

Expressão e endereçamento de proteínas heterólogas em *Lactococcus lactis*

Fernanda Alves Dorella*

Anderson Miyoshi**

Daniela Santos Pontes***

Vasco Azevedo****

Resumo

As bactérias do ácido láctico (BAL) são gram-positivas e organismos considerados seguros (GRAS). As BAL são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e estão presentes nos intestinos da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Por isso podem ser utilizadas para expressar proteínas heterólogas e possuem potencial para serem veículos de apresentação de antígenos. Neste trabalho, descrevem-se diversos sistemas de expressão capazes de dirigir a proteína heteróloga para localizações específicas da célula como: citoplasma, parede e meio extracelular. Entretanto, dá-se maior ênfase aos sistemas de expressão das BAL que são capazes de secretar os antígenos nestas linhagens.

Palavras-chave: Bactérias do ácido láctico. *Lactococcus lactis*. Proteínas heterólogas. Endereçamento protéico. Secreção de proteínas.

AS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO

Características gerais

As bactérias do ácido láctico (BAL) constituem um grupo de cocos ou bacilos gram-positivos relacionados filogeneticamente (DE VOS, 1999). Estão presentes neste grupo microrganismos bastante heterogêneos encontrados em diferentes nichos ecológicos, como vegetais, carnes, e nas superfícies da mucosa humana ou animal (STACKEBRANDT; TEUBER, 1988).

Alguns dos gêneros que fazem parte deste grupo são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus* (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Essas bactérias são anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, imóveis, possuem habilidade de crescer em baixo pH, requerem diferentes nutrientes para seu crescimento (carboidratos, aminoácidos e vitaminas), são catalase negativas e têm como principal característica a conversão de açúcares em ácido láctico (KANDLER, 1983; STACKEBRANDT; TEUBER, 1988).

* Mestranda. Programa em Genética. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

** Doutorando. Programa em Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

*** Doutorando. Programa em Genética. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

**** Professor Adjunto do Departamento de Biologia Geral. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG. Laboratório de Genética Celular e Molecular
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 Campus Pampulha
31.270-901 Belo Horizonte Minas Gerais Brasil
E-mail: vasco@mono.icb.ufmg.br

É interessante notar que, dentro de um mesmo gênero, existem linhagens não patogênicas e patogênicas. Por exemplo, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* são usadas na produção de iogurte e queijo, e *Streptococcus pneumoniae* e *Lactococcus garviae* são agentes da pneumonia e da mastite, respectivamente. Desta forma, as BAL não patogênicas, inócuas e consideradas GRAS (*generally regarded as safe*) são interessantes para serem utilizadas como agentes bioterapêuticos (AGUIRRE; COLLINS, 1993).

Utilizações terapêuticas e biotecnológicas das BAL

O advento de novas tecnologias permitiu diversas possibilidades de utilização das BAL, que vão desde seu uso tradicional, como a produção de alimentos ou como probióticos que têm um efeito positivo na saúde dos homens e animais, até a produção de proteínas heterólogas, como enzimas ou peptídeos com atividade antimicrobiana, antigênicas, e metabólitos que contribuam para as características organolépticas dos alimentos ou como nutracêuticos (LANGELLA; LE LOIR, 1999; DROUAULT et al., 1999; DE VOS, 1999; CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1999).

Atividades probióticas

Uma bactéria é dita probiótica quando, ao ser ingerida viva, é capaz de promover o equilíbrio da microbiota intestinal, melhorando o estado geral da saúde do hospedeiro (FULLER, 1989). Muitas BAL são conhecidas por exibirem tais atividades, como: *Lactobacillus casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *L. lactis*, que se destacam por suas aplicações terapêuticas no tratamento e na prevenção de diversos distúrbios (O'SULLIVAN, 1992; MARTEAU; RAMBAUD, 1993).

