

Afslutningsrapport

Karakterisering og optimering af mekanismer
bag frigørelse af enzymer fra mælkesyrebakterier

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-55

Oktober 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for projektet

Karakterisering og optimering af mekanismer bag frigørelse af enzymet fra mælkesyrebakterier

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

Projektdeltagere

Projektet er et samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Bioteknologisk Institut

Projektperiode

Projektstart 1. januar 2000

Projektafslutning 30. juni 2003

Finansieringskilder

Projektet er finansieret af Mejeribrugets ForskningsFond og FØTEK3

RESUMÉ

Det har været projektets mål at øge forståelsen af mekanismen bag mælkesyrebakteriers udskillelse af proteiner. Det har også været et mål at forbedre proteinudskillelsen, så det bliver muligt at udskille mere protein og at udskille proteiner, som mælkesyrebakterierne hidtil ikke har været i stand til.

I projektet er der udviklet redskaber til at evaluere mælkesyrebakteriers evne til at udskille heterologe proteiner. Der er i projektet anvendt to forskellige strategier for at studere og fremme udskillelsen af proteiner: Der er dels designet mutanter, hvor kendte faktorer med betydning for proteinudskillelse er påvirket, dels er der foretaget tilfældig mutagenese kombineret med screening efter mutanter med forbedret proteinudskillelse. Efterfølgende er udvalgte mutanter blevet karakteriseret.

De undersøgte kendte faktorer er i) proteiner i proteinudskillelsesapparatet, som er forsøgt overproduceret, ii) faktorer, der kan tænkes at hæmme udskillelsen af intakte proteiner og som derfor er fjernet og iii) faktorer, som vides at bidrage positivt til udskillelsesprocessen i andre organismer, men som mangler i *Lactococcus lactis* og derfor er tilføjet.

Proteiner, der er overproduceret under i) er SecA, Tig og SipL. Faktorer, der er fjernet under ii) er HtrA, ClpP og DltA. Faktorer, der er tilføjet til *L. lactis* under iii) er SecDF, DsbCD og BdbCD. Fjernelse af HtrA og tilføjelse af SecDF viste sig at have positiv effekt på proteinudskillelse. Fremstilling og analyse af *htrA*-mutanter og af SecDF-komplementerede mutanter er udført i samarbejde med S. Nouaille, P. Langella, I. Poquet og A. Gruss ved INRA i Jouy en Josas i Frankrig.

I projektet er 50.000 mutantstammer blevet fremstillet og screenet i flydende kulturer for at identificere mutanter med højere udskillelse af reporterproteinet streptokinase, Skc. Dette har ført til isolation af tre mutantstammer med signifikant højere udskillelse af reporterproteiner. Ved hjælp af proteomanalyse er det vist, at disse mutanter overproducerer specifikke proteiner, der normalt induceres ved glukosesult.

I samarbejde med V. Upadhyay og P. McSweeney fra University College Cork i Irland er det vist, at *L. lactis* er i stand til at udskille kommercielt relevante mængder af proteinet Skc, der kan øge plasminaktiviteten og dermed proteolysen i ost.

Projektet har nået de opstillede mål undtagen et. Der er identificeret faktorer, der kan øge proteinudskillelsen. Der er blevet isoleret og konstrueret stammer, der er i stand til at udskille mere protein og et af disse proteiner, Skc, er i stand til at accelerere proteolyse under ostemodning. Der mangler således kun en karakterisering af de mutationer, der gør mutantstammerne bedre til at udskille rekombinant protein.

ENGLISH SUMMARY

The goal in this project was to add to the understanding of protein secretion mechanisms in lactic acid bacteria. It was also a goal to improve protein secretion in such a way that these bacteria become able to secrete greater amounts of protein and proteins, which not previously have been secreted.

New tools for the evaluation of the protein secretion efficiency in *Lactococcus lactis* have been developed. Two alternative strategies have been used for the study and improvement of protein secretion. Mutants have been designed in which known factors of importance for protein secretion have been either overexpressed or inactivated. Furthermore, mutants were isolated by chemical mutagenesis and screening, and isolated mutants with optimized secretion efficiency were characterised.

The known factors, which have been studied, are i) proteins from the secretion apparatus, which we have overproduced, ii) factors with a possible inhibitory effect on secretion, which we have removed, and iii) factors, which is known to contribute positively to protein secretion in other organisms, but are missing in *L. lactis* and therefore have been added.

Proteins that are overproduced in i) include SecA, Tig, and SipL. Removed factors in ii) include HtrA, ClpP, and DltA. Added factors in iii) include SecDF, DsbCD, and BdbCD. The elimination of HtrA and the addition of SecDF improved secretion in *L. lactis*. Construction and analysis of these two mutants were done in cooperation with S. Nouaille, P. Langella, I. Poquet and A. Gruss of INRA in Jouy en Josas, France.

Mutagenesis and subsequent screening of liquid cultures of 50,000 mutated strains lead to the isolation of three new strains with improved yield of secreted proteins. Proteomics techniques were used to demonstrate that two of these strains overproduced proteins, which are linked to glucose starvation.

In collaboration with V. Upadhyay and P. McSweeney of University College Cork, Ireland, it was shown that *L. lactis* can secrete the protein Skc in quantities that makes it commercially feasible. Skc enhances plasmin activity and proteolysis in cheeses.

With one exception, all planned goals for the project were reached. Factors contributing to enhanced protein secretion have been identified. Strains with improved protein secretion have been constructed and isolated. A protein, Skc, which can be secreted in greater amounts in new strains, are capable of accelerating proteolysis during cheese maturation. The unreached goal was an inability to precisely identify the affected factors in the mutant strains, that have been shown to produce more secreted protein.

FORMÅL OG MÅL

Projektets formål har været at bidrage til forståelsen af mekanismer bag mælkesyrebakteriers, især *Lactococcus lactis*, evne til at udskille såvel naturlige som rekombinante proteiner som f.eks. enzymer, der er involveret i ostemodning. Det har været projektets mål at identificere flaskehalse i sekretionssystemet og at forbedre bakteriernes evne til proteinudskillelse, dels så det bliver muligt at udskille større mængder protein, dels så det bliver muligt at udskille proteiner, som det hidtil ikke har været muligt at udskille i målelige mængder eller i aktiv form.

BAGGRUND

I to tidligere FØTEK-projekter, hhv. "*Lactococcus lactis* med ændrede proteolytiske egenskaber" og "Identifikation af transportsignaler, der i mælkesyrebakterier sikrer udskillelse af plasminogenfragmenter" er der konstrueret værktøjer til heterolog genekspression (genekspressionsvektorer) og efterfølgende udskillelse af de producerede proteiner. Disse vektorer er blevet anvendt til at producere og udskille plasmin og plasminogenaktivator i *L. lactis*. Vektorerne kan desuden anvendes til at få *L. lactis* til at producere og udskille en række andre proteiner, der har betydning for mejeriindustrien, den øvrige fødevarerindustri eller medicinalindustrien. Indenfor fødevarerindustrien kan disse værktøjer tænkes anvendt til produktion af enzymer, der efterfølgende kan tilsættes fødevarer. Alternativt kan den genetisk modificerede bakterie tilsættes som starterkultur til levnedsmidlet, hvis dette er ønskværdigt og acceptabelt.

Udskillelsen af det producerede protein er vigtig, når proteinet skal oprenses før anvendelse, idet udskillelsen forenkler oprensningen betydeligt. Hvis et enzym skal produceres af en starterkultur i en fødevarer, er udskillelse nødvendig, for at enzymet kan komme i kontakt med et givet substrat uden for bakterien.

