

Afslutningsrapport

Identifikation af transportsignaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af plasminogenfragmenter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-26

August 1999



mejeriforeningen

danish dairy board

Identifikation af transportsignaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af plasminogenfragmenter

Peter Ravn, José Arnau, Søren Madsen, Astrid Vrang og Hans Israelsen
Bioteknologisk Institut, Kogle Allé 2, 2970 Hørsholm
Tlf. 4516 0444, Fax 4516 0455.

RESUMÉ

I dette projekt er der udviklet et transposon Tn917 derivat, der indeholder et reporter gen til identifikation af transportsignaler i *Lactococcus lactis* og andre Gram-positive bakterier. Det anvendte reporter gen, *nuc*, koder for nucleasen fra *Staphylococcus aureus*, og det nye transposon derivat kaldes derfor TnNuc. Der er udviklet en protokol til screening af mere end 10^4 *L. lactis* integranter for TnNuc-integration, der giver anledning til udskillelse af nucleasen. Anvendelse af protokollen har ført til identifikation af mere end 100 nucleaseudskillende *L. lactis* TnNuc integranter, hvoraf ca. 30 blev udvalgt til karakterisering. Karakteriseringen resulterede i identifikation af såvel kendte som hidtil ukendte transportsignaler. To nye transportsignaler, kaldet signal307 og 310, blev udvalgt til yderligere karakterisering og anvendelse. På grundlag af studier i *Escherichia coli* og ved hjælp af computerprogrammet SignalP er Signal310s evne til at mediere udskillelse af nucleasen blevet forbedret med ca. 10% ved hjælp af site directed mutagenese. Med henblik på at få udskilt mejerirelevante enzymer fra *L. lactis* er der konstrueret en expressionsvektorserie med henholdsvis signal 307 og det optimerede signal 310. Gener, der koder for henholdsvis midi-plasminogen og plasminogen aktivator (SuPA) fra *Streptococcus uberis*, er blevet indsat i expressionsvektorserien, som efterfølgende er blevet introduceret i *L. lactis*. Præliminære resultater viser signal310 medierer SuPA-udskillelse i lactococcer. Undersøgelserne er endnu ikke afsluttet, men forventes færdiggjort i løbet af 1999 i regi af "Center for mælkesyrebakterier som produktionsorganismer i genteknologisk produktion".

ABSTRACT

A Tn917-derivative has been developed that includes a secretion reporter gene. This new element is suitable for the identification of secretion signals in *Lactococcus lactis* and other Gram-positive bacteria. The transposon derivative was designated TnNuc because it includes the *nuc*-gene encoding the *Staphylococcus aureus* nuclease. A procedure has been devised for screening of more than 10^4 colonies for TnNuc integrants showing nuclease secretion. More than 100 *L. lactis* integrants that showed nuclease secretion were identified. About 30 integrants were selected for molecular characterisation and both known and novel secretion signals were identified. Two novel signals, signal310 and signal 307, were selected for further characterisation and application studies. Additionally, the ability of signal 310 to mediate nuclease secretion was improved about 10% using site directed mutagenesis based on previous studies in *Escherichia coli* and the use of the computer program SignalP. To secrete dairy relevant enzymes from *L. lactis*, a series of expression vectors containing signal307 and the improved signal310 was constructed. Genes encoding midi-plasminogen and *Streptococcus uberis* plasminogen activator (SuPA) have been inserted into the

expression vectors and subsequently introduced into *L. lactis*. Preliminary results showed that SuPA was excreted from *L. lactis*. The analysis will be completed before the end of 1999 in the framework of "Centre for lactic acid bacteria as hosts in recombinant protein production".

FORMÅL OG MÅL

Projektets formål er at bidrage til opklaring af plasmin og plasmin-relaterede proteiners betydning for ostemodning. Målet er at konstruere et genetisk værktøj til identifikation af transportsignaler, der i *Lactococcus lactis* sikrer optimal udskillelse af katalytisk aktive plasminogenfragmenter.

BAGGRUND

I et tidligere FØTEK-projekt, "*Lactococcus lactis* med ændrede proteolytiske egenskaber", ved Bioteknologisk Institut blev det forsøgt at producere fragmenter af den naturlige mælkeprotease plasmin i *L. lactis*. Plasmins nedbrydning af kasein i ost er en af de vigtigste processer i ostemodning. Det lykkedes at producere plasmin intracellulært i små mængder, men produktionen viste sig at være skadelig for *L. lactis* formodentlig p.g.a. proteaseaktiviteten. Det lykkedes også at producere plasmin ekstracellulært ved at benytte en transportsignalsekvens fra genet *usp45*. Der var dog stadig en toksisk effekt på *L. lactis*, formodentlig fordi udskillelsen fra *usp45*-signalsekvensen ikke er tilstrækkelig effektiv. Der var derfor interesse for at finde nye transportsignalsekvenser, der effektivt medierer udskillelsen af plasmin.

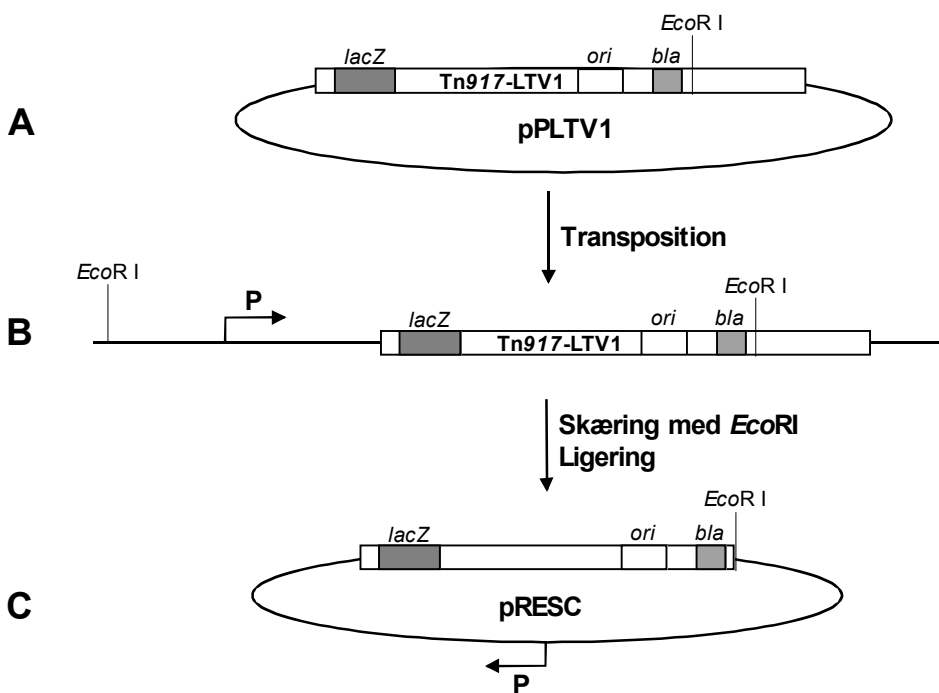
Ønsket om at udskille proteiner er ikke begrænset til plasmin. Ved produktion af rekombinante proteiner vil den efterfølgende oprensning være væsentlig lettere, hvis proteinet udskilles fra produktionsorganismen, idet der i fermenteringssubstratet ikke findes nær så mange kontaminerende makromolekyler, som der findes intracellulært. *L. lactis* er velegnet til produktion af rekombinante enzymer til f.eks. mejeribrug og til den øvrige fødevarerindustri p.g.a. bakteriens status som sikker mikroorganisme. Udskillelse af proteiner kan være vigtig, selvom det udskilte protein ikke skal oprenses. Det kan være i forbindelse med produktion af andre proteiner som f.eks. chymosin, som kræver, at enzymet kommer i kontakt med mælkeproteinerne.