Três tipos de atividades probióticas foram comprovadas cientificamente. A primeira está relacionada à digestibilidade da lactose. Esse açúcar, presente em abundância nos produtos lácteos, pode induzir fenômeno de intolerância nos consumidores que possuam deficiência congênita em lactase, enzima responsável pela sua

degradação (O'SULLIVAN, 1992; SALMINEN; DEIGHTON; GORBACH, 1993). O quadro clínico pode ser traduzido por diarréias, cólicas abdominais ou flatulência (ROBERFROID, 2000). Curiosamente, esses sintomas aparecem quando a lactose é absorvida do leite, mas são ausentes quando absorvidas do iogurte nas mesmas proporções. Existem duas possíveis explicações para o fenômeno: a flora bacteriana do iogurte (*S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*) (i) suplementaria a deficiência em lactase do hospedeiro com a sua; (ii) estimularia, na mucosa intestinal do hospedeiro, a produção endógena da lactase (MARTEAU; RAMBAUD, 1993; O'SULLIVAN, 1992).

Outra aplicação das BAL probióticas seria a de proteção contra patógenos microbianos. Sendo assim, essa microbiota desejável protege e proporciona benefícios à saúde do hospedeiro, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos e impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, desconjugando ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio e ferro, e, por meio de suas enzimas, favorecendo o metabolismo de algumas substâncias como a lactose, em indivíduos que não produzem lactase (FERREIRA; TESHIMA, 2000; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Uma última aplicação bastante importante é a estimulação do sistema imune do hospedeiro contra patógenos quando antígenos são produzidos nestes veículos, e a capacidade de potenciá-los, pois estas bactérias têm efeitos adjuvantes. Entre os lactobacilos, o *Lb. casei* mostrou-se capaz de estimular a resposta imune protetora em crianças quando vacinadas por via oral contra o rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil nos países em desenvolvimento (ISOLAURI et al., 1995). Os *Lb. acidophilus* são habitantes normais do intestino do hospedeiro e podem induzir a produção de citocinas que estimulam a resposta inata do hospedeiro frente a patógenos (NEUMANN et al., 1998).

Novas utilizações das BAL

Uma aplicação bastante interessante é a possibilidade de sua utilização para produzir

moléculas de interesse econômico em fermentadores. Assim, a secreção destas moléculas apresentaria certas vantagens em relação à produção intracelular, como: (i) a facilidade de purificação do produto final; (ii) uma cultura celular contínua; e (iii) evitaria a formação de agregados protéicos intracelulares (LANGELLA; LE LOIR, 1999).

A utilização das BAL na produção de proteínas de interesse médico e farmacêutico é também de grande valia. Por exemplo, BAL produzindo enzimas que suplementassem a deficiência pancreática ou vitamínica de um indivíduo, quando consumidas com os alimentos (DROUAULT et al., 2002). Além disso, para a indústria de alimentos, elas podem produzir enzimas capazes de modificar as propriedades organolépticas dos produtos, prevenir o aparecimento de linhagens bacterianas indesejáveis, acelerar a maturação de queijos, entre outros.

Uma das maneiras mais atraentes de utilização das BAL é como usinas celulares produtoras e apresentadoras de antígenos, sendo o *L. lactis*, uma das BAL mais promissoras. Esta possibilidade tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de novas vacinas utilizando estes organismos. Por serem consideradas GRAS e algumas espécies possuem a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal ou a mucosa genital de certos animais e do homem, essas bactérias tornaram-se excelentes candidatas a vacinas orais (DOUGAN, 1994; ROBINSON et al., 1997; MERCENIER et al., 2000).

***Lactococcus lactis*: a bactéria láctica modelo**

Lactococcus lactis é uma bactéria gram-positiva, não patogênica, não invasiva e não colonizadora que, assim como muitas de seu grupo, possui o *status* de GRAS, ou seja, é considerada inócua (ROBINSON et al., 1997). Esse microrganismo é considerado modelo por possuir muitos instrumentos genéticos disponíveis, ser de fácil manipulação, e seu genoma já ter sido completamente seqüenciado (DE VOS, 1999; BOLOTIN et al., 2001). Além disso, é eco-

nomicamente importante, devido à sua ampla utilização na fabricação de produtos lácteos (LE LOIR et al., 1994).