Det har imidlertid vist sig, at visse proteiner er vanskelige at fremstille og udskille for mælkesyrebakterier. Hvis det er muligt at optimere mælkesyrebakteriernes proteinudskillelsesapparat, således at det bliver muligt at producere og udskille flere forskellige proteiner, herunder mejeri- og levnedsmiddelrelevante, vil det være kommercielt interessant. Efterfølgende kan proteinerne enten oprenses eller fermenterede fødevarer kan anvendes som functional food.

RESULTATER

Strategier for fremstilling af mutanter med forbedret proteinudskillelse

I projektet er der anvendt to forskellige metoder til fremstilling af mutanter med bedre proteinudskillelse. I den ene har vi designet mutanter ud fra, hvad der vides om proteinudskillelse i andre organismer. De designede mutanter er herefter blevet afprøvet, for at afgøre om ændringerne fører til bedre udskillelse. I den anden strategi har vi kemisk mutageniseret *L. lactis* og har herved opnået et bibliotek af stammer med tilfældige mutationer. Mutantbiblioteket er i et high-throughput setup screenet for stammer, der er i stand til at udskille mere reporterprotein. En række stammer er blevet isoleret og det er testet om disse også var i stand til at udskille mere af andre proteiner. Herefter blev udvalgte stammer karakteriseret.

Evaluering og indkøring af værktøjer til vurdering af proteinudskillelse

Vurdering af *L. lactis* stammers evne til proteinudskillelse kræver passende reporterproteiner med tilhørende assays, hvor mængden af udskilt protein præcist kan måles. Screening af mutantbiblioteker efter bedre proteinudskillere kræver desuden, at assays relativt let kan udføres på et stort antal mutanter.

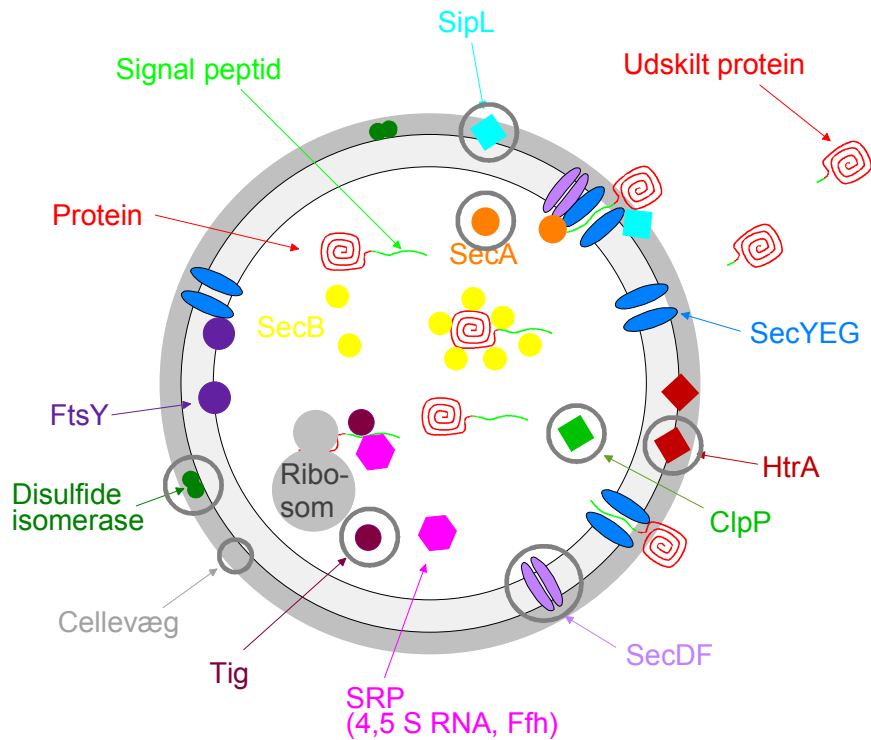
Indledende forsøg med stafylokoknuklease (Nuc) som reporterprotein viste, at koloniscreening kun kunne detektere forskel på stammer, når der var mere end en tofaktor forskel på mængden af udskilt protein. Assays på Nuc udskilt i flydende kulturer kan måles ret præcist som beskrevet i Ravn *et al.* 2003, *Microbiology* 149:2193-2201, men det flydende assay er for arbejdskrævende til at kunne udføres på et stort antal stammer. Det blev derfor besluttet at udvikle et mindre arbejdskrævende assay til flydende kulturer, hvor robot bruges til koloni-picking og væskehåndtering. Grundlaget for det anvendte screeningsassay er baseret på proteinet *Streptococcus uberis* streptokinase (Skc), der udover at kunne måles i mikrotiterplade baserede assays også har relevans for mejeriindustrien, idet Skc kan aktivere bovin plasminogen til proteasen plasmin. Skc med det originale assay er beskrevet i Johnsen *et al.*, 1999, *Infect. Immun.* 67:1072-1078. Udover Skc- og Nuc-assay er der afprøvet og indkørt assays, hvor BlaM fra *Escherichia coli* anvendes som reporterenzym. Reportergener er generelt blevet ekspresseret og udskilt ved hjælp af henholdsvis promotoren P170 og signalpeptidet SP310mut2.

Design af stammer med ændrede proteinudskillelsesegenskaber

Generelt

Eksisterende viden om proteinudskillelse hos bakterier er i vid udstrækning baseret på forsøg med bakterien *E. coli*. I Figur 1 er der illustreret nogle af de faktorer, der hos bakterier vides at have betydning for effektiv udskillelse af funktionelle proteiner.

I projektet har forsøg på at forbedre proteinudskillelse bestået i i) at øge mængden faktorer, der kan være tilstede i utilstrækkelig mængde for effektiv udskillelse, at ii) komplementere *L. lactis* med faktorer, som den ikke naturligt indeholder, men som er betydningsfulde i andre organismer og iii) at fjerne faktorer, der kunne begrænse mængden af udskilt protein.



Figur 1.

Forenklet præsentation af bakteriecelle. Et protein (i rødt), der skal udskilles (med signalpeptid (i lysegrønt)) er vist. Proteinet bliver ved hjælp af udskillelsesfaktorer (Sec-proteiner) sendt ud til cellens overflade, hvor signalpeptidasen spalter signalpeptidet fra og derved frigør proteinet. Faktorer, der er forsøgt ændret i dette projekt er markeret med cirkler.

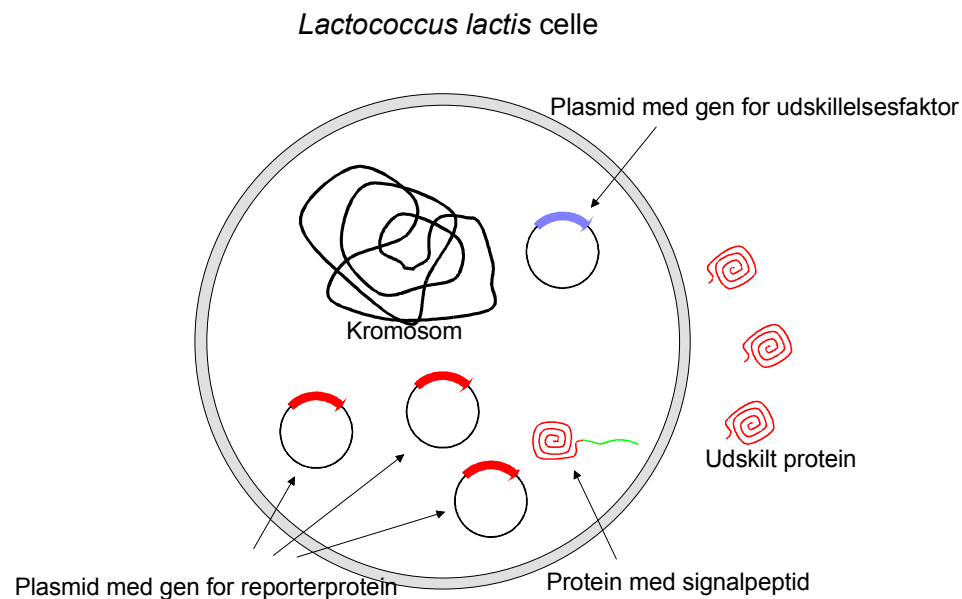
Simplificeret kan modellen for udskillelsesprocessen beskrives ved, at det nysyntetiserede protein med signalpeptid genkendes og bindes af SecA. Dette proteinkompleks binder herefter SecYEG, tre proteiner, der udgør kanalen til cellens ydre. På ydersiden af cellen fraspaltes signalpeptidet af signalpeptidasen, SipL.