Der kan også opstå et behov for at fremstille functional foods, hvor et protein skal ud af cellen for at have effekt i fødevarer eller for at kunne blive optaget i den humane mave-tarmkanal.

Tidligere er der på Bioteknologisk Institut i projektet, "Genetisk forbedrede mælkesyre bakterier til brug i starterkulturer", blevet anvendt screeningsværktøjer til identifikation af regulerbare promotorer. Disse værktøjer er i det her beskrevne projekt blevet yderligere karakteriseret og modificeret således, at de kan anvendes til identifikation af transportsignaler.

FORUDSÆTNINGER

Transpositionsvektoren pLTV1 indeholder et transposon, Tn917-LTV1 (Fig. 1), som er istand til at sætte sig ind (transposere) på *L. lactis*' kromosom. Hvis Tn917-LTV1 sætter sig ind nedstrøms for en aktiv promotor, vil promotoren styre transkriptionen af et *lacZ*-gen, der er placeret i Tn917-LTV1s ene ende, ved den såkaldte left repeat (LR). Den resulterende fusion kaldes en transkriptionel fusion. Da *lacZ*-genproduktet kan påvises ved vækst på indikative plader, kan kloner med transkriptionelle fusioner identificeres. I Tn917-LTV1 er der desuden indsat hjælpemidler til at isolere DNA, der indeholder den opstrøms lokaliserede promotor. Princippet i identifikation og isolering af promototer med Tn917-LTV1 er vist i Figur 1. En detaljeret beskrivelse af systemet og dets anvendelse i lactococcer er givet i Israelsen og Hansen 1993, Appl Environ Microbiol. 59:21-26.



Figur 1.

Princippet i screening efter promotorer med pLTV1. A) Plasmidet pLTV1 introduceres i *L. lactis*. Her transposerer Tn917-LTV1 til bakteriens kromosom. Hvis Tn917-LTV1 som vist i B) sidder nedstrøms for en promotor P, bliver *lacZ* aflæst. Det producerede LacZ kan påvises på x-gal-plader. DNA ved det integrerede Tn917-LTV1 kan herefter isoleres ved plasmidrescue. Kromosomalt DNA skæres med *EcoRI* og liggeres sammen til plasmider, der kan opretholdes i *E. coli* vha. det viste plasmidorigin og antibiotikaresistens (*bla*). Herved fås pRESC-plasmidet, der er vist i C). Dette plasmid kan herefter opformeres og analyseres .

En primær forudsætning for det her beskrevne projekt var, at Tn917-LTV1 kunne modificeres, således at der ved transpositioner kunne opnås translationelle fusioner mellem gener på kromosomet i *L. lactis* og et sekretions-reportergen i transposon. Det vil sige, at der ved translation dannes et sammenhængende protein bestående af en del af det kromosomale genprodukt og reportergenet.

En kort videnskabelig beskrivelse af projektets resultater er givet i de to papers, der er under udarbejdelse, samt i en patentansøgning, der ligeledes er under udarbejdelse.

Patentansøgningen forventes indleveret den 01.06.1999, hvorefter det første paper forventes indsendt til enten Gene eller Molecular Microbiology. Nærværende rapport beskriver derimod den kronologiske udvikling i projektet, og giver dermed et indblik i både positive og negative resultater fra projektets forsøg. Som ønsket af MFF's Styregruppe for Mikrobiologi, videregives herved et erfaringsgrundlag, som forhåbentlig kan komme andre til gode på et senere tidspunkt.

DETALJERET RESULTATBESKRIVELSE

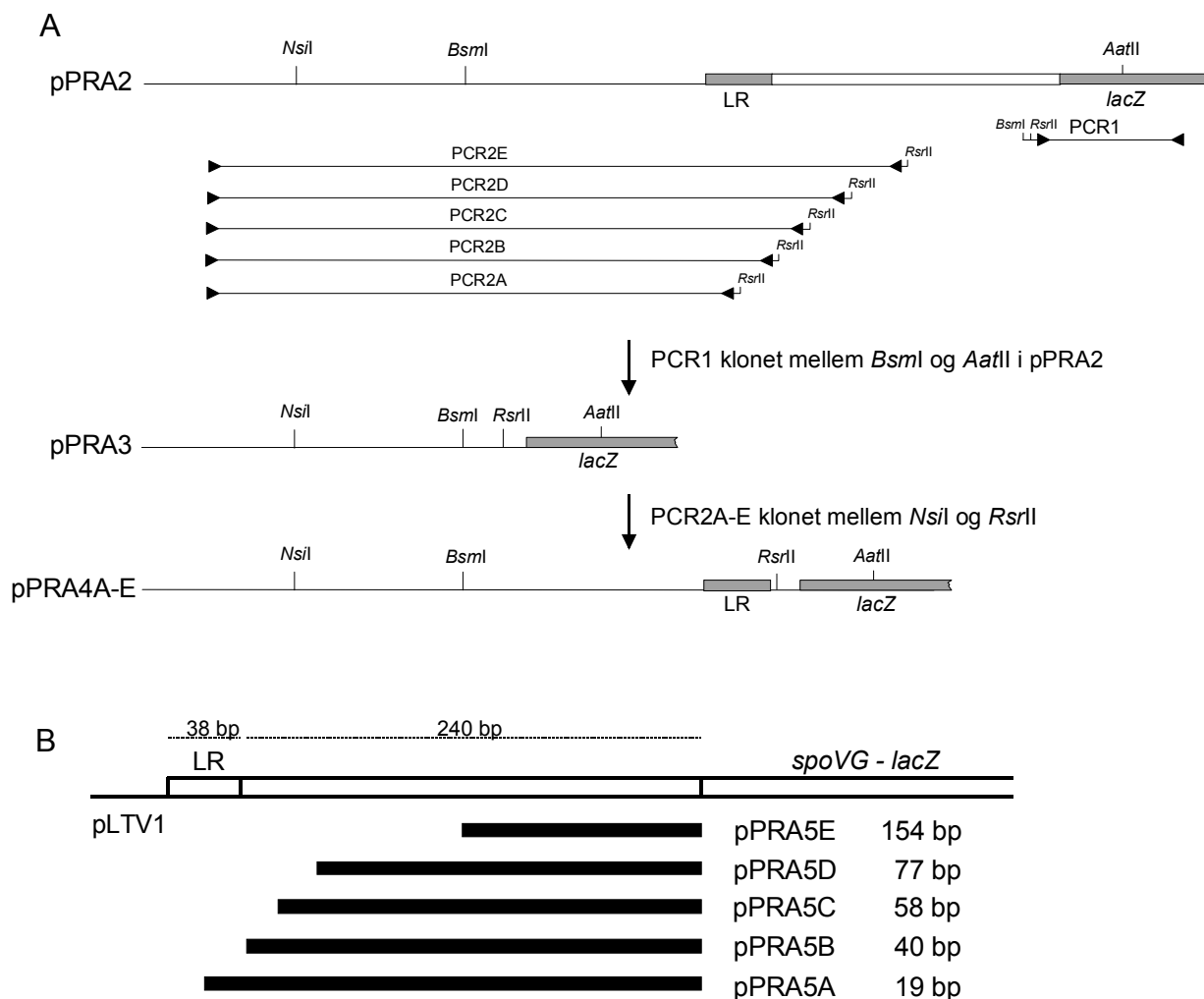
Undersøgelse af om transposonvektoren pLTV1 kan ændres til et identifikationsværktøj for signalsekvenser