SISTEMAS DE EXPRESSÃO E ENDEREÇAMENTO CELULAR DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *L. LACTIS*

Expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis*

Atualmente, existem vários sistemas capazes de controlar e aumentar a quantidade de proteínas heterólogas produzidas nas BAL, e *L. lactis* tem sido amplamente utilizado para esta finalidade com resultados bastante interessantes.

Inúmeras estratégias têm sido empregadas para o aumento da expressão gênica em lactococos, como uso de promotores constitutivos e indutivos, plasmídios com alto número de cópias, entre outros (DE RUYTER; KUIPERS; DE VOS, 1996). O uso de promotores constitutivos é muito atraente, pois não há necessidade de se ativar o promotor por meio de indutores, e a expressão gênica ocorre constantemente, promovendo a síntese da proteína de interesse. Um grupo de 38 promotores que possuem diferentes intensidades de expressão já foram caracterizados, alguns deles reconhecidos como promotores fortes, como o P₅₉ (DE VOS, 1999). Contudo, a produção contínua de certas proteínas pode gerar um estresse fisiológico na célula que prejudicaria seu crescimento e causaria complicações na expressão do gene de interesse, podendo, ainda, tornar-se tóxica para a célula, inviabilizando o seu crescimento e levando-a à morte (CHAMBERLAIN et al., 1997). Nesses casos, sistemas de expressão contendo promotores que são regulados por indutores, repressores ou fatores ambientais são essenciais para o controle da expressão gênica, oferecendo, ainda, algumas vantagens sobre os sistemas constitutivos, como a capacidade de controlar o nível de produção e modular a expressão da proteína. Vários desses sistemas de expressão indutíveis já foram bem caracterizados (QUADRO 1) (KUIPERS et al.,

1997). Em BAL e, mais especificamente, em *L. lactis*, um dos sistemas mais eficientes utilizados é aquele induzido por nisina, o qual será abordado

com mais profundidade nesta revisão (DE RUYTER; KUIPERS; DE VOS, 1996; KUIPERS et al., 1997; DE VOS, 1999).

BAL	Promotores / Repressores	Fator indutor	Genes expressos
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>lacA</i> ou <i>lacR</i>	Lactose	<i>cat-86</i> , <i>luxAB</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>lacA</i> /T7	Lactose	Gene para TTFC
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>dnaJ</i>	Alta temperatura	<i>amyS</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>sodA</i>	Aeração	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>prtP</i> ou <i>prtM</i>	Ausência de peptídeos	<i>gusA</i>
<i>L. lactis</i>	Repressor/ operador <i>frlt</i>	Mitomicina C	<i>lacZ</i>
<i>Lb. pentosus</i>	Promotor <i>xylA</i>	Xilose	<i>cat-86</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor PA170	Baixo pH, baixa temperatura	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>trpE</i>	Ausência de triptofano	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>f31</i> e <i>ori</i>	Infecção pelo f31	<i>lacZ</i>
<i>L. lactis</i>	Promotor <i>nisA</i> ou <i>nisF</i>	Nisina	<i>gusA</i> , <i>pepN</i> , <i>lytHA</i> , <i>nox</i> , <i>EstA</i> , <i>ptsH</i> , <i>pepO</i> , <i>ccpA</i>

QUADRO 1 – Características dos sistemas de expressão indutíveis

Sistema NICE (Nisin Controlled Expression)

O sistema NICE é baseado no controle de genes envolvidos na biossíntese e expressão da nisina. A nisina é um peptídeo de 34 aminoácidos, possui capacidades antimicrobianas e é amplamente utilizado na indústria alimentar como conservante natural de alimentos (DE RUYTER; KUIPERS; DE VOS, 1996; KUIPERS et al., 1997; DE VOS, 1999; CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1999).