i) Overekspression af *L. lactis* udskillelsesfaktorer

Vi har i projektet forsøgt at øge mængden af faktorerne SecA, SipL (signalpeptidase) og Tig (trigger factor). Ved at øge mængden af SecA var det forventet, at tilførslen af proteiner til SecYEG kunne øges. I *E. coli* kan *secA* overekspression føre til forbedret proteinudskillelse (Cook & Kumamoto, 1999, J. Bact. 181:3010-3017). Tilsvarende forventedes det, at *sipL* overekspression ville accelerere frigivelse af udskilte proteiner. Bakterien *Bacillus subtilis* har flere gener, der koder for signalpeptidaser, og dette regnes for at være en adaptation til at kunne udskille store mængder protein (Bron *et al.*, 1998, J. Biotechnol. 64:3-13). Tig's rolle i proteinudskillelse er ikke afklaret, men det er blevet foreslået, at dette protein også kan være vigtigt for genkendelse af proteiner, der skal udskilles (Beck *et al.*, 2000, EMBO J. 19:134-143).

Genet *secA* fra *L. lactis* MG1363 har ikke tidligere været klonet, men den tilsvarende DNA sekvens kendes fra *L. lactis* IL1403. Udfra IL1403-sekvensen blev der designet PCR-primere, der efterfølgende blev anvendt til at klonere *secA* og omkringliggende gener. Sekventering af to uafhængige kloner viste, at MG1363 *secA* er 90% identisk med *secA* fra IL1403. For at øge mængden af SecA i cellerne blev *secA* klonet i ekspressionsvektoren pNZ8010. Ekspressionen af *secA* kontrolleres her af promotoren P_{nisA} , og ekspressionsniveauet reguleres ved at tilsætte induceren nisin. *secA*'s eget ribosombindingssted (RBS) benyttes, og der blev fremstillet konstruktioner både med og uden terminator sekvens. Kloningen af genet *tig* blev foretaget tilsvarende. IL1403-sekvensen blev anvendt til design af kloningsprimere, genet blev sekventeret (90% identisk med *tig* fra

IL1403), og der blev lavet ekspressionskonstruktioner i pNZ8010, igen med *tigs* eget RBS hhv. med og uden terminator. Konstruktioner med såvel *secA* og *tig* blev kombineret med ekspressionskonstruktioner i P170-systemet med *skc*, *blaM* og to varianter af *nuc*, hhv. *nucA* og *nucB*, som reporterprotein. Figur 2 viser hvorledes ekspression af gener for udskillelsesfaktorer blev kombineret med ekspression af reportergener. Overekspression af *secA* eller *tig* resulterede ikke i målelige positive effekter på udskillelsen af reporterproteinerne. Ved høj nisintilsætning og dermed kraftig induktion af P_{nisA} promotoren blev der, for både *secA* og *tigs* vedkommende, tværtimod observeret en nedgang i mængden af ekstracellulære reporterproteiner. Dette betyder ikke nødvendigvis at mere SecA eller Tig hæmmer proteinudskillelsen, men kan skyldes, at den stærke ekspression af disse to faktorer belaster cellerne fysiologisk. Fænomenet er ikke undersøgt nøjere, da resultaterne fra lav nisintilsætning tyder på, at hverken SecA eller Tig er en begrænsende faktor.



Figur 2.

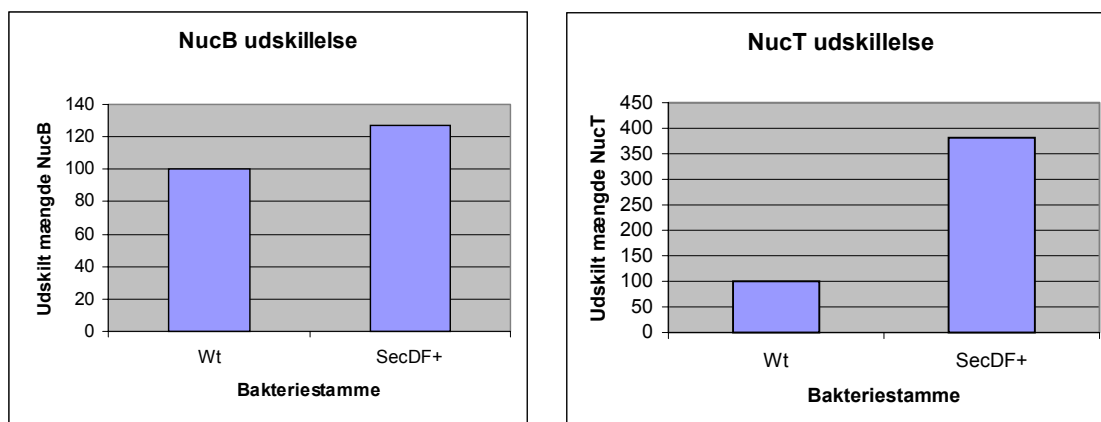
Samtidig produktion af udskillelsesfaktor og reporterprotein. Genet for udskillelsesfaktoren (blå) findes på et plasmid og genet for reporterproteinet (Rød) opretholdes samtidigt på et andet plasmid. Reporterproteinet laves i cellen med signalpeptid, og mængden af reporter, der udskilles, kan måles.

Effekten af at forøge mængden af signalpeptidase, SipL, er blevet studeret i samarbejde med S. Nouaille og P. Langella fra INRA i Jouy en Josas i Frankrig.. Nouaille og Langella har klonet genet *sipL* fra *L. lactis* MG1363 og indsat genet i ekspressionskonstruktioner, hvor *sipL* er under kontrol af P_{nisA} promotoren. I samarbejde med Bioteknologisk Institut er det blevet testet om overekspression af *sipL* har indflydelse på udskillelse af de to nukleasevarianter *nucT* og *nucB*. *nucB* er her også kombineret med andre signalpeptider, hvor det specielt var antaget, at signalpeptidspaltningen var hæmmet. I ingen tilfælde resulterede *sipL* overekspression i en signifikant forbedring af nukleaseudskillelsen.

ii) Komplementation med gener fra andre bakterier

Som nævnt har det i projektet også været forsøgt at komplementere *L. lactis* med udskillelsesfaktorer, som denne bakterie mangler fra naturens side. Genomsekventering af *L. lactis* IL1403 har vist, at *L. lactis* mangler proteinudskillelsesfaktoren SecDF, og at bakterien formodentlig ikke producerer ekstracellulære eller overfladebundne disulfidisoimeraser. SecDF findes i de fleste bakterier således også i *B. subtilis*. SecDF forbedrer proteinudskillelse i *B. subtilis*, men den eksakte virkningsmekanisme er ikke kendt (Bolhuis

et al., 1998, J. Biol. Chem. 273:21217-21224). Nouaille og Langella har indsat *secDF* genen fra *B. subtilis* i *L. lactis* MG1363. I samarbejde med Bioteknologisk Institut er effekten på udskillelse af de to nukleasevarianter, NucB og NucT, blevet studeret. Resultatet ses i Figur 3.