Udskillelse af proteiner bliver normalt styret af proteinfragmenter, såkaldte signalpeptider, der er lokaliseret N-terminalt i proteinet, og som kløves fra proteinet under udskillelsen. Ved at placere et gen for et reporterprotein til sekretion nær ved Tn917-LTV1s ene ende, i dette tilfælde LR, kan man opnå, at Tn917-LTV1-derivatet kan transposere ind i et gen, der har en signalsekvens. Herved bliver signalsekvens og reporterprotein fusioneret og reporterprotein-fusionen udskilt.

For at signal og reporter skal kunne hænge sammen, må der ikke findes stopcodons mellem enden af Tn917-LTV1-derivatet og reporter-genet. Stopcodons terminerer translationen af et mRNA. I Tn917-LTV1 findes flere stopcodons mellem transposonets ende og det indsatte *lacZ*-gen. Afstanden mellem LR og *lacZ* er ca. 300 bp.

Ved hjælp af site-directed mutagenese blev der fremstillet 5 forskellige deletionsmutanter af pLTV1, hvor forskellige strækninger af DNA mellem LR og *lacZ* var deleteret. Derved kunne det undersøges, hvorvidt DNA i disse områder er essentielle for Tn917-LTV1s evne til at transposere. Ved at deletere DNA i denne region deleteres også stopcodons. Strategien for fremstilling af de 5 forskellige mutanter af Tn917-LTV1 og udstrækningen af deletionerne er vist i Figur 2. Disse mutanter kaldes pPRA5A, pPRA5B, pPRA5C, pPRA5D og pPRA5E.

Konstruktionerne pPRA5A-5E blev testet m.h.t. om transposonet stadig fungerede. Det vil sige om de var i stand til at transposere ind i tilfældige områder af det kromosomale DNA. LR indeholder en struktur på 38 bp, som kan være essentiel for Tn917-LTV1s funktion. Også længere inde i Tn917-LTV1 kan der være DNA, der er essentiel for Tn917-LTV1s evne til at transposere. I pPRA5A, er et stykke på ialt 259 bp deleteret og således er kun de yderste 19 bp i LR bevaret frem til *lacZ*-genet. I pPRA5B er de yderste 40 bp bevaret, således at hele LR er intakt, mens deletionen i den anden retning strækker sig lige så langt som pPRA5A. Alle 5 konstruktioner blev introduceret i *L. lactis* og sammenlignet med pLTV1. Ved introduktion af pLTV1 i *L. lactis* vil Tn917-LTV1 i ca. 2-3% af cellerne transposere og give stabile erythromycin-resistente kloner. Ca. 10 % af disse vil blive blå på x-gal-plader som tegn på at *lacZ* nu sidder nedstrøms for en kromosomal promotor. De blå kolonier har forskellig farveintensitet, fordi Tn917-LTV1 integrerer i forskellige gener, som er styret af promotorer af forskellig styrke. PRA5B, PRA5C og PRA5D opførte sig på samme måde som Tn917-LTV1. Resultatet indikerer, at de deleterede DNA-regioner ikke er essentielle for transposonets funktion. PRA5A og PRA5E var ikke i stand til at transposere. PRA5B er det funktionelle transposon, hvorfra der er deleteret mest Tn917-LTV1-DNA. I PRA5B er alle problematiske stopcodons deleteret. Således kan pPRA5B anvendes som basis for konstruktion af et identifikationsværktøj for signalsekvenser i lactococcer.



Figur 2.

Strategien ved konstruktion af deletioner i pLTV1 og udstræningen af de opnåede deletioner.

A) Det relevante område fra pLTV1 blev først klonet. Herved blev pPRA2 dannet. De viste PCR-produkter blev lavet med pPRA2 som template. PCR1 blev første klonet i pPRA2. Herved blev pPRA3 dannet. Herefter blev hhv. PCR2A, PCR2B, PCR2C, PCR2D og PCR2E klonet i pPRA3 og plasmiderne pPRA4A-E blev dannet. Hele regionen fra disse plasmider blev flyttet tilbage i pLTV1. Derved blev pPRA5A-E dannet. Et introduceret *RsrII*-site blev anvendt til kloning af reportergener.

B) Området omkring LR og *lacZ* er vist. De deleterede DNA-regioner i de konstruerede mutanter er markeret med sorte blokke. Tallene angiver, hvor langt der er fra starten af LR til deletionens begyndelse.

Identifikation af et velegnet sekretionsreportergen

Flere forskellige gener blev taget i betragtning som mulige reportergener for sekretion. Genet *phoA* fra *E. coli* har været brugt i flere organismer. Dette gen koder for en alkalisk phosphatase, som først bliver aktiv, når den udskilles. Der er to problemer knyttet til *phoA*s anvendelse. Dels kunne de *L. lactis*-stammer, som vi ville anvende, være i besiddelse af en interfererende phosphatase-aktivitet, dels var der risiko for at *E. coli* PhoA ikke er funktionel i *L. lactis*.

AmyS fra *Bacillus stearothermophilus* koder for en amylase, der tidligere har været anvendt til identifikation af signalsekvenser fra *L. lactis*. Amylasen kan nedbryde stivelse i

vækstsubstratet således at der dannes klaringszoner. Der skal imidlertid farves med iodid for at tydeliggøre zonerne. Behandlingen dræber bakterierne og dermed de potentielt interessante kloner. Derfor kræver anvendelse af *AmyS*, at der udføres en replikation af testpladerne, hvilket vil være tidskrævende.

Iøvrigt blev der overvejet anvendelse af forskellige proteaser, der kan nedbryde skummetmælk i plader og dermed give klaringszoner. Konklusionen var, at den type assays ikke er tilstrækkeligt følsomme.

Nucleasen SNase fra *Staphylococcus aureus* var ved projektets start vist at være aktiv, når den blev produceret i *L. lactis* og var derfor blevet foreslået som reporter-gen for sekretion. Der eksisterede et pladescreeningsassay, hvor kolonier overhældes med et tyndt lag agar indeholdende DNA og farvestoffet Toluidine Blue O (TB-O). TB-O binder til DNA og antager under de rette betingelser en blå farve, mens farvestoffet er rødt, når det ikke binder til DNA. Hvis celler i en koloni udskiller SNase, nedbrydes DNA omkring kolonien, og derved dannes en rødlig zone på en blå baggrund.