Um grupo de onze genes (*nisABTCL-PRKFEG*) participa na produção, modificação e secreção deste peptídeo. O gene *nisA* codifica o peptídeo precursor nisina A, de 57 resíduos de aminoácidos (BUCHMAN; BANERJEE; HANSEN, 1988; KALETTA; ENTIAN, 1989), *nisBC* estão envolvidos em modificações pós-transcricionais, *nisT* participa do transporte através da membrana citoplasmática (ENGELKE et al., 1992; KUIPERS et al., 1993), e *nisP* está relacionado à quebra do precursor da nisina (VAN DER MEER et al., 1993). O gene *nisI* em conjunto com os genes

nisFEG codificam uma lipoproteína que confere imunidade contra a nisina à linhagem produtora (KUIPERS et al., 1993; SIEGERS; ENTIAN, 1995). E por fim, os genes *nisK* e *nisR*, que codificam os membros de um sistema regulador de dois componentes (NisRK), o que controla a expressão dos onze genes através da transdução de sinal. NisK funciona como sensor de membrana que sente a presença extracelular de nisina. O sinal é subsequentemente transferido para NisR através de um processo de fosforilação que a torna ativa. NisR, então, é capaz de acionar a transcrição dos genes controlados pelo promotor P_{*nisA*} (CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1999).

Baseados nessas informações, vários sistemas de expressão gênica induzidos por nisina foram desenvolvidos (DE RUYTER et al., 1996). Uma variedade de vetores de expressão contendo o promotor P_{*nisA*} seguidos de sítios de clonagem múltipla (MCS) para a inserção destes genes está disponível. Os sistemas só podem ser explorados em linhagens contendo apenas os genes *nisR* e *nisK* no cromossomo (FIGURA 1).

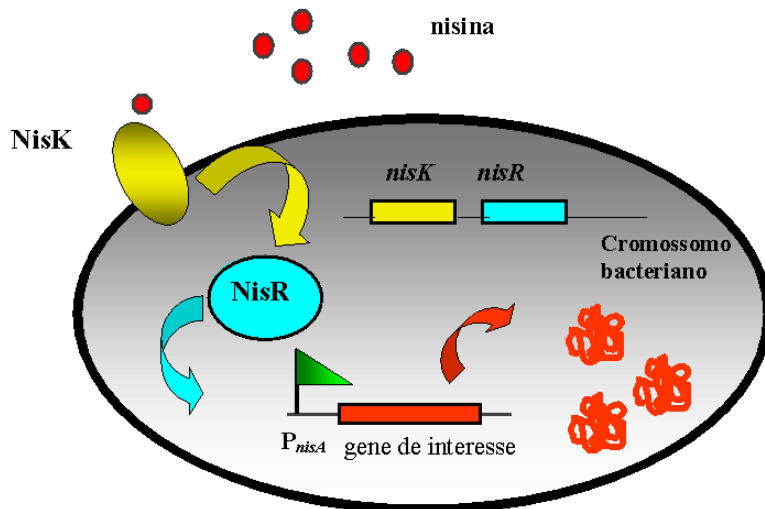


FIGURA 1– Sistema de expressão NICE

A presença de nisina no meio extracelular é percebida pela proteína sensora NisK que, através de um processo de transdução de sinal, ativa a proteína efetora NisR. Conseqüentemente, a forma ativa de NisR induz a expressão do gene de interesse, que está sob o controle do promotor P_{nisA} , localizado em um vetor.

Sistemas de endereçamento celular de proteínas heterólogas em *L. lactis*

Com este eficiente sistema de expressão à disposição, o próximo passo é o endereçamento das proteínas de interesse para um dos três compartimentos celulares: citoplasma, parede celular e meio extracelular. A escolha deste é feita de modo a facilitar o contato da proteína de interesse com seu alvo.

O endereçamento citoplasmático é o mais simples, pois todas as proteínas são sintetizadas neste local, não necessitando, portanto, de qualquer sinal de endereçamento protéico. Entretanto, para que as proteínas sejam endereçadas para a parede celular ou meio extracelular, faz-se necessário o uso de seqüências sinais ou motivos protéicos, como, por exemplo, o peptídeo sinal (PS), que é um motivo hidrofóbico, pouco conservado, negativamente carregado e que se localiza na porção aminoterminal (N-terminal) das proteínas naturalmente secretadas pela célula. Ao ser reconhecido, é clivado pela maquinaria de secreção, permitindo, assim, que a proteína seja translocada através da membrana e liberada no meio extracelular (SIMONEN; PALVA, 1993). Para que as proteínas possam