Figur 3.

Effekt af SecDF på udskillelse af nuklease. SecDF produceres ud fra dens egen promotor (fra *B. subtilis*), mens NucB og NucT produceres ud fra P_{nisA} promotoren. Wt er stammen uden *secDF*, mens stammen markeret SecDF har en kopi af *B. subtilis secDF* integreret på kromosomet

For både NucB og NucT's vedkommende stiger mængden af udskilt protein, når *L. lactis* er komplementeret med *secDF*. Stigningen er højest for NucT's vedkommende. Dette skyldes formodentlig, at NucB normalt udskilles mere effektivt end NucT. I en *L. lactis* uden *secDF* udskilles ca. 90% af den producerede NucB, mens det tilsvarende tal for NucT's vedkommende kun er ca. 30%. Da NucT normalt udskilles mindre effektivt, er der også plads til en større forbedring af udskillelsen. Studiet af SecDF fortsætter hos INRA i Jouy en Josas, Frankrig.

Som nævnt tyder analyser af genomsekvensen på, at *L. lactis* ikke har disulfidisomeraser på overfladen. Disulfidisomeraser er hjælpeproteiner, der assisterer foldningen af proteiner med disulfidbroer. Dette harmonerer med, at det er usædvanligt, at naturligt udskilte *L. lactis* proteiner indeholder disulfidbroer, og at det er observeret at proteiner, der indeholder mange disulfidbroer, som f.eks. bovin plasminogen, er vanskelige at producere i *L. lactis*. Disulfidbroholdige proteiner er imidlertid ofte interessante. Dels er der mange eukaryote disulfidbroholdige højværdiproteiner, der har interesse for den farmaceutiske industri, dels er der mange disulfidbroholdige enzymer, der kan være interessante at producere for mejeriindustrien, f.eks. chymosin eller plasminogenaktivatorer.

I *E. coli* medfører overproduktion af disulfidisomerasen DsbC i, at flere disulfidbroholdige proteiner kan produceres, f.eks. tissue type plasminogen activator (tPA). DsbC er afhængig af et andet *E. coli* enzym, DsbD, for at blive regenereret. Vi har klonet *dsbC* og *dsbD* i pNZ8010 og studeret effekten på produktion af tre disulfidbroholdige proteiner: BlaM (fra *E. coli*), tPA (bovin) og plasminogen (bovin). I en *L. lactis* uden *dsbCD* var det ikke muligt at detektere af tPA-aktivitet eller aktivérbar plasminogen. Coekspression af *dsbC* alene eller i kombination med *dsbD* førte ikke til forbedret aktivitet af tPA eller plasminogen i *L. lactis*. Ved høje ekspressionsniveauer indikerede et ekstra proteinbånd i supernatanter fra celler med *dsbC*, at DsbC faktisk blev produceret af cellerne. Da DsbD er et membranprotein, udskilles det ikke og produktionen af DsbD er derfor vanskeligere at bekræfte. Vi har imidlertid ikke grund til at tro, at det ikke skulle være lykkedes at fremstille DsbD.

Produktion af β -lactamase, BlaM, fra *E. coli* fører i *L. lactis* ikke til resistens mod ampicillin. Dette er tidligere blevet forklaret med, at *L. lactis* ikke er istand til at danne en disulfidbro i BlaM. *L. lactis* kan imidlertid producere BlaM, og det er også muligt at detektere aktivitet ved at bruge det kromogene substrat nitrocefin. Da der således allerede kan detekteres aktivitet, er det muligt at detektere små forbedringer i BlaM-aktiviteten. Da BlaM er et protein fra *E. coli*, er det også sandsynligt at BlaM vil være et substrat for *E. coli* DsbC. Produktion af DsbCD i *L. lactis* havde imidlertid ikke nogen positiv effekt på aktiviteten af BlaM.

Grunden til den manglende effekt af *dsbC* kan skyldes, at dette protein er designet til at fungere i *E. coli*'s periplasma, et miljø der er forskelligt fra overfladen af *L. lactis*. Under projektforløbet blev der identificeret ekstracellulære disulfidisomeraser fra *B. subtilis*, og det var forventet at de var mere velegnede til at fungere på overfladen af *L. lactis*. Generne *bdbC* og *bdbD* er organiseret i et operon i *B. subtilis*. BdbC fungerer som disulfidisomerase og BdbD regenerer BdbC. *bdbC* blev dels klonet i pNZ8010, dels blev det samlede *bdbCD*-operon klonet. Effekten af *bdbC* ekspression alene eller af både *bdbC* og *bdbD* ekspression på aktiviteten af såvel tPA, plasminogen og BlaM blev studeret. Det var ikke muligt at detektere nogen positiv effekt af disulfidisomeraserne på reporterenzymene. Ekspression af disulfidisomerasegener fra såvel *E. coli* som *B. subtilis* blev også forsøgt i en konstrueret *htrA* mutant. Overfladeproteasen HtrA nedbryder misfoldede proteiner under udskillelsen og kunne tænkes at nedbryde specielt tPA og plasminogen før de blev refoldet af producerede disulfidisomeraser. Det var imidlertid heller ikke muligt at opnå tPA- eller plasminogen-aktivitet i *htrA* mutanten.

iii) Elimination af faktorer der kan begrænse mængden af udskilt protein

Visse *L. lactis* proteiner kan tænkes at have en negativ indflydelse på mængden af udskilt protein. Vi har studeret effekten på proteinudskillelse af at inaktivere en række forskellige gener. Det drejer sig generne *clpP*, *dltA* og *htrA*.

Genet *clpP* er normalt involveret i intracellulær nedbrydning af misfoldede proteiner, og det har tidligere været foreslået, at ClpP også kunne nedbryde proteiner, der skal udskilles.

Et protein, der bliver udskilt med lavt udbytte og er delvist nedbrudt i *L. lactis* MG1363, blev forsøgt udskilt i en MG1363 *clpP* mutant. Dette førte ikke til højere udbytte eller til mindre nedbrydning. Resultatet bekræftes af samtidige undersøgelser (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68: 917-922), der viser at *clpP* mutanter ikke giver højere udbytte af udskilte proteiner. ClpP's effekt på proteinudskillelse er derfor ikke studeret nøjere.

Enzymet DltA er nødvendigt for at *L. lactis* kan inkorporere D-alanin i cellevæggen, hvorved den bliver mindre negativt ladet. En *dltA* mutant er blevet identificeret af Nouaille og Langella fra INRA. I *B. subtilis* kan produktionen af labile ekstracellulære proteiner forbedres i *dltA* mutanter (Thwaite *et al.*, 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:227-234). Vi fandt at udskillelsen af et labilt protein ikke var forbedret hos *L. lactis*. Desuden var udskillelsen af proteinerne NucT, NucB og Skc forringet i *dltA*-mutanten, mens udskillelse af BlaM var upåvirket.

HtrA er et kendt eksempel på et protein, der indvirker negativt på udskillelse af proteiner (Poquet *et al.*, 2000, Mol. Microbiol. 35:1042-1051). Eksisterende *htrA*-mutanter har

imidlertid ikke omfattet stammen MG1363. Desuden har eksisterende stammer været konstrueret, så de kunne revertere til vildtype. I samarbejde med I. Poquet fra INRA har vi fremstillet stabile deletioner af *htrA* i MG1363 og de to derivater af denne, NZ9000 og PSM565. Den konstruerede MG1363 Δ *htrA*-mutant blev anvendt til at producere et protein, der i MG1363 nedbrydes til mindre fragmenter. I MG1363 Δ *htrA*-mutanten var nedbrydningen reduceret og proteinudbyttet højere. Udnyttelse af *htrA*-mutanter til kommerciel proteinproduktion skal forhandles med INRA, som har patent på *htrA*'s anvendelse. Men i visse tilfælde er anvendelse af en *htrA*-mutant formodentlig den bedste løsning til at producere et protein, der volder problemer i en vildtype *L. lactis* stamme.

