1B



FIG. 1A

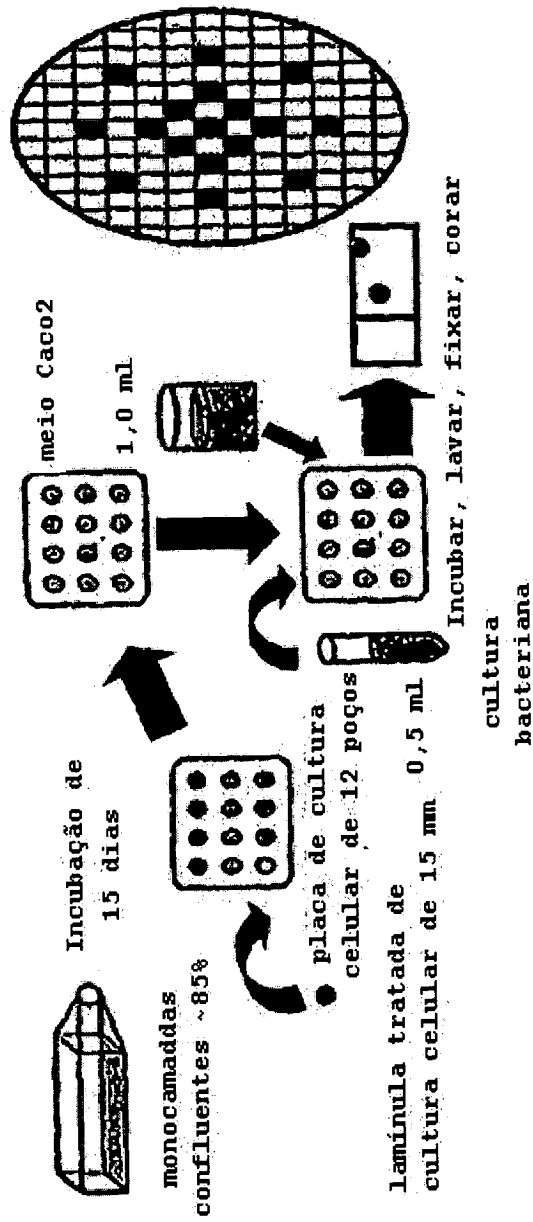


FIG. 2

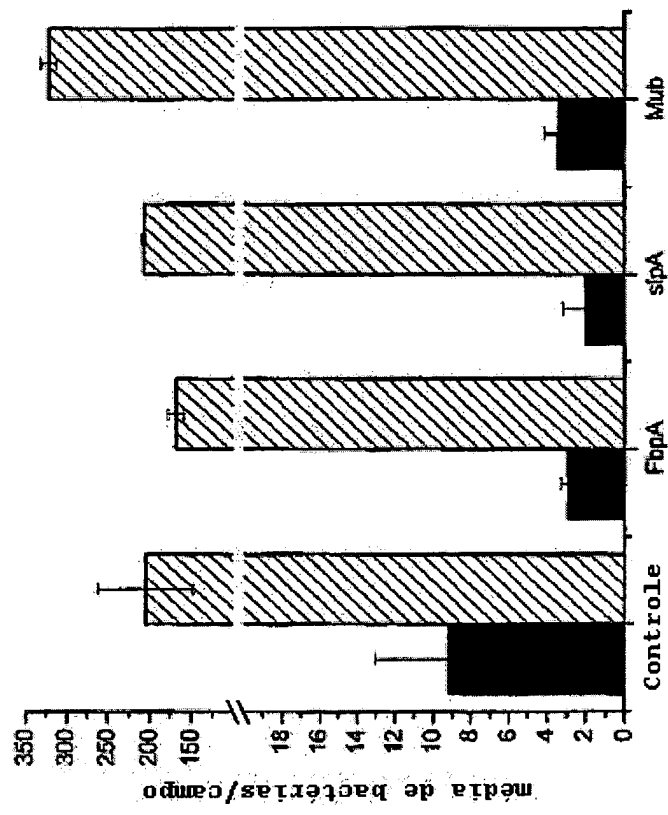


FIG. 3

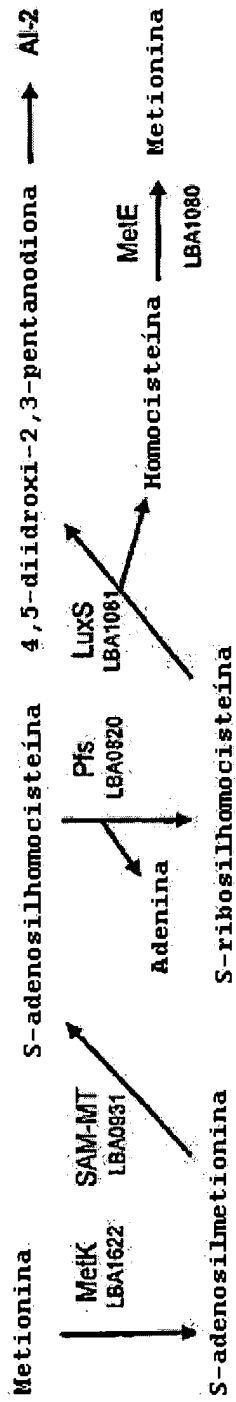


FIG. 4

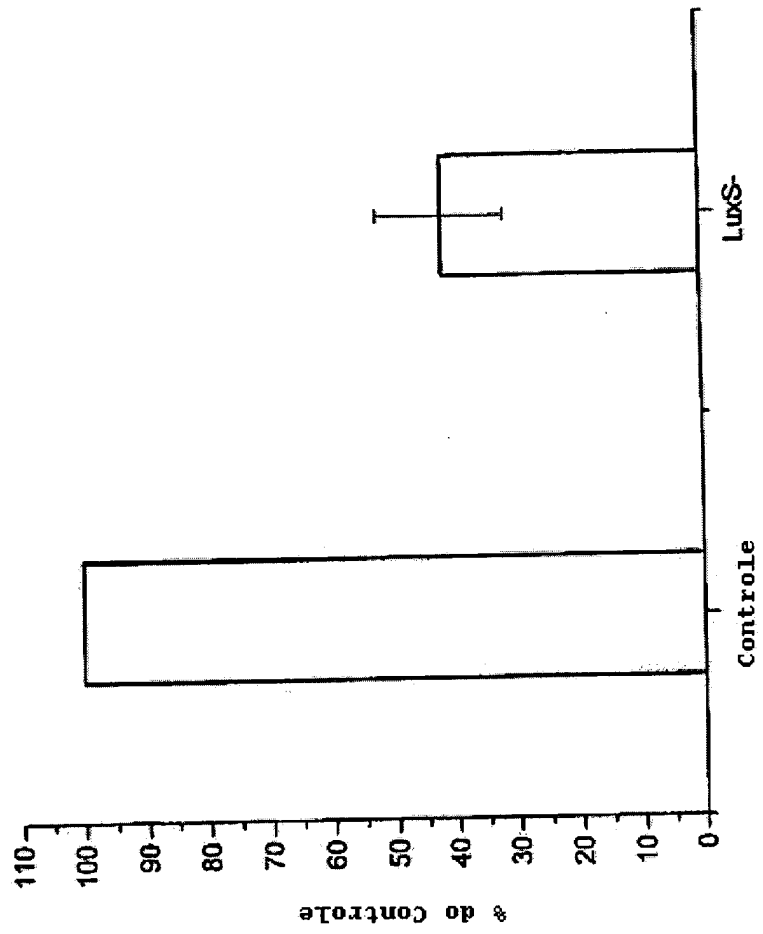


FIG. 5

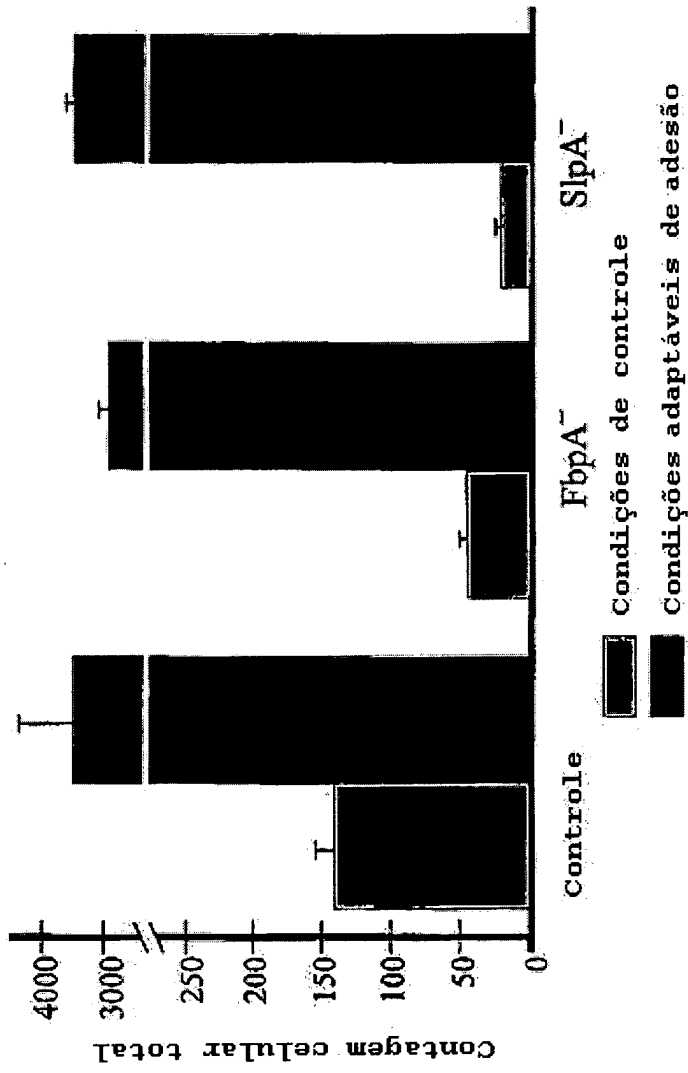


FIG. 6

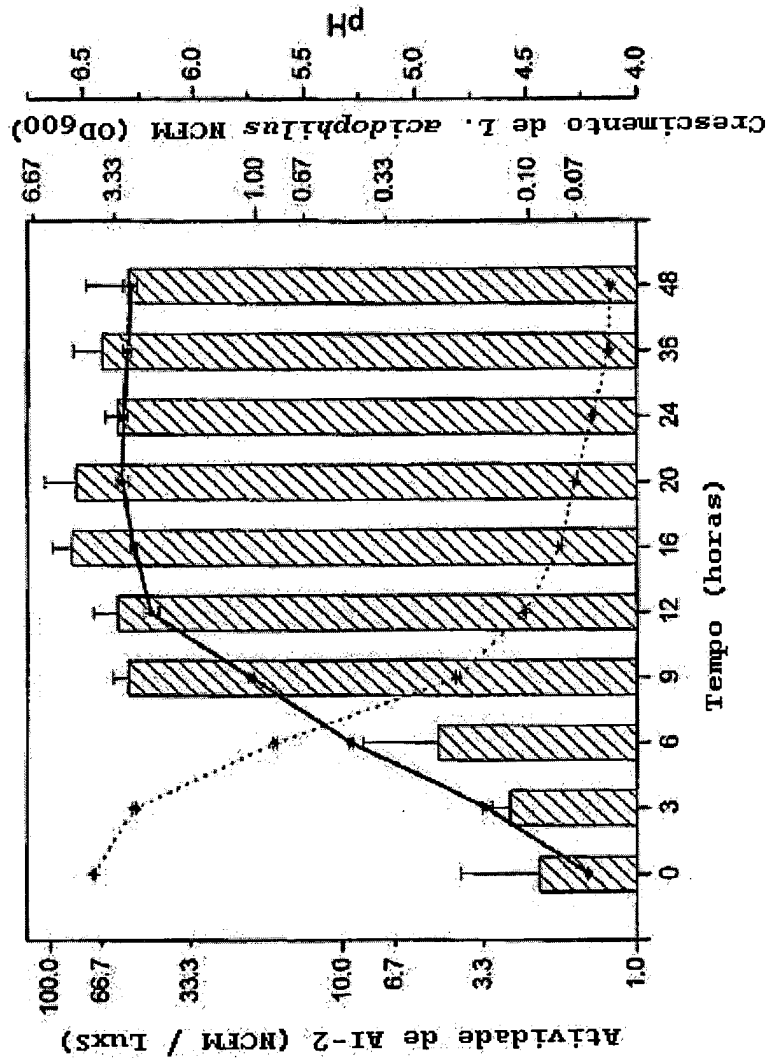


FIG. 7

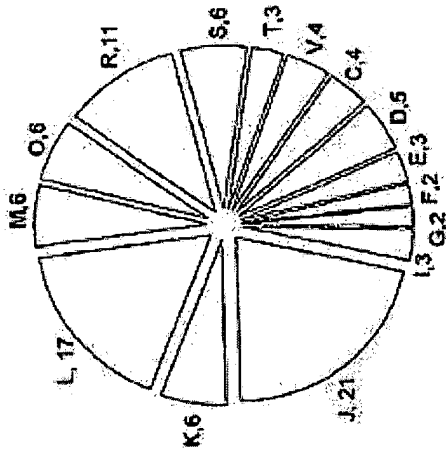


FIG. 8A

## Grupo Classificação COG

C	Produção e conversão de energia
D	Controle do ciclo celular, divisão celular
E	Transporte e metabolismo de aminoácidos
F	Transporte e metabolismo de nucleotídeos
G	Transporte e metabolismo de carboidratos
I	Transporte e metabolismo de lipídeos
J	Tradução, estrutura e biogênese ribossômica
K	Transcrição
L	Replicação, recombinação e reparo
M	Biogênese da parede celular, membrana e envelope
O	Modificação pós-tradução, turnover de proteína, chaperonas
P	Transporte e metabolismo de ions inorgânicos
Q	Biossíntese de metabólitos secundários
R	Somente previsão da função geral
S	Função desconhecida
T	Mecanismos de transdução de sinal
V	Mecanismos de defesa