ser endereçadas para a parede celular, além de um peptídeo sinal, elas devem conter um motivo de ancoramento (Cell Wall Anchor - CWA). Este motivo, em geral, possui em torno de 30 aminoácidos e tem a presença de um motivo conservado (LPXTG) e de um fragmento transmembrana e uma porção carboxiterminal carregada positivamente (C-terminal). A proteína translocada para fora da célula fica, então, covalentemente presa ao peptidoglicano pelo motivo LPXTG (TON-THAT et al., 1999). A combinação de sistemas de secreção e ancoramento é bastante versátil, no que diz respeito ao endereçamento protéico em BAL, para uso como vetores de proteínas heterólogas (DIEYE et al., 2001).

Um dos estudos pioneiros sobre sistemas de expressão e endereçamento de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi baseado no sistema T7 RNA polímerase (WELLS et al., 1993). Nesse sistema, o promotor T7 foi fusionado ao fragmento de DNA que codifica o peptídeo sinal da proteína Usp45 (PS_{Usp45}) e, em seguida, ao gene da TTFC. Após a indução do sistema, viu-se que a proteína TTFC foi secretada para o meio extracelular em quantidades significativas (2,9 mg/L) (WELLS et al., 1993). Um outro sistema mais simples e eficiente, desenvolvido

por Dieye e colaboradores (2001), utiliza elementos como o promotor constitutivo P_{59} , o peptídeo sinal PS_{Usp45} e o motivo de ancoramento CWA de proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*, além da proteína repórter Nuc de *Staphylococcus aureus* (VAN ASSELDONK et al., 1990; PIARD

et al., 1997; SHORTLE, 1983). Neste sistema, a proteína Nuc pôde ser endereçada para as três localizações celulares possíveis (FIGURA 2). Também foi demonstrado que, após atingir seu destino, a proteína mantinha sua atividade biológica (DIEYE et al., 2001).

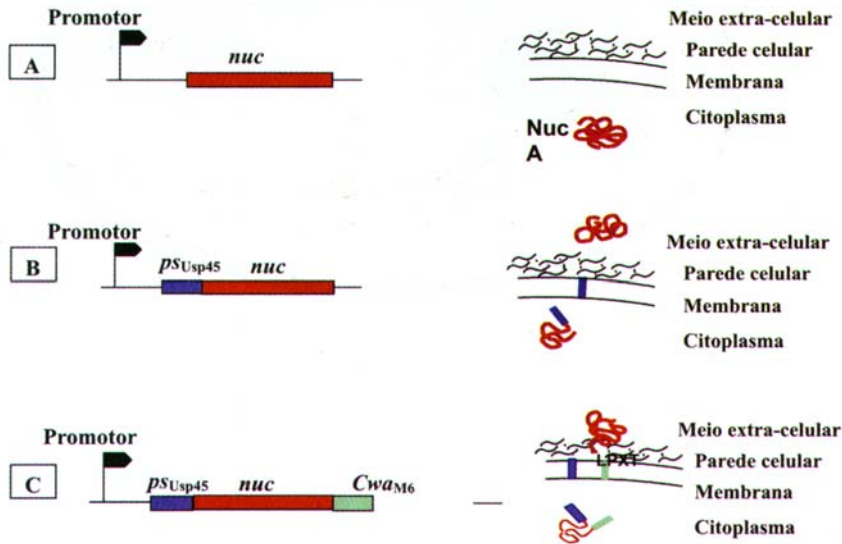


FIGURA 2 – Representação esquemática do sistema de expressão e endereçamento proteico. (A) Localização citoplasmática de Nuc. A ausência de qualquer sinal de endereçamento proteico fusionado ao gene *nuc* (barra vermelha) resulta na localização citoplasmática da proteína (à direita). (B) Localização extracelular de Nuc. A presença da sequência codificadora do peptídeo sinal de Usp45 (ps_{Usp45} /barra azul) endereça Nuc para o meio extracelular (à direita). (C) Nuc ancorada à célula. A fusão da sequência codificadora do peptídeo sinal PS_{Usp45} da sequência codificadora do motivo de ancoragem cwa_{M6} (barra verde) faz com que a proteína permaneça ancorada à parede celular (à direita).

Pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica (INRA), similar à nossa EMBRAPA, desenvolveram um terceiro sistema, visando a melhorar e aumentar a secreção de proteínas heterólogas (LE LOIR et al., 2001). Em estudos anteriores utilizando a bactéria *L. lactis*, ficou demonstrado que a eficiência de secreção da proteína repórter Nuc era baixa (3 mg/L), devido a cargas positivas de seu próprio peptídeo sinal (LE LOIR et al., 1994) e que a fusão desta proteína ao propeptídeo sintético de nove aminoácidos, LEISSTCDA (LEISS) aumentava em cinco vezes a eficiência de secreção da mesma (15 mg/L) (LE LOIR et al., 1998). Sendo assim, a troca do peptídeo sinal de Nuc pelo da proteína Usp45 e a clonagem do propeptídeo LEISS na porção 5' de *nuc* em vetores de alto número de cópias sob controle do promotor P_{nisA} levaram a elevados níveis de secreção da proteína Nuc (25mg/L)

(LE LOIR et al., 2001). A proteína Usp45 é de grande valia em estudos com *L. lactis*, visto que é a única proteína secretada deste organismo em quantidades detectáveis em géis de proteína corados com Coomassie. Esta característica é uma das vantagens de se utilizar *L. lactis* como usina para a produção de proteínas heterólogas (VAN ASSELDONK et al., 1990). Para avaliar esse sistema como veículo vacinal, estes pesquisadores construíram linhagens de *L. lactis* que secretavam epítopos de coronavírus bovino (BCV). Ficou demonstrado que *L. lactis* podia secretar esta proteína antigênica fusionada a NUC (LANGELLA; LE LOIR, 1999).

Secreção de proteínas heterólogas em *L. lactis*

A secreção de proteínas usando BAL inócuas pode permitir amplas utilizações destes microrganismos para secretar várias proteínas

heterólogas, motivo pelo qual resolveu-se abordar com mais profundidade este tipo de localização celular no presente trabalho (WELLS et al., 1993). *L. lactis* vem se destacando como um bom candidato para a secreção de proteínas heterólogas, uma vez que as linhagens não secretam proteases e sua parede celular pode servir como uma barreira funcional para a difusão de algumas proteínas secretadas no meio (WELLS et al., 1993; LANGELLA; LE LOIR, 1999).

Diversos trabalhos mostram a utilização de *L. lactis* como veículo para secreção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico, farmacêutico, entre outros. Como exemplo, pode-se citar a expressão da protease neutra (Npr) de *Bacillus subtilis*, que é capaz de degradar caseínas. Sua utilização pode acelerar a maturação do queijo durante sua fabricação. O gene *npr* sem sua seqüência promotora foi clonado em um vetor de expressão sob o controle do promotor lactococcal P₃₂ (VAN DER GUCHTE et al., 1990). Essa construção permitiu a expressão e a secreção de Npr por *L. lactis*, demonstrando que ocorre o correto processamento da pré-Npr produzindo uma proteína biologicamente ativa. Um outro trabalho revelou a capacidade de *L. lactis* de secretar interleucina-2 (mIL-2) murina (STEIDLER et al., 1995). A seqüência codificadora de mIL-2 foi fusionada ao PS_{Usp45} sob o controle transcricional do promotor da RNA polimerase do fago T7. Os resultados concluíram que a mIL-2 recombinante secretada por *L. lactis* possuía a mesma atividade biológica específica da mIL-2 natural. Além disso, pode-se verificar que a mIL-2 secretada havia sido corretamente processada.

Mais recentemente, a subunidade VP8 da proteína do capsídeo de rotavírus pôde ser secretada por *L. lactis*. Gil e colaboradores (2001) desenvolveram um sistema cujo vetor de secreção possuía a seqüência sinal lactococcal AL9 e o fragmento do gene que codifica a VP8. Foram detectadas quantidades significativas da subunidade e sua atividade biológica foi preservada.