Kemisk mutagenese og screening efter superudskillere

Et alternativ til at designe mutanter med en ønsket egenskab, er at foretage tilfældig mutagenese og efterfølgende screene sig frem til stammer med forøget udskillelse. Mutanterne karakteriseres med henblik på at opklare hvilke mutationer, der er årsag til den ønskede egenskab.

Insertionselementsmutagenese

I projektet har vi i samarbejde med Nouaille og Langella lavet tilfældig knockout af gener med insertionselementet *ISS1*. Vi har kun været involveret i en mindre del af dette arbejde, der er beskrevet i artiklen "Influence of Lipoteichoic acid D-Alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* revealed by random mutagenesis", Nouaille *et al.*, submitted til Appl. Environ. Microbiol. Dette arbejde vil ikke blive beskrevet videre her.

Kemisk mutagenese og screening

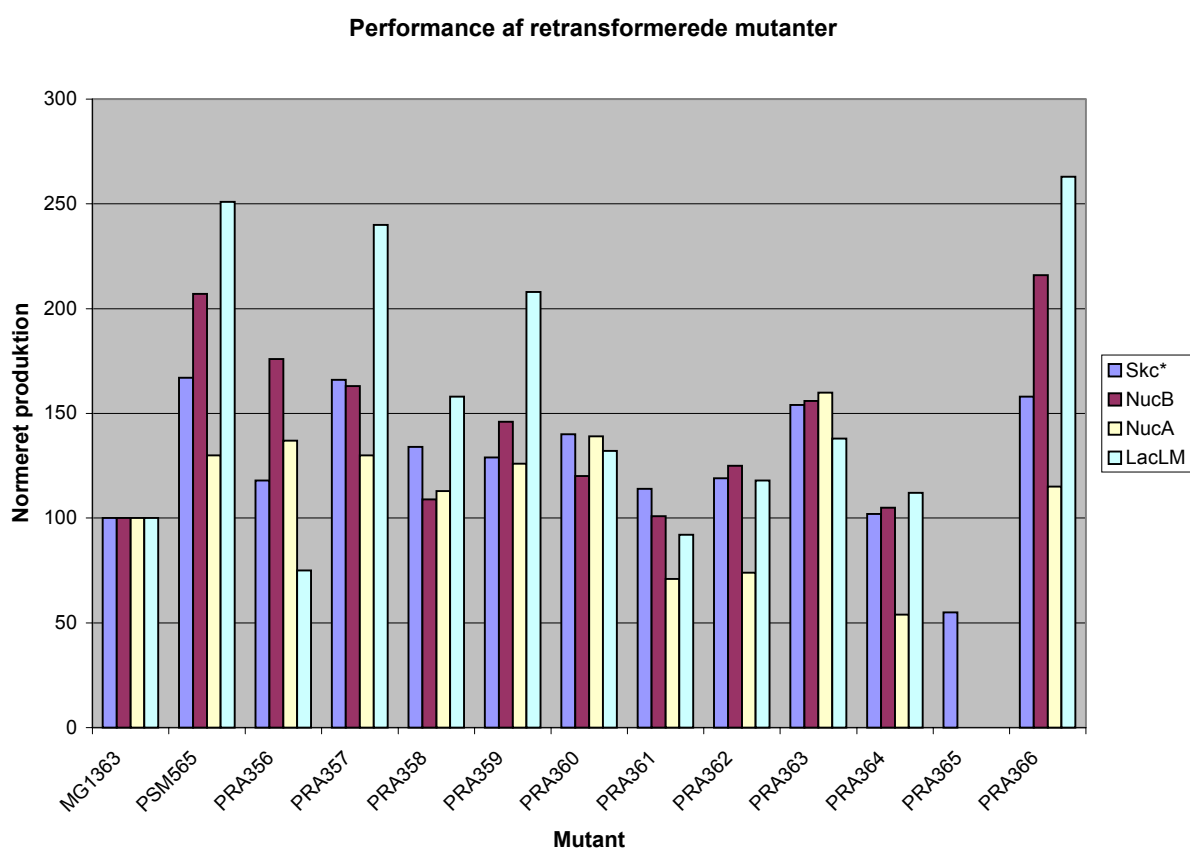
Mutagenese med insertionselementer har den fordel, at det er forholdsvis let at karakterisere en isoleret mutant. Desværre giver denne mutagenesemetode kun et begrænset spektrum af mutanter, nemlig de mutanter, der kan opnås ved at eliminere et enkelt gen. Kemisk mutagenese giver derimod et bredere spektrum af mutanter, idet der også kan opnås op- og nedregulering af gener, eller proteiner med ændrede egenskaber.

Som nævnt i afsnittet "Evaluering og indkøring af værktøjer til vurdering af proteinudskillelse", er der i projektet udviklet en robotbaseret screeningsmetode, hvor der screenes efter stammer, der overudskiller proteinet *Skc*. *L. lactis* MG1363 indeholdende et ekspressionsplasmid med *skc* blev mutageniseret med det DNA-alkylerende kemikalie ethylmethansulfonat. Derefter blev ca. 50.000 mutageniserede kloner screenet og i første omgang blev der udvalgt 152 kloner, som blev testet igen. Tolv kloner med forøget udskillelse af *Skc* blev udvalgt til nærmere analyse. For at afgøre hvorvidt mutationerne findes på det introducerede ekspressionsplasmid, eller om det er stammerne, der har fået forbedrede udskillelsegenskaber, blev de tolv stammer kureret for plasmid. Herefter blev de retransformeret med det oprindelige ekspressionsplasmid. Samtidig blev ekspressionsplasmider med reportergenerne *nucB*, *nucA* og *lacLM* introduceret i stammerne. *NucB* og *NucA* er udskilte reporterenzymmer, der her anvendes for at afgøre om det forbedrede udbytte af udskilt protein er specifikt for *Skc*, eller om stammerne generelt er bedre til at udskille rekombinant protein. *LacLM* er et intracellulært protein. Måling af *LacLM* aktivitet blev foretaget for at afgøre, om det er udskillelsesprocessen, der er påvirket i de tolv stammer, eller om stammerne også producerer mere heterologt protein intracellulært. Resultatet af måling af proteinudbytter ses i Figur 4.

Karakterisering af udvalgte mutanter

I alle tilfælde, undtagen et, udskilte de retransformerede stammer mere Skc end vildtypestammen, MG1363. To mutanter, PSM565 og PRA366 udviser et sammenligneligt mønster. Disse to stammer producerer også mere af den intracellulære reporter LacLM. Dette tyder på, at det ikke er udskillelse, der er påvirket, men at det snarere er produktionsniveauet af heterologe proteiner, der generelt er hævet. Andre egenskaber er også identiske for disse to stammer, og det antages at de bærer de(n) samme mutation(er). Det højere produktionsniveau i PSM565 var ikke begrænset til P170 promotoren, men kunne også opnås med to konstitutive promotorer.

Stammen PRA356 producerer mere udskilt NucB, NucA og Skc, mens den producerer mindre af det intracellulære LacLM, og det antages derfor, at stammen har forbedret proteinudskillelse. Mutanterne PSM565, PRA366 og PRA356 blev udvalgt til videre karakterisering.



Figur 4.