For at teste SNasens anvendelse som sekretionsreporter blev der konstrueret fire forskellige plasmider, hvor *nucB* blev indsat nedstrøms for promotorer af varierende styrke. Genet *nucB* koder for SNase uden det naturlige signalpeptid. I stedet for det naturlige signalpeptid blev signalsekvensen for *usp45* indsat i tre konstruktioner. En oversigt over konstruktionerne ses i Tabel 1.

Plasmid	Styrke af promotor	<i>usp45</i> -signalsekvens	Zonedannelse
pAMJ638	Svag	Ja	Ja
pAMJ626	middel	Ja	Ja
pAMJ627	stærk	Ja	Ja
pAMJ625	stærk	Nej	Nej

Tabel 1

Konstruktionerne blev introduceret i *L. lactis*, og transformanterne blev herefter anvendt til forsøg med assay til pladescreening. Forsøget viste tydelige zoner i alle stammer, hvor konstruktionen indeholdt *usp45*-signalsekvensen. I konstruktionen uden signalsekvens sås ingen zone. Stammen med konstruktionen uden signalsekvens udviste ikke væksthæmning eller reduceret overlevelse. Dette er et tegn på at intracellulær SNase ikke er aktiv.

Ved hjælp af transformanterne var vi istand til at optimere pladescreeningsassayet yderligere. Forsøg viste desuden, at bakterierne var levedygtige selv efter 6 timer inkubation ved 37°C med DNA/TB-O agar. Tydelige zoner havde typisk udviklet sig efter 1 time.

Iøvrigt er der lavet omfattende proteinkemiske studier af SNase. Disse studier indikerede, at SNase også ville fungere i fusion med et andet udskilt protein. Konklusionen blev, at SNase er et velegnede reporterprotein til studier af sekretion i lactococcer.

Konstruktion af signalsekvensscreeningsværktøjet TnNuc

Plasmidet pPRA5B med transposonet PRA5B fik samtidig med deletionen introduceret et unikt restriktionssite, *RsrII*. Genet for SNase uden sit naturlige transportsignal, *nucB*, blev indsat i *RsrII*-sitet. Derved blev pTnNuc, indeholdende transposonet TnNuc dannet. TnNuc blev herefter testet på samme måde som konstruktionerne pPRA5A-E for at kontrollere, at TnNuc stadig transposerede med en frekvens på 2-3% og dannede blå kolonier på indikative plader med en frekvens på ca. 10%. Da dette viste sig at være tilfældet, blev 50 kloner udvalgt og analyseret ved Pulsed Field Gel Elektroforese (PFGE). Ved PFGE er det muligt at bestemme, hvor på kromosomet, TnNuc er integreret. En sammenligning mellem TnNuc og Tn917-LTV1 viste, at fordelingen af transposeringer til kromosomet var overensstemmende.

Identifikation og isolering af transportsignaler

pTnNuc blev anvendt til at transformere *L. lactis* MG1614. Kolonier blev replikeret fra SGM17-plader med erythromycin til GM17-plader med erythromycin og x-gal. Efter et døgn blev der replikeret til et nyt sæt GM17-plader med erythromycin og x-gal. Ved tilstedeværelse af erythromycin fungerer plasmidet pTnNuc relativt dårligt i *L. lactis*, hvilket favoriserer TnNuc transposition til kromosomet. På det tredje sæt replikaplader har de overlevende kolonier mistet plasmidet samtidig med, at TnNuc er indsat i kromosomet.

For at få udskilt SNase kræves både en promotor og en signalsekvens opstrøms for det integrede TnNuc. Desuden skal TnNuc sidde i den rigtige orientering og den rigtige læseramme i forhold til signalsekvensen.

Til den første runde screeninger blev det udnyttet, at *lacZ* stadig sidder nedenstrøms for *nucB* i TnNuc. Hvis en promotor er lokaliseret opstrøms for TnNuc, vil der blive produceret LacZ, og kolonien vil blive blå på x-gal-plader. På den måde kunne ca. 10% af klonerne, hvor TnNuc sidder nedenstrøms en aktiv promotor udvælges og undersøges for udskillelse af SNase. Dette blev gjort ved at udprikke dem på plader og anvende DNA/TB-O pladeassayet. Under anvendelse af denne metode blev der produceret ca. 75.000 transformererede MG1614 kloner, hvoraf ca. 1500 var TnNuc integranter. 147 af disse blev blå på 3. sæt replika-plader med x-gal. Ved DNA/TB-O assay kom der nogle svage zoner omkring 11 kloner.

I den første screeningsrunde viste det sig, at replikering af plader var mindre velegnet til at screene et stort antal kloner, og at selve replikaplatingen desuden var meget tidskrævende. Desuden havde det vist sig, at DNA/TB-O pladescreeningsassayet var velfungerende, således at den første selektion af kloner på x-gal plader kunne undlades. Der blev derfor udviklet en ny screeningsmetode. Et stort antal MG1614 celler blev transformeret og udpladet på ekstra tykke plader, hvor de blev dyrket i fire døgn. Herefter blev kolonierne poollet i kold GM17 og frosset ned til senere screening.

Ved den efterfølgende screening blev cellerne udpladet således, at der var 500 cfu pr. plade. Kolonierne blev herefter assayet med DNA/TB-O agar. På denne måde blev der produceret ca. 500.000 pTnNuc-transformerede celler, der resulterede i ca. 10.000 uafhængige TnNuc-integranter. Screeningen af disse kloner med DNA/TB-O agar førte til, at der blev isoleret 108 kloner med zonedannelse. Samtlige 108 kloner blev herefter udstrøget på GM17 plader med x-gal for at få et estimat på styrken af den promotor, der styrede ekspressionen af *lacZ* og det foranliggende *nucB*. Ved at sammenholde zonestørrelse i DNA/TB-O pladescreeningsassayet med promotorstyrken blev det muligt at identificere de kloner, hvor

en stor del af den producerede nuclease blev udskilt, og hvor *TnNuc* formodes at være integreret ved en effektiv signalsekvens. På denne måde blev 20 af de 108 kloner udvalgt til videre analyse.

TnNuc er konstrueret således, at DNA ved integrationsstedet kan isoleres til videre analyse. Princippet i denne procedure, plasmid-rescue, er illustreret i Figur 1.

Plasmid-rescue blev udført på samtlige kloner fra første screeningsrunde samt 18 udvalgte kloner fra anden screeningsrunde, ialt 29 kloner. DNA fra klonerne blev sekventeret og analyseret m.h.t. følgende:

- Sidder *TnNuc* i samme gen i flere forskellige kloner?
- Sammenligning med offentliggjorte sekvenser i databaser
- Sammenligning på proteinniveau med offentliggjorte proteinsekvenser
- Er der den forventede fusion mellem et protein og SNase?
- Kan programmet SignalP udpege et signalpeptid i det opstrøms beliggende gen?
- Manuel analyse for at forklare udskillelsen af SNase.

Resultatet af denne analyse viste, at *TnNuc*-integrationen var sket i genet *cluA* i tre af de isolerede kloner, klon 13, klon 36 og klon 94. Genet *cluA*, som er beskrevet i litteraturen, indeholder en signalsekvens.

Klon 10 var en integration i genet *sb*, der tidligere har været studeret af vores gruppe (ikke publiceret). SignalP-analysen af *sb* viste, at genet indeholdt en mulig signalsekvens, hvilket ikke tidligere var blevet erkendt.