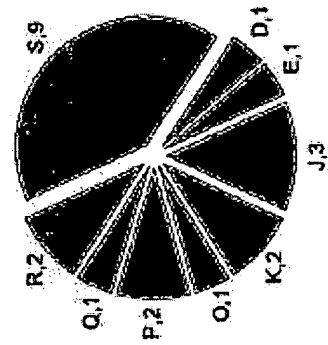


FIG. 8B

FIG. 8C

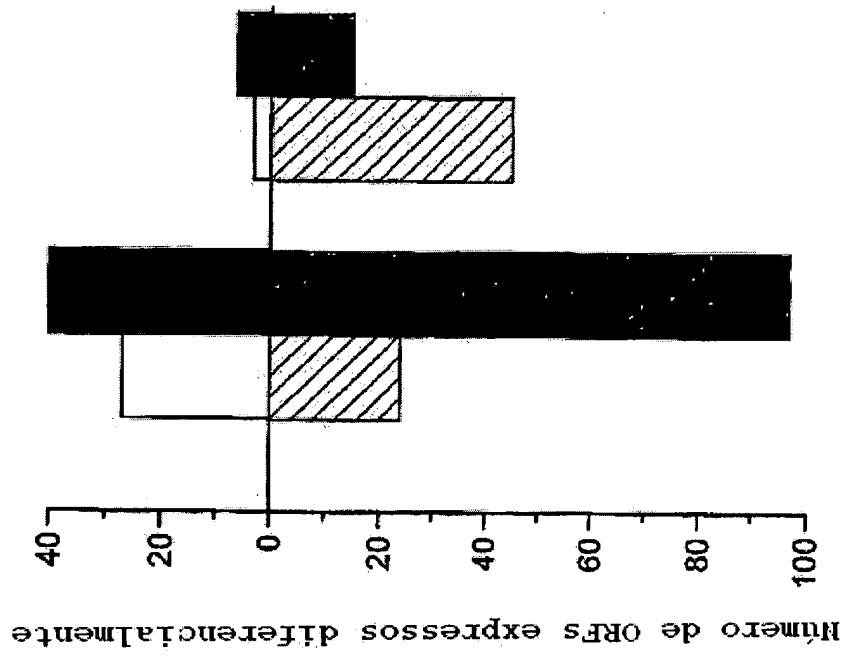


FIG. 9A      FIG. 9B

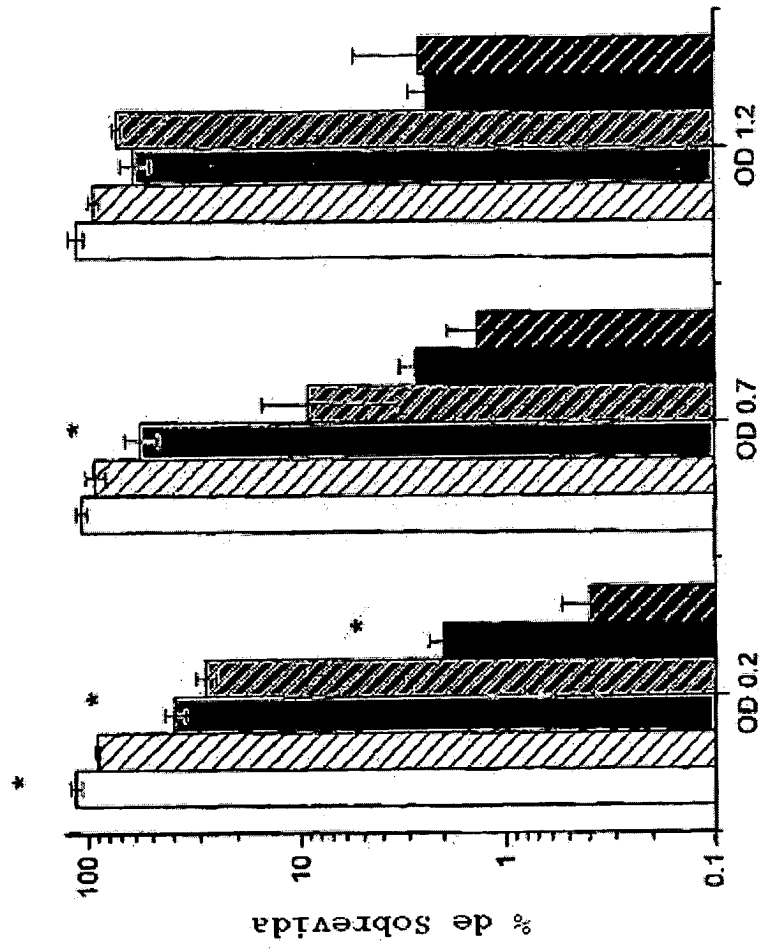


FIG. 11B

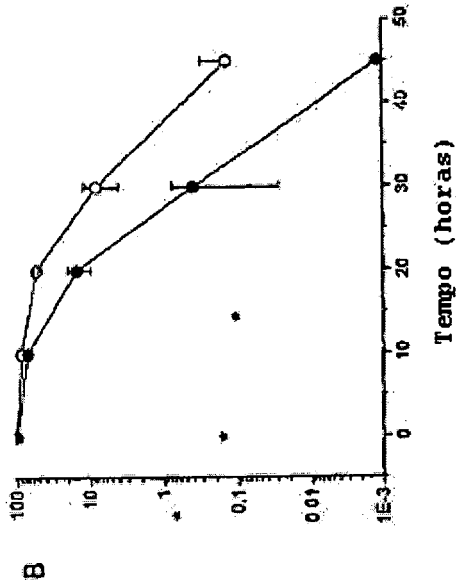
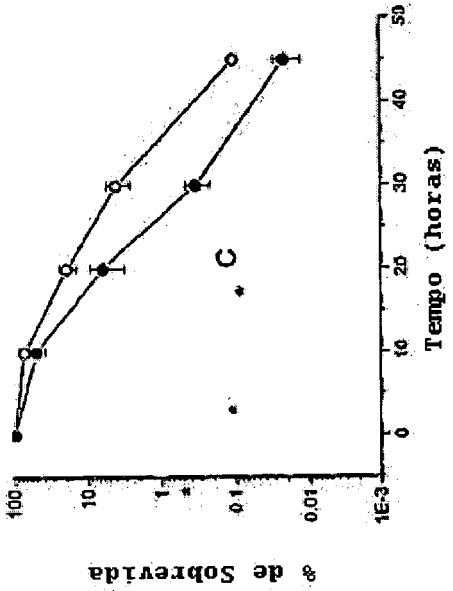


FIG. 11A

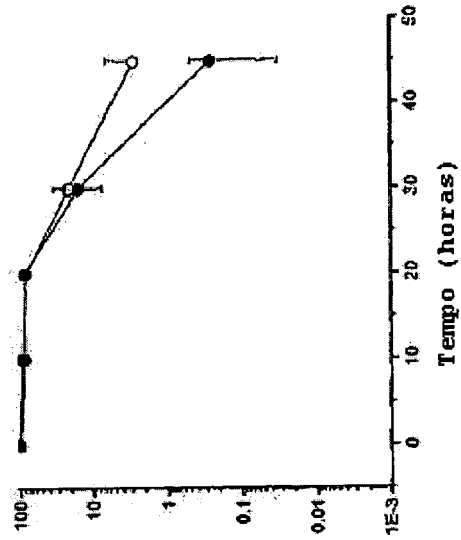


A

B

% de Sobrevida

FIG. 11C



MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A ADESÃO E TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE EM BACTÉRIAS

São fornecidos métodos e composições que melhoram a adesão de um bactéria a substratos alvo e/ou melhoram a tolerância ao estresse da bactéria. Métodos compreendem a exposição da bactéria a condições adaptáveis de adesão e dessa forma aumentam a atividade de adesão e/ou tolerância ao estresse da bactéria. Além disso, são fornecidas bactérias que têm uma produção modulada de "auto-indutor-2". Composições incluem bactérias recombinantes que expressam moléculas de ácido nucleico envolvidas na via de produção de "auto-indutor-2". Além disso, são fornecidas proteínas de fusão relacionadas a "auto-indutor-2", peptídeos antigênicos, anticorpos e vetores. Métodos de rastreamento de compostos ou de condições ambientais que estimulam a produção de "auto-indutor-2" e/ou produzem uma resposta adaptável de adesão são também fornecidos, assim como vários métodos de uso para as bactérias que têm adesão aumentada e/ou tolerância ao estresse.