Udbytte af reporterprotein for tolv retransformerede mutantstammer. Udbyttet af reporterprotein er sat til 100% for vildtypestammen MG1363. *Værdien for Skc er ikke en lineær funktion af udbyttet, f.eks. betyder en værdi på 150% i dette tilfælde at Skc udbyttet er ca. 200% højere, men en højere værdi svarer altid til et højere udbytte.

Valget af kemisk mutagenese gør, at det er vanskeligt at udpege, hvilke mutationer, der har fundet sted. Desuden betyder den kemiske mutagenese, at stammerne indeholder mange mutationer, hvoraf kun én eller nogle få af disse har betydning for produktionsniveauet.

Der er anvendt to forskellige metoder for at identificere interessante mutationer. Der er dels lavet proteomsammenligninger af mutantstammer i forhold til MG1363, dels er det forsøgt at komplementere MG1363 med DNA fra PRA356 og derved overføre mutationen.

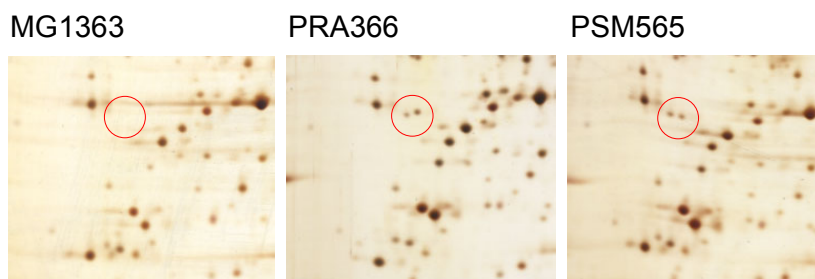
Proteomsammenligning af mutanter og MG1363

Totalt protein blev præpareret fra MG1363 og de tre mutantstammer. Proteiner blev herefter separeret på 2D-geler. Der er fremstillet to geler fra hver stamme for at få maksimal opløsning af proteiner og gelerne blev sammenlignet for at identificere forskelle mellem stammerne. Et eksempel på en gel ses i Figur 5.

Figur 5.

Sølvfarvet 2D-gel af intracellulære proteiner i MG1363

Ved analysen af PSM565 og PRA366 blev det udnyttet, at disse to stammer antages at have den samme mutation, og at forskelle til MG1363 derfor bør gå igen i disse to stammer. I Figur 6 er der vist to eksempler på proteinspots, der optræder på geler med protein fra PSM565 og PRA366, men ikke på tilsvarende geler med MG1363 protein. Fem proteinspots, der ikke optræder på geler med MG1363 protein blev udpeget, oprenset fra 2D-gel, og forsøgt identificeret ved trypsinbehandling, MALDI-TOF massespektrometri og sammenligning med database-sekvenser. Fire proteinspots kunne identificeres ved, at homologe proteiner kendes fra *L. lactis* IL1403. Da IL1403's genomsekvens er publiceret, kendes potentielle proteiner fra denne stamme. Ét proteinspot kunne ikke identificeres ud fra offentlige databaser. De fire identificerede proteiner er Aldose 1-epimerase (GalK), Galactokinase (GalM), Acetat kinase (AckA2) og et hypotetisk protein (ORF555). Fælles for proteinerne er, at de respektive geners regulering formodentlig er påvirket af glukosesult. ORF555 er stærkt induceret under glukosesult (Personlig kommunikation med M. Kilstrup, Biocentrum-DTU), og grundigere databasestudier har vist, at ORF555 formodentlig er et ribosomassocieret protein med betydning for translation og/eller transskription. De observerede ændringer i proteomet og det højere udbytte af heterologe proteiner kan skyldes overekspression af ORF555. Alternativt kan en (ikke identificeret) mutation i et regulerende protein medføre både ændringerne af proteomet og overekspressionen af heterologe gener.



Figur 6.

Identifikation af spot 6 og spot 7, der kun findes på geler med protein fra stammerne PRA366 og PSM565. Spot 6 og spot 7 er identificeret som hhv. GalK og GalM.

Der er tilsvarende blevet lavet proteomanalyse på stammen PRA356. Fire spots, som var stærkere på PRA356-geler end MG1363-geler, blev identificeret. De tre af disse var RNA polymerase α -chain, Glu-tRNA amidotransferase subunit A og Glutamine ABC transporter ATP binding subunit. De tre proteiner er alle involveret i proteinsyntesen i *L. lactis*, men det er ikke lykkedes at knytte en forbindelse til den forbedrede proteinudskillelse, som denne stamme har. Det fjerde udpegede proteinspot havde ingen databasematch og kan derfor ikke identificeres på nuværende tidspunkt.

Det kan i dette tilfælde ikke med samme sikkerhed siges, at proteinspots er relateret til det forhøjede udbytte af reporterprotein, da spots ikke har kunnet bekræftes af uafhængige mutanter.

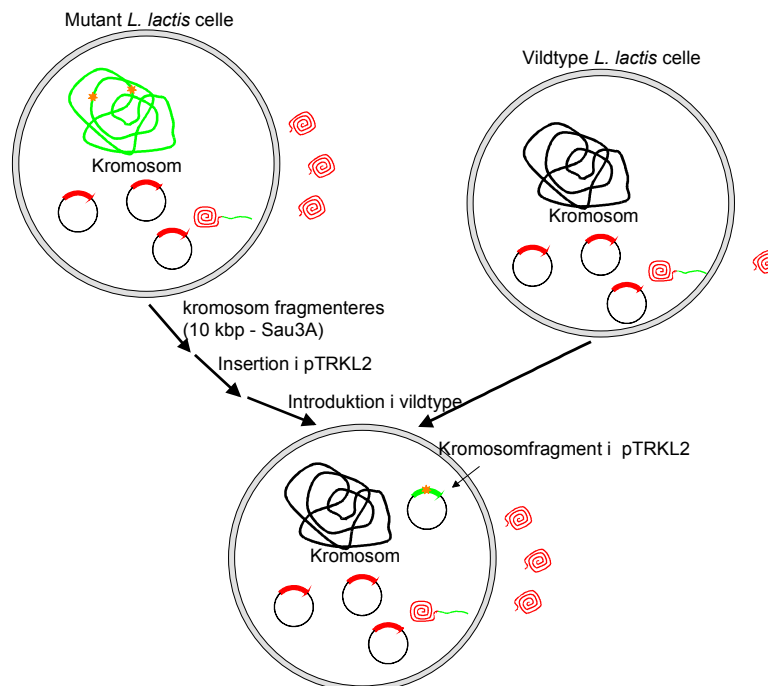
Der kunne ikke udpeges proteinspots, der var væsentlig kraftigere på geler med MG1363 protein end på geler med protein fra mutantstammer.

Da det ikke ved proteomanalyse lykkedes at identificere de mutationer, som giver PRA356 bedre proteinudskillelse, blev det forsøgt at komplementere MG1363 med DNA fra PRA356 for på denne måde at overføre og identificere mutationer.

Komplementation af MG1363 med DNA fra stamme PRA356

Princippet i komplementation af *L. lactis* MG1363 med DNA fra mutantstammer er illustreret i Figur 7. Der er blevet konstrueret biblioteker i pTRKL2 med DNA fra de tre mutanter PSM565, PRA366 og PRA 356. Desuden er der fremstillet et bibliotek med DNA fra MG1363.