En lang række kloner, der alle udskiller meget SNase, viste sig at være integrationer i et ikke tidligere beskrevet gen. Klonerne var #210, #220, #226, #305, #310, #312, #315, #316 og #318. SignalP-analysen viste, at genet sandsynligvis indeholder en effektiv signalsekvens. Sekretionssignalet fra dette gen blev herefter kaldt signal310.

I en enkelt klon, # 307, er *TnNuc* integreret i et gen, hvor der kunne identificeres en tydelig lipoprotein signalsekvens. En sådan signalsekvens styrer, at der kovalent bindes lipid til proteinet under udskillelsen. Herved bindes proteinet via sin N-terminal til cellens overflade. Integrationen af *TnNuc* i klon 307 var imidlertid ikke sket i den rigtige læseramme i forhold til dette gen. Det betyder, at der ikke burde dannes et fusionsprotein mellem signalpeptidet og SNase. Der kan opstilles for at forklarer observationen, hvilket dog ikke vil blive diskuteret her. Genet, som integrationen er sket i, er ikke tidligere beskrevet. Det har dog homologi til genet, der koder for en udskilt hyaluronate synthase fra *Streptococcus equisimilis*. Signalet fra *L. lactis* kaldes herefter signal307.

I klon 323 er *TnNuc* integreret i et gen, der formodentlig koder for et membranprotein, vurderet udfra homologi med gener fra andre organismer. Proteinets indeholder tilsyneladende både intracellulære og ekstracellulære domæner. Integrationen af *TnNuc* betyder, at SNase sandsynligvis danner en fusion med dette protein, således at SNase er lokaliseret på cellens yderside.

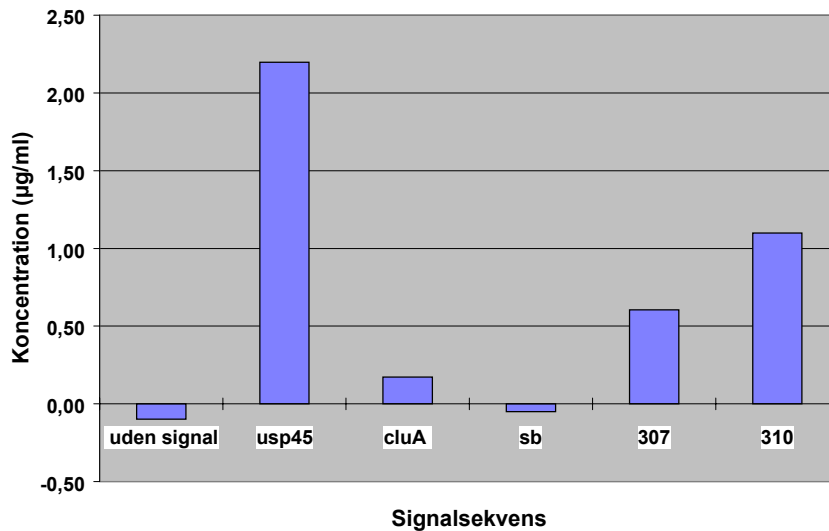
For en række *TnNuc* integranterne var det vanskeligt at forklare udskillelsen af SNase. Nogle integrationer var sket i kodende sekvens for proteiner, der med stor sandsynlighed kan forventes at være intracellulære. I andre tilfælde var integrationen sket i i kodende sekvens

for proteiner med ukendt funktion og lokalisering, men hvor der ikke kunne erkendes nogle sekvenser, der ligner signalsekvenser. I en række af tilfældene var integrationen sket i den forkerte læseramme eller orientering. Denne type integranter blev ikke analyseret yderligere.

Karakterisering af udvalgte transportsignaler

En række af de mest lovende signalsekvenser blev udvalgt til videre analyse. Det drejer sig om signaler fra *cluA* og *sb* samt om signal310 og signal307. Signalerne blev klonet opstrøms for *nucB* i plasmidet pAMJ625. Længere opstrøms for *nucB* er der indsat et derivat af promotoren P170. Ved hjælp af PCR blev der fremstillet DNA-fragmenter, der koder for de første 60 aminosyrer fra signalet fra henholdsvis *sb*, signal310 og signal307. Der blev anvendt et fragment af denne længde, fordi de første 60 aminosyrer med stor sandsynlighed indeholder hele signalpeptidet og dermed også kløvningssite. Indledende forsøg med *cluA* tydede på, at et fragment, der kun dækkede selve signalpeptidet, ikke var istand til at give udskillelse. I de analyserede Tn*Nuc*-kloner var fusion sket således, at et længere stykke af *cluA* gav udskillelsen af SNase. I *cluA*'s tilfælde blev det derfor besluttet at anvende et DNA fragment, der svarer til det fragment, der giver udskillelse i klon 13. Klon 13 er den klon, hvor Tn*Nuc* integrationen er sket nærmest starten af *cluA*. Dette fragment er ca. 1200 bp. De fire konstruktioner blev introduceret i *L. lactis* MG1363. Stammerne blev udstrøget på plader, og DNA/TB-O assayet blev anvendt til at vurdere udskillelsen af SNase. Som SNase-udskillende kontrol blev et tilsvarende plasmid benyttet, hvor den kendte signalsekvens fra *usp45* er anvendt, og som negativ kontrol blev benyttet pAMJ625 uden indsat signalsekvens. Der blev dannet store zoner omkring kolonier, hvor stammerne indeholdt konstruktioner med *cluA*-signal, signal310, signal307 og *usp45*-signal. Konstruktionen med *sb*-signal og pAMJ625 gav ikke anledning til zoner omkring kolonierne. Forsøget viste, at *cluA*-signal, signal310 og signal307 fungerer som transportsignaler. Zoner dannet omkring Tn*Nuc* integranter kan derimod også fremkomme ved, at ødelæggelse af et eller flere gener fører til forøget lysis af cellerne. Forsøget tyder også på, at *sb* ikke indeholder et transportsignal.

DNA/TB-O pladeassayet gav ingen information om den relative styrke mellem de forskellige signalsekvenser. Der blev derfor udført et kvantitativt assay på flydende GM17-medie fra overnatskulturer af stammerne. Resultatet af dette ses i Figur 3.



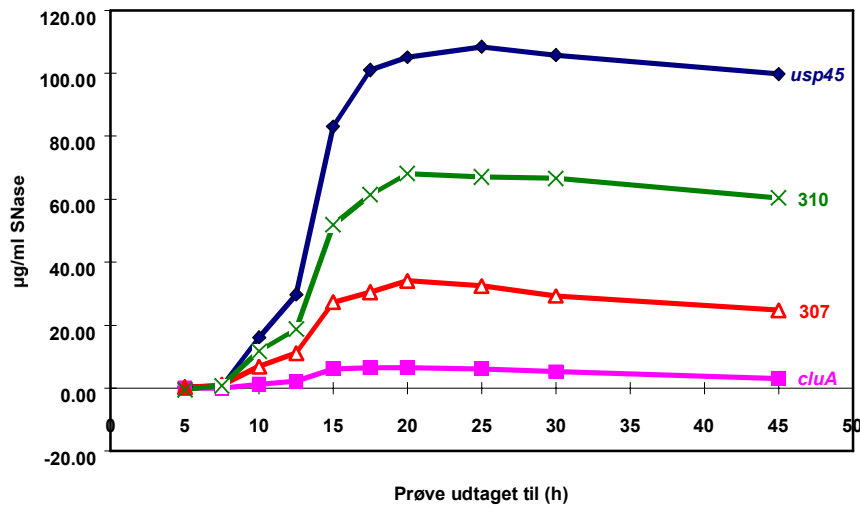
Figur 3.