Proteínas repórteres ou genes repórteres também são grandes aliados dos pesquisadores

para estudos de expressão e secreção de proteínas heterólogas. Suas atividades permitem localizar as proteínas de interesse entre uma população heterogênea, que contém também proteínas citoplasmáticas. Em 1991, Sibakow e colaboradores utilizaram o gene da a-lactamase como repórter para isolar seqüências promotoras do cromossomo de *L. lactis*. Promotores que aumentavam a eficiência de expressão e secreção foram detectados com o uso deste gene repórter. Já em 1992, plasmídios sem seqüência sinal, carregando os genes repórteres a-amilase e b-lactamase, foram usados para selecionar elementos de exportação no DNA cromossomal de *L. lactis* que poderiam funcionar como seqüências sinal. Descobriu-se que os elementos de exportação AL9 e BL1 foram altamente eficientes no que diz respeito à expressão e secreção das duas proteínas heterólogas (a-amilase e b-lactamase) (PEREZ-MARTINEZ et al., 1992). Vários outros trabalhos também usaram genes repórteres em *L. lactis* para verificar a secreção de proteínas heterólogas, como o gene da b-glucuronidase, *nuc*, GFP ("green fluorescent protein") para verificar a eficiência dos promotores e dos sinais de endereçamento celular (PLATEEUW et al., 1994; LE LOIR et al., 1994; POQUET et al., 1998; GEOFFROY et al., 2000; PALENCIA et al., 2000; THOMPSON et al., 2001).

CONCLUSÕES

As práticas alimentares de numerosos grupos de indivíduos os conduzem a ingerir quantidades impressionantes de bactérias lácticas. Essas bactérias absorvidas vivas são capazes de exercer, na mucosa intestinal, atividades biológicas inerentes a elas. A demonstração de um efeito biológico no hospedeiro é difícil, devido ao fato de o nível basal dessas atividades ser muito baixo. Para remediar esse problema, várias pesquisas foram empreendidas superespressando certas atividades nestas bactérias, para demonstrar de maneira absoluta os seus efeitos nos hospedeiros.

Dentre estas, a *L. lactis* possui um arsenal de sistema de expressão e endereçamento celu-

lar capaz de produzir uma grande gama de proteínas heterólogas de interesse farmacêutico e industrial em localizações celulares diferentes, o que a transformou em um biorreator que poderá ser usado para fabricação de “produtos-saú-

de”, como vacinas, e para a produção de enzimas que suplementem deficiências pancreáticas ou vitamínicas, para melhorar a saúde do hospedeiro ou oferecer-lhe um melhor conforto intestinal.

Targeting and expression of heterologous protein in Lactococcus lactis

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive bacteria, generally regarded as safe (GRAS) organisms. LAB, widely used in the food industry, are present in the intestine of most animals, including human beings. Therefore, LAB could be used for heterologous protein expression and they are good potential candidates as antigen delivery vehicles. In this paper, several delivery systems are described, particularly those which are able to lead the heterologous protein to specific cell locations, such as cytoplasm, cell wall or extra cellular medium. Nevertheless, more emphasis is given to the LAB delivery systems which are able to secrete the antigens in those strains.

Keywords: *Lactic acid bacteria. Lactococcus lactis. Heterologous protein. Protein target. Protein secretion.*

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, M.; COLLINS, M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.95-107, 1993.

BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. **Genome Res.**, v.11, p.731-753, 2001.

BUCHMAN, G. W.; BANERJEE, S.; HANSEN, J. N. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.16260-16266, 1988.

CHAMBERLAIN, L. et al. Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*. In POZZI, G.; WELLS, J. M. (Ed.) **Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization**. Austin: Springer-Verlag and Landes Bioscience, 1997. p.83-106.

CHANDRAPATI, S.; O’SULLIVAN, D. Nisin independent induction of the *nisA* promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.170, p.191-198, 1999.

DE RUYTER, P. G.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W. M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.3662-3667, 1996.

DE VOS, W. M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, p.289-295, 1999.

DIEYE, Y. et al. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. **J. Bacteriol.**, v.183, p.4157-4166, 2001.

DOUGAN, G. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. **Microbiology**, v.140, p.215-224, 1994.

DROUAULT, S. et al. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4881-4886, 1999.