Mere end 2000 forskellige kloner fra PRA356 biblioteket er screenet svarende til, at der er mere end 95% sandsynlighed for at et givet gen er inkluderet i screenet. Fem DNA fragmenter fra PRA356, der øger MG1363's udskillelse af reporterproteinet Skc, blev isoleret og delvist sekventeret fra begge termini. DNA-sekvens fra termini blev anvendt til, ud fra *L. lactis* IL1403's genomsekvens, at bestemme en sandsynlig udstrækning og placering af DNA fragmenterne i MG1363's genom. DNA fragmenterne kom ikke, som forventet, fra det samme eller fra nogle få steder på *L. lactis*'s genom. Dette fortolkes således, at det ikke er de oprindelige udskillelsesfremmende mutationer fra PRA356, der er overført, men snarere at ekstra kopier af visse gener kan forbedre udskillelsen. Det er muligt, at vi her har en metode, der ikke kun er anvendelig til at identificere eksisterende mutationer, men også er et nyt redskab til at identificere gener, hvor gendosis er begrænsende for proteinudskillelsen.



Figur 7.

Komplementation af MG1363 med DNA fra mutantstamme. Mutantstammens DNA fragmenteres til stykker på ca. 10 kb. Stykkerne sættes ind i plasmidet pTRKL2 og de resulterende plasmider introduceres i MG1363, der indeholder et andet plasmid med et reportergen. Hvis mutationen findes på det pågældende fragment vil MG1363 få overført mutantens egenskab (her bedre proteinudskillelse), hvis mutationen er dominant.

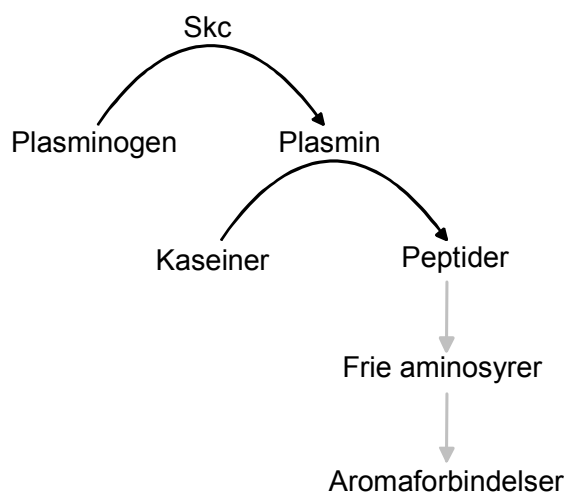
For at indkredse hvilke gener på fragmenterne, der fremmer proteinudskillelsen, er der foretaget tilbageskæringer med restriktionsenzymet således, at størrelsen af de isolerede fragmenter reduceres. Dette førte i alle tilfælde til en kraftig reduktion af den udskillelsesfremmende effekt. Det er muligt, at de udskillelsesfremmende effekter er distribueret over hele fragmenternes længde, eller at størrelsesreduktionen, der er opnået ved tilbageskæringerne er for omfattende.

Det næste skridt i analysen af de isolerede fragmenter vil være at afklare hvor meget og hvilket DNA, der ved tilbageskæringerne er fjernet fra fragmenterne. Herefter kan der laves mindre deletioner for at afklare, hvor meget af fragmenterne, der er nødvendigt for at fremme proteinudskillelse. Dette var desværre ikke muligt at nå inden projektets afslutning.

Demonstration af anvendelse af et *L. lactis* produceret protein i en mejeriprocess

Bioteknologisk Institut har i tidligere samarbejdsprojekter med MFF undersøgt muligheden for at producere proteiner med virkning på den proteolytiske aktivitet i mejeriprodukter, f.eks. ost. I dette projekt er plasminogenaktivatoren Skc fra *Streptococcus uberis* blevet anvendt som reporterprotein for at vurdere *L. lactis*'s generelle evne til proteinudskillelse. Udover at være velegnet til at vurdere effekten af de designede mutationer og til at bruge i screeningen af et stort antal mutanter har Skc en mulig anvendelse som accelerator af den naturlige proteolyse i ost under modningen.

Vi har i samarbejde med Paul McSweeney og Vivek Upadhyay fra University College Cork i Irland undersøgt muligheden for at anvende Skc, produceret i *L. Lactis*, til at hæve plasminaktiviteten og proteolysen i ost. Princippet i denne aktivering er vist i Figur 8.

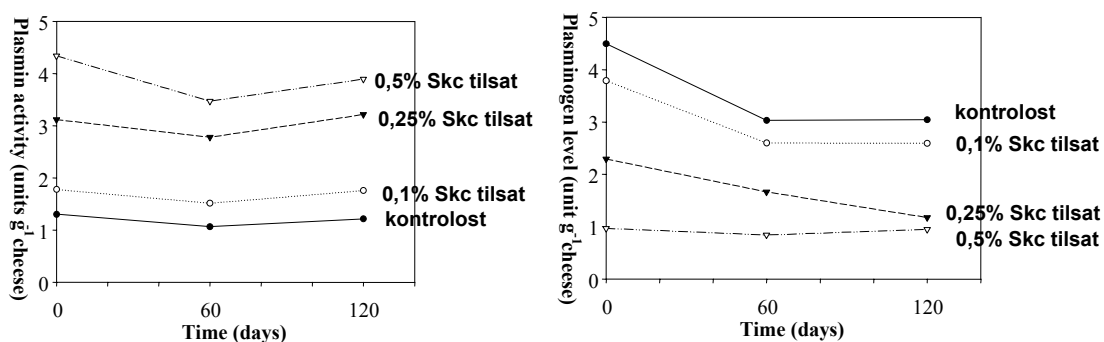


Figur 8.

Princippet ved Skc's aktivering af plasminogen til plasmin. Skc aktiverer plasminogen til plasmin, der nedbryder kaseiner til mindre peptider. Disse peptider kan nedbrydes videre af mikrobielle proteaser og peptidaser til aminosyrer, der igen kan nedbrydes til forskellige aromaforbindelser.

Der er blevet produceret Skc ved fermentering af en *L. lactis* MG1363, hvor *skc* er indsat i P170-ekspressionssystemet. Det udskilte Skc blev koncentreret ca. 1,5 gange ved

ultrafiltrering og tilsat til ostemælk i volumenforholdet 1/1000, 1/400 og 1/200. Plasminaktiviteten og niveauet af plasminogen i producerede minicheddars blev herefter fulgt. Resultatet ses i Figur 9.



Figur 9.

Plasminaktivitet i minicheddar efter tilsætning af Skc, produceret i *L. lactis*. Plasminaktiviteten i oste, hvor der er tilsat 0,5% Skc er ca. 3 gange så høj som plasminaktiviteten i kontroloste. Niveauet af plasminogen er tilsvarende lavere i oste med Skc, hvilket viser, at plasminogen er omdannet til plasmin.

Den forøgede proteolytiske aktivitet resulterede i en øget nedbrydning af kasein (β -kasein) og dannelse af mindre peptider.

Skc producerende *L. lactis* MG1363 blev desuden anvendt som starterkultur i en produktion af minicheddar, efter at plasmidet pLP712 var blevet introduceret i denne stamme. Plasmidet pLP712 er nødvendigt, fordi det indeholder gener, der muliggør udnyttelse af laktose og protein og dermed muliggør vækst i mælk (MG1363 er oprindeligt dannet ved at kurere *L. lactis* NCDO712 for pLP712). Også i dette tilfælde blev der opnået en næsten fuldstændig omdannelse af plasminogen til plasmin, og der blev observeret en større nedbrydning af kasein.

Konklusionen på disse forsøg er, at Skc produceret i *L. lactis* kan stimulere proteolysen i ost. Skc kan enten produceres *in situ* af rekombinante starterkulturer eller kan produceres ved fermentering, hvorefter oprenset Skc kan sættes til mælken under osteproduktionen. Da Skc skal stimulere et zymogen, der allerede findes i mælken, er meget små mængder tilstrækkelige, således som det fremgår af Figur 9. Der er i projektet konstrueret og selekteret mutanter med højere Skc produktion end den her benyttede stamme, således at supernatanter kan fortyndes endnu mere.