SNase udskilt til mediet fra kulturer dyrket overnat. Lactococ-stammerne, med de forskellige signalsekvenser angivet under søjlerne, blev dyrket overnat i GM17-medie. Celler blev centrifugeret fra og SNase i supernatanten blev bestemt.

Det ses, at ingen af de fundne signalsekvenser fungerer så effektivt som *usp45*-signal. Af de isolerede signaler fungerer Signal310 bedst. Forsøget bekræfter desuden, at *sb*-signalet ikke fungerer.

Det er overraskende, at signal307 giver en relativt stor mængde SNase i mediet. Signal307 forventes, som nævnt, at være en lipoproteinsignalsekvens, hvilket betyder, at den udskilte SNase kan forventes at være bundet til celleoverfladen. I disse forsøg er cellerne fjernet fra vækstmediet, før SNasemængden er bestemt. Det må derfor også forventes, at en del af den udskilte (men overfladebundne) SNase er fjernet. Det er altså muligt, at der blev udskilt mere SNase. Dette blev analyseret i et senere forsøg, se nedenfor.

Der blev udført en række fermenteringer med henblik på at undersøge signalernes relative effektivitet under vækstbetingelser, hvor ekspressionen er optimeret. Samtidig blev der fremskaffet tilstrækkelige mængder SNase til en N-terminal analyse. Fermenteringerne blev foretaget i et syntetisk vækstmedium. Stammerne med *cluA*-signal, signal307 og signal310 blev sammenlignet med kontrolstammen med *usp45* signalet. Prøver blev udtaget til forskellige tidspunkter, og SNase-mængden blev bestemt. Resultatet ses i Figur 4. Det ses, at forsøget bekræfter resultat fra flydende GM17-medium. Dog ses under disse betingelser en svagt forbedret udskillelse fra signal310 i forhold til overnatkulturene i GM17-medium.



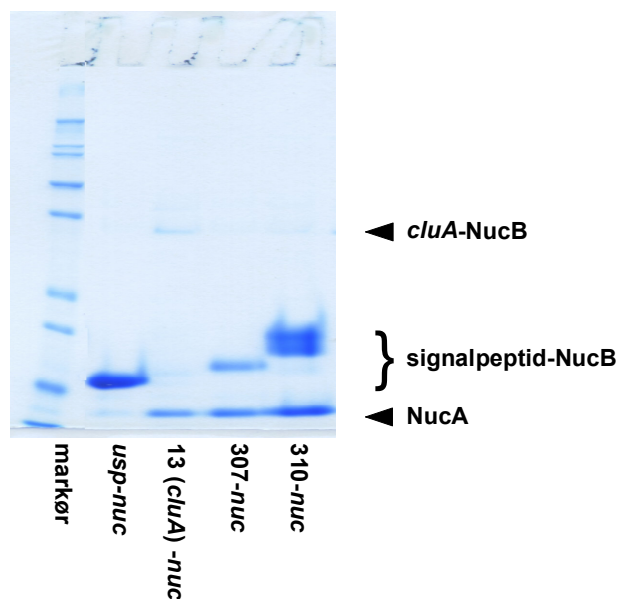
Figur 4.

Fermenteringsforsøg i syntetisk vækstmedium. De anvendte signalsekvenser er angivet for enden af kurverne. Stammerne blev dyrket under betingelser, hvor ekspressionen er optimeret. Prøver blev udtaget på markerede tider, og SNasemængden blev bestemt. Væksthastighed og opnået celletæthed var ens for de viste stammer.

Tilstedeværelsen af overfladebundet SNase blev også analyseret. En større andel af SNasen sad bundet på overfladen af cellerne, når signal307 eller signal310 blev benyttet i forhold til, når *usp45*-signal blev benyttet. At der ikke blev konstateret en forskel mellem signal307 og signal 310 kan skyldes, at NucB har evnen til at kløve en N-terminal sekvens fra, hvorved den katalytisk aktive NucA dannes og frigøres. Derfor skal fusioner med NucA anvendes til analyse af vedhæftning af udskilte proteiner på overfladen af lactococcer.

Proteinerne i fermenteringsmediet fra disse kulturer blev herefter koncentreret, og der blev kørt en SDS-PAGE af proteinerne, Figur 5. Udskilt SNase danner tydelige bånd. Disse bånd har forskellig mobilitet afhængig af, hvilket signal SNasen er fusioneret med. Det skyldes en N-terminal rest fra det protein, som signalsekvensen naturligt er koblet til.

Protein fra SDS-geler blev blottet over på PVDF-membraner og SNase-båndene blev skåret ud og anvendt til N-terminal proteinsekventering. Herved blev det muligt at bestemme, i hvilken position de pågældende signalpeptider spaltes fra under udskillelsen.



Figur 5.

SDS-PAGE af udskilte proteiner. Der er anvendt prøver fra fermenteringerne fra Figur 4. SNase er det altdominerende protein i mediet. Spaltningens produkt NucA ses i alle lanes. Den formodede CluA-NucB-fusion er markeret. De tre andre signalpeptid-NucB-fusioner har som forventet forskellig mobilitet afhængigt af, om signalsekvensen er fra *usp45*, fra signal307 eller fra signal310.

I de fleste bakterier, hvor man har studeret udskillelse af SNase, har det vist sig, at NucB-formen delvist spaltes til en NucA-form, der er 19-21 aminosyrer kortere end NucB-formen. Denne spaltning forårsages formodentlig af en overfladeprotease, der findes i de fleste bakterier. I Figur 5 ses det, at der i alle lanes er et bånd, der vandrer hurtigere end de andre bånd. N-terminal sekventering på protein fra dette bånd viser, at spaltning af Nuc B til NucA også finder sted i *L. lactis*. NucA er i *L. lactis* 21 aminosyrer kortere end NucB-formen. Andre SNase-bånd på gelen hidrører fra NucB-formen fusioneret til den del af signalsekvensen, der ikke er kløvet fra under udskillelsen. Da denne signalpeptidrest har forskellig størrelse i de forskellige signalpeptider, vandrer signal-NucB fusionen også forskelligt afhængigt af det benyttede signalpeptid.

For *cluA*-signals vedkommende indeholdt den benyttede fusion ca. 400 aa af starten fra *cluA*. Derved bliver den konstruerede fusion betydeligt større end de andre signal-NucB fusioner. Der ses et svagt bånd, der vandrer langsommere end andre SNase-bånd, i den pågældende lane. Da dette bånd indeholder for lidt protein til N-terminal sekventering, er det ikke afgjort, om dette bånd er den forventede CluA-NucB fusion. Programmet SignalP forudsiger, at *cluA*-signalet bliver spaltet indenfor de første 50 aminosyrer, hvilket indikerer, at det svage bånd er den forventede CluA-NucB-fusion.