DROUAULT, S. et al. Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.3166-3168, 2002.

ENGELKE, G. et al. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.3730-3743, 1992.

FERREIRA, C. L. L. F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotecnologia**, v.16, p.22-25, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

GEOFFROY, M. C. et al. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.383-391, 2000.

- GIL, M. T. et al. Secretion of the rotavirus VP8 protein in *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.203, p.269-274, 2001.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.**, v.35, p.109-116, 2002.
- ISOLAURI, E. et al. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. **Vaccine**, v.13, p.310-312, 1995.
- KALETTA, C.; ENTIAN, K. D. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. **J. Bacteriol.**, v.171, p.1597-1601, 1989.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.49, p.209-224, 1983.
- KUIPERS, O. P. et al. Characterization of the nisin genecluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of *nisA* and *nisl* genes for development of immunity. **Eur. J. Biochem.**, v.216, p.281-291, 1993.
- KUIPERS, O. P. et al. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. **Tibtech.**, v.15, p.135-140, 1997.
- LANGELLA, P.; LE LOIR, Y. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.32, p.191-198, 1999.
- LE LOIR, Y. et al. Direct screening of recombinants in Gram-positive bacteria using the secreted Staphylococcal nuclease as a reporter. **J. Bacteriol.**, v.176, p.5135-5139, 1994.
- LE LOIR, Y. et al. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. **J. Bacteriol.**, v.180, p.1895-1903, 1998.
- LE LOIR, Y. et al. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p.4119-4127, 2001.
- MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.12, p.207-220, 1993.
- MERCENIER, A.; MULLER-ALOUF, H.; GRANGETTE, C. Lactic acid bacteria as live vaccines. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.2, p.17-25, 2000.
- NEUMANN, E. et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Braz. J. Biol. Res.**, v.31, p.1565-1573, 1998.
- O'SULLIVAN, M. G. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends Food Sci. Tech.**, v.3, p.309-314, 1992.
- PALENCIA, P. F. et al. Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.183, p.229-234, 2000.
- PEREZ-MARTINEZ, G. et al. Protein export elements from *Lactococcus lactis*. **Mol. Gen. Genet.**, v.234, p.401-411, 1992.
- PIARD, J. C. et al. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. **J. Bacteriol.**, v.179, p.3068-3072, 1997.
- PLATEEUW, C.; SIMONS, G.; DEVOS, V. M. Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analysing promoters in lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p.587-593, 1994.
- POQUET, I.; EHRlich, S. D.; GRUSS, A. An export-specific reporter designed for Gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. **J. Bacteriol.**, v.180, p.1904-1912, 1998.
- ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.1682-1687, 2000.
- ROBINSON, K. et al. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. **Nature Biotech.**, v.15, p.653-657, 1997.
- SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.; GORBACH, S. Lactic acid bacteria in health and disease. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria**, New York: Marcel Dekker, p.199-225, 1993.
- SHORTLE, D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. **Gene**, v.22, p.181-189, 1983.
- SIBAKOW, M. et al. Secretion of TEM beta-lactamase with signal sequences isolated from the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.341-348, 1991.
- SIEGERS, K.; ENTIAN, K. D. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1082-1089, 1995.
- SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiol. Rev.**, v.57, p.109-137, 1993.

- STACKEBRANDT, E.; TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, v.70, p.317-324, 1998.
- STEIDLER, L. et al. Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.1627-1629, 1995.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, v.36, p.1-29, 1997.
- THOMPSON, A.; GASSON, M. J. Location effects of a reporter gene on expression levels and on native protein synthesis in *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.3434-3439, 2001.
- TON-THAT, H. et al. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.96, p.12424-12429, 1999.
- VAN ASSELDONK, M. et al. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene*, v.95, p.155-160, 1990.
- VAN DER GUCHTE, M. et al. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.2606-2611, 1990.
- VAN DER MEER, J. R. et al. Characterization of the *Lactococcus lactis* Nisin A operon genes, *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in the precursor processing, and *nisR* encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, v.175, p.2578-2588, 1993.
- WELLS, J. M. et al. A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.3954-3959, 1993.