Resultatet af N-terminal analysen viste, at signal307 bliver spaltet mellem aminosyre 22 og 23. Cystein i position 23 bliver samtidig modificeret ved kovalent binding af en lipidgruppe. Herved vil de resterende 37 aminosyrer af signal307 (der er, som nævnt, anvendt en fusion med 60 codons fra genet) og den fusionerede NucB blive bundet til overfladen. N-terminal sekventering af båndet med den højeste molekylvægt i denne lane viser, at der også kan ske en spaltning mellem aminosyre 48 og 49 i signal307. Analyse af signalpeptidet med SignalP viser, at dette område ikke ligner et normalt signalpeptidspaltningssite. Det er derfor muligt,

at denne spaltning ikke sker under selve udskillelsen, men når signal307-NucB fusionen sidder bundet på celleoverfladen.

SignalP analyse af signal310 viser, at sekvensen med stor sandsynlighed er en transportsignalsekvens, men viser også, at der er flere potentielle spaltningssites. Det mest sandsynlige spaltningssite er mellem aminosyre 34 og 35. Det ses, at signal310-NucB fusionen danner et dobbeltbånd på SDS-gelen. Dette kan forklares ved, at der sker spaltning i to sites. Der blev forsøgt N-terminal sekventering på de to bånd enkeltvis, men begge bånd gav samme N-terminale sekvens, der viste, at spaltningen hovedsageligt er foregået mellem aminosyre 34 og 35. Det er imidlertid stadig en mulighed, at de to bånd ikke har været skilt tilstrækkeligt godt før N-terminal sekventering, og at en del af spaltningen sker i et alternativt site.

Enginering på det effektive transportsignal signal310

Andre forskningsgrupper har vist, at det er muligt at ændre på naturlige signalsekvenser, således at de fungerer mere effektivt. Det var fra starten ønsket at finde en signalsekvens, der var mindst ligeså effektiv som *usp45*-signal. På trods af at signal310 er et effektivt signalpeptid, er det kun lykkedes at få udskilt 63% af den mængde, som det i fermenteringer havde været muligt at udskille med *usp45*-signal. Dette tyder på, at det vil være muligt at forbedre signal310, således at den bliver mere effektiv.

Flere af vores forsøg viste, at signal310 ikke er optimalt omkring spaltningssitet. Ved hjælp af SignalP programmet blev det beregnet, at en række ændringer formodentlig ville kunne forbedre spaltningen. Omfattende arbejde af andre grupper med *E. coli* viser, at et signalpeptid kan blive betydeligt bedre, hvis den hydrofobe kerne af signalpeptidet gøres mere hydrofob.

Endelig viser andres forsøg med *Bacillus brevis*, at også ændringer i signalpeptidets N-terminale del kan føre til et forbedret signalpeptid. Denne del af signalpeptidet indeholder hovedsageligt basiske aminosyrer. Forsøgene i *B. brevis* viste, at det kunne føre til forbedring, hvis denne del af signalpeptidet blev gjort endnu mere basisk.

Der blev designet 21 konstruktioner med mutationer i signal310, hvorunder det blev forsøgt at forbedre signalsekvensen i såvel N-terminal, den hydrofobe kerne og ved spaltningssitet. Signalpeptidet i konstruktionerne er vist i Figur 6.

Mutanterne blev fremstillet vha. site-directed mutagenese. Herefter blev de indsat foran *nucB* i pAMJ206 og introduceret i *L. lactis* MG1363. Stammerne blev dyrket natten over i flydende GM17, og mængden af SNase i mediet blev bestemt. Resultatet ses i Figur 7.

```

310mut0: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDNQTNAAERS
310mut1: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDNQANAAERS
310mut2: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--AAERS
310mut3: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTI--IP-NTAQAAERS
310mut4: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTI--IQ-NQTNAAERS
310mut5: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTI--IQ-NQANAAERS
310mut6: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--ADTRS
310mutA: MKFNKKRVAIALLFIALIFVLFLLISSIQDNQTNAAERS
310mutB: MKFNKKRVLILLFILLIFVLFLLISSIQDNQTNAAERS
310mutC: MKFNKKRLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLISSIQDNQTNAAERS
310mutA1: MKFNKKRVAIALLFIALIFVLFLLISSIQDNQANAAERS
310mutB1: MKFNKKRVLILLFILLIFVLFLLISSIQDNQANAAERS
310mut7: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSI-DAQ--AAERS
310mut8: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQ-AQ--AAERS
310mut9: MKFNKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--AAEGS
310mut10: MKFNKKRVAIATFIFLIFVSFFTISSIQDAQ--AAERS
310mut11: MKFNKKRVAIATFIFLIFVFFFTISSIQDAQ--AAERS
310mutD2: MK-NKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--AAERS
310mutD7: MK-NKKRVAIATFIALIFVSFFTISSI-DAQ--AAERS
310mutE2: MKF-KKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--AAERS
310mutE11: MK-NKKRVAIATFIFLIFVFFFTISSIQDAQ--AAERS
310mutF2: MKFKKKRVAIATFIALIFVSFFTISSIQDAQ--AAERS

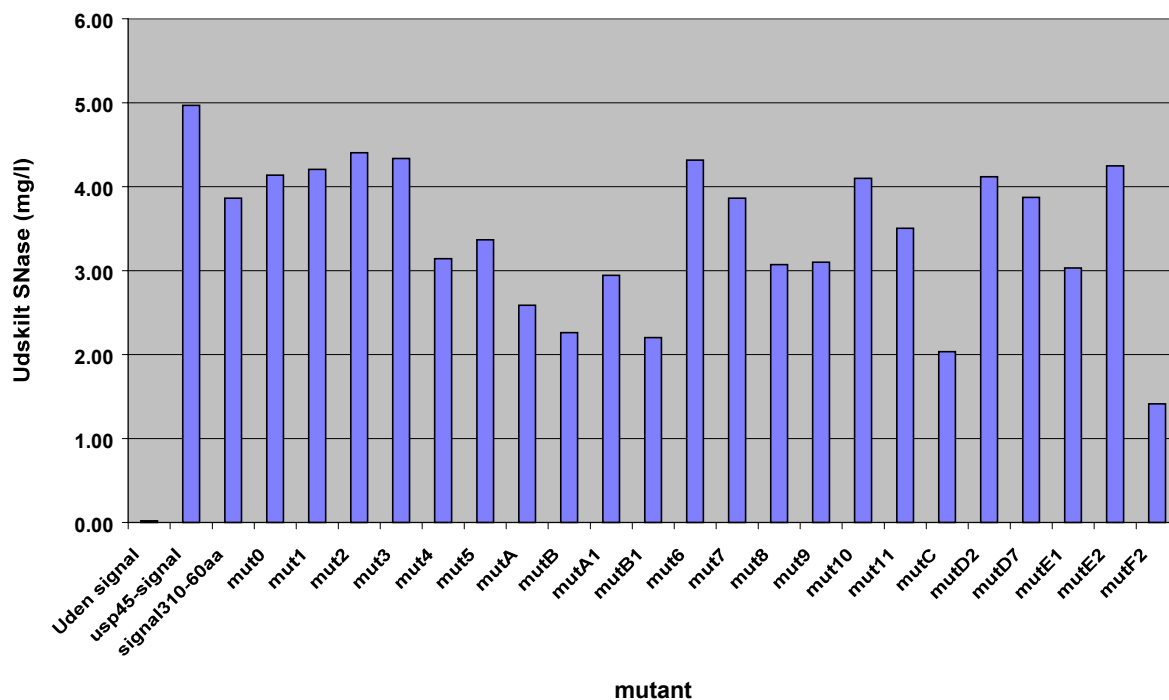
```

Figur 6.

Aminosyresekvens af konstruerede mutanter af signal310. 310mut0 indeholder de første 36 aminosyrer af det naturlige signal310 samt to aminosyrer fra et kloningssite. Spaltningen af signalpeptidet sker mellem Ala34 og Ala35 i 310mut0 angivet med \blacktriangledown . De ændrede aminosyrer er markeret med rødt.

Det fremgår af Figur 7, at en række af de mutanter, der er modificeret ved signalpeptidets spaltningssite, giver en forbedret udskillelse i forhold til signalet uden mutationer, herefter betegnet signal310mut0. Dette bekræfter at signal310 ikke er optimalt ved spaltningssitet. Signal310mut2 og signal310mut6 er de mest effektive signalsekvenser blandt disse mutanter og giver under disse forhold en udskillelse af SNase på næsten 90% af, hvad der kan opnås med *usp45*-signal.

Mutationer i andre dele af signalsekvensen har ikke ført til signalsekvenser, der giver en mere effektive udskillelse af SNase.



Figur 7.

Mængden af udskilt SNase ved anvendelse af signalsekvensmutanter som angivet under søjlerne. Kulturene er dyrket overnat i GM17, og SNasemængden er bestemt. Som kontrol er anvendt konstruktioner uden signalsekvens, med *usp45*-signal og med de første 60 aminosyrer fra signal310.

Afprøvning af signalsekvensernes evne til at mediere udskillelse af plasminogenfragmenter i *Lactococcus lactis*

Konstruktioner med plasminogenfragmenter har tidligere vist sig vanskelige at fremstille i lactococcer og synes at være toksiske for bakterierne. Resultaterne har indikeret, at toksiciteten skyldes proteaseaktiviteten. Derfor blev der fremstillet konstruktioner, der koder for en forkortet plasminogen-udgave kaldet midi-plasminogen. Denne udgave forventes at have lav enzymaktiviteten indtil den aktiveres af en plasminogen aktivator, som bl.a. findes i mælk og i ostemasse. Midi-plasminogen indeholder det aktive domæne af enzymet og to kringledomæner. Tidligere anvendte plasminogenfragmenter har stort set kun indeholdt det aktive domæne af enzymet. De to kringledomæner vil have betydning for binding af enzymet til kasein og vil muligvis have betydning for enzymfoldningen.

Midi-plasminogen-genet blev indsat i ekspressionsplasmider med h.h.v. signal310mut2 og signal307. Efterfølgende blev konstruktionerne introduceret i lactococcer, og der blev foretaget indledende fermenteringer med henblik på at undersøge produktion og aktivitet af midi-plasminen. Hensigten var at vurdere signalsekvenserne i forhold til deres evne til at mediere udskillelse af plasminfragmenter i lactococcer. Resultatet af fermenteringerne foreligger ikke ved afslutningen af denne rapport.

De blev også konstrueret to expressionsvektorer, hvor genet for *Streptococcus uberis* plasminogen aktivator (SuPA) blev fusioneret nedenstrøms for h.h.v. signal310mut2 og

signal307 . Dette arbejde er udført i samarbejde med Laboratorium for Proteinkemi ved Århus Universitet, hvor SuPA-genet er isoleret, og aktivatoren er karakteriseret. SuPA kan aktivere bovin plasminogen men ikke human plasminogen, hvilket gør, at SuPA kan være anvendelig som hjælpestof i levnedsmidler. Hvis SuPA har en gavnlig indflydelse på ostemodning, vil SuPA kunne tilsættes som enzymprodukt. Alternativt vil mælkesyrebakterier, der producerer SuPA, kunne anvendes som starterkultur. Resultatet af de indledende fermenteringer foreligger ikke ved afslutningen af denne rapport. Kolbeforsøg med konstruktioner udført på Laboratorium for Proteinkemi har dog vist, at lactococci kan udskille SuPA, hvilket giver anledning til optimisme vedrørende de her anvendte konstruktioner.

De ovenfor nævnte fermenteringer og de efterfølgende analyser vil blive færdiggjort inden for rammerne af den igangværende centerkontrakt "Center for mælkesyrebakterier som produktionsorganismer i genteknologisk produktion". Resultaterne vil efterfølgende blive beskrevet i en rapport, hvor MFFs finansiering af projektet vil blive anerkendt. Hvis resultaterne viser et kommercielt potentiale, vil Mejeriforeningen blive kontaktet med henblik på at få afklaret foreningens holdning til udnyttelse af resultaterne.

Konklusion

Projektet har været opdelt i faser med følgende milepæle:

- 1: Transposon Tn917-derivater konstrueret med reportergener til identifikation af transportsignaler (Tn917-signal).
- 2: Kollektion af Tn917-signal-insertioner i *L. lactis* produceret. Kollektion screenet for integranter, der udskiller reportergenet. DNA opstrøms for transposon-insertion i 2 til 5 integranter klonet i *E. coli*.
- 3: Transportsignal-selektionsvektor konstrueret. To til fem transportsignaler eller insertionssites karakteriseret; DNA-sekventering, protein-homologistudier, funktionel indkredsning af transportsignal og mapping af processeringsite.
- 4: Expressionsvektorer konstrueret med en eller to karakteriserede transportsignalsekvenser.
- 5: *Lactococcus*-stammer konstrueret, der producerer og eksporterer katalytisk aktive plasminogen-fragmenter og eventuelt andre plasmin-relaterede proteiner.

De første fire faser er gennemført med succes, hvorimod projektet er blevet afsluttet midt i fase 5. Som nævnt ovenfor vil fase 5 blive gennemført i sin helhed under "Center for mælkesyrebakterier som produktionsorganismer i genteknologisk produktion".

Projektet har ført til konstruktion af genetisk værktøj samt identifikation og optimering af molekylære elementer, som kan anvendes både i lactococci og i Gram positive bakterier generelt. Inden udgangen af 1999 forventer vi, at de to nedenfor nævnte manuskripter er accepteret i internationale videnskabelige tidsskrifter. På den måde vil det blive dokumenteret, at projektresultaternes har videnskabelig betydning.

Projektresultaterne har givet grundlag til indlevering af en patentansøgning vedrørende sekretionssignaler i mælkesyrebakterier. Patentansøgningen indikerer, at projektresultaterne også har en kommerciel værdi.

Publikationer

Peter Ravn, José Arnau, Søren Madsen, Astrid Vrang og Hans Israelsen. (1999) The development of Tn*Nuc* and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis* (in preparation).

Peter Ravn, José Arnau, Søren Madsen, Astrid Vrang og Hans Israelsen (1999) Molecular characterization and engineering of signal peptides from *Lactococcus lactis* (in preparation)