Konklusion

Projektet har været opdelt i faser med følgende mål:

- 1: Reportersystemer og screeningsassays udviklet. Plasmider til reguleret coekspression af sekretionsgener og gener for proteiner, der ønskes udskilt, udvalgt og testet.
- 2: Udvalgte *Lactococcus* gener med sandsynlig betydning for sekretionsprocessen identificeret og klonet.
- 3: Udvalgte heterologe gener med potentiale for at indvirke på sekretionsprocessen i *Lactococcus* identificeret og klonet.
- 4: DNA-sekvensen af klonede gener bestemt.
- 5: Konstruktion af stammer med reguleret ekspression af udvalgte sekretionsgener.

- 6: Andre faktorer, der har betydning for sekretion af proteiner, identificeret via tilfældig mutagenese og screening.
- 7: *Lactococcus* stammer med forbedrede evner til proteinsekretion konstrueret.
- 8: Optimerede *Lactococcus* sekretions-stammer afprøvet til produktion og udskillelse af rekombinante modelproteiner med eventuel betydning for mejeriprocesser eller -produkter.

Fase 1 til 5 er gennemført med succes. Fase 6 er kun delvist gennemført, idet der faktisk blev identificeret flere stammer med forbedret proteinudskillelse, men da det var nødvendigt at anvende kemisk mutagenese for at opnå disse stammer, har det været vanskeligt efterfølgende at identificere de ansvarlige mutationer. Det er dog lykkedes at indkredse mutationerne i PSM565/PRA366 til at berøre gener med betydning for glukosesult.

En fordel ved kemiske mutagenese fremfor genetiske mutagenese-teknikker er at de opnåede mutanter ikke er rekombinante. Mutanterne har desuden vist sig at være stabile. Mutanten PSM565 er blevet kombineret med en deletion af *htrA*. PSM565 Δ *htrA* er på nuværende tidspunkt sandsynligvis den optimale stamme til udskillelse af mange gener. Dermed er målet for fase 7 også nået.

Forsøgene, hvor Skc tilsættes til ostemælk, eller alternativt en Skc-producerende stamme anvendes som starterkultur viser, at Skc kan anvendes i de tilfælde, hvor der ønskes en øget proteolyse i ost. Ved at anvende Skc som primær reporter for proteinudskillelse ved screening er det opnået, at mindst ét protein med en mulig betydning for mejeriprocesser bliver udskilt i større mængder af de isolerede mutanter. Målet for fase 8 er således også nået.

Begge de anvendte strategier for at opnå bedre udskillelse, hhv. design af mutanter og tilfældig mutagenese og screening, viste sig dog problematiske. I praksis er det svært at forudsige, hvilke begrænsninger, der eksisterer for udskillelse, og dermed er det også vanskeligt at designe mutanter. Den kemisk mutagenese resulterede i anvendelige mutanter, men det har kun delvist været muligt at karakterisere mutationerne.

Projektet har været med til at identificere nogle af de faktorer, der begrænser proteinudskillelse, og der er i projektet konstrueret mutanter med højere proteinudskillelse. Desuden er der i projektet konstrueret en række genetiske værktøjer, der kan komme forskning i mælkesyrebakterier til gavn fremover. Projektets videnskabelige betydning vil blive dokumenteret ved at resultater fra projektet vil indgå i 3-4 videnskabelige artikler.

Publikationer

Poster ved Eurolab conference, July 2001, University College, Cork, Ireland:

- Peter Ravn, Lars Bredmose, Søren M. Madsen, Astrid Vrang, Mads G. Johnsen, José Arnau & Hans Israelsen. 2001. Development of a heterologous protein expression system for use in *Lactococcus lactis*.

Tre postere ved Seventh symposium on lactic acid bacteria, September 2002, Egmond aan Zee, The Netherlands:

- Lars Bredmose, Søren M. Madsen, Astrid Vrang, Peter Ravn, Jacob Glenting & Hans Israelsen. 2002. Commercial production of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*.

- Sebastien Nouaille, Philippe Langella, Jacqueline Commissaire, Peter Ravn, Alexander Bolotin, Alexandra Gruss, & Yves Le Loir. 2002. Up- and down-secretion mutants in *Lactococcus lactis*.
- Peter Ravn, José Arnau, Søren M. Madsen, Astrid Vrang & Hans Israelsen. 2002. Molecular characterization and engineering of signal peptide SP310 from *Lactococcus lactis*.

Poster ved 2nd international conference on recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic host cells: a comparative view on host physiology, November 2002, Cernobbio, Italy:

- Lars Bredmose, Søren M. Madsen, Astrid Vrang, Peter Ravn, Jacob Glenting & Hans Israelsen. 2002. Commercial production of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*.

Publicerede artikler:

- Peter Ravn, Jose Arnau, Søren M. Madsen, Astrid Vrang & Hans Israelsen. 2003. Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiol.* **149**:2193-2201.

Artikler under udarbejdelse og submittede artikler:

- Sebastien Nouaille, Philippe Langella, Jacqueline Commissaire, Jean J. Gratadoux, Peter Ravn, Alexander Bolotin, Alexandra Gruss & Yves Le Loir. 2003. Influence of Lipoteichoic acid D-Alanylation on protein secretion in *Lactococcus lactis* revealed by random mutagenesis. Submitted til *Applied Environmental Microbiology*.
- Vivek K. Upadhyay, Maria J. Sousa, Peter Ravn, Hans Israelsen, Alan L. Kelly, Paul L.H. McSweeney. 2003. Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese. Submitted til *International Dairy Journal*.
- Vivek K. Upadhyay, Peter Ravn, Hans Israelsen, Maria J. Sousa, Alan L. Kelly, Paul L.H. McSweeney. 2003. Acceleration of proteolysis during the ripening of Cheddar-type cheese made using a streptokinase-producing *Lactococcus* strain. Submitted til *Journal of Dairy Research*.

Forskeruddannelse og gæsteforskere

Projektmedarbejder Peter Ravn, civilingeniør, har siden 1/7-2001 været indskrevet som Ph.d.-studerende ved BioCentrum-DTU med lektor Jan Martinussen som vejleder. Studiets titel er ”Proteinsekretion fra Mælkesyrebakterier”. Studiet forventes afsluttet 31/12-2003.

Ph. d. studerende Sebastien Nouaille fra INRA i Jouy en Josas i Frankrig har i perioden fra 1/10-2001 til 31/12-2001 opholdt sig på Bioteknologisk Institut, og har bidraget med resultater og molekylærbiologiske teknikker til projektet. Sebastien Nouaille fik tildelt Ph.d. graden i Juni 2003 for studiet ”Facteurs d’hotes influencent la secretion de proteines heterologous chez *Lactococcus lactis*”.

Samarbejdsrelationer

Der er under projektet opbygget et samarbejde med Philippe Langellas forskningsgruppe ved INRA i Jouy en Josas i Frankrig. Samarbejdet har ført til en frugtbar udveksling af idéer og teknikker og har bl.a. medført den ovenfor nævnte udstationering af S. Nouaille ved Bioteknologisk Institut.

Der er også under projektet opbygget et samarbejde med Paul McSweeneys forskningsgruppe ved University College Cork i Irland, hvor effekten af heterologt produceret plasminogenaktivator, Skc, på proteolyse i ost er studeret.

Praktisk og videnskabelig betydning

- Projektet har bidraget til forståelsen af proteinudskillelse i *L. lactis*
- Der er i projektet konstrueret og isoleret mælkesyrebakteriestammer, der er velegnede til produktion af proteiner.
- Der er udviklet metoder, der kan anvendes videnskabeligt samt til isolering af starterkulturer med større evne til proteinudskillelse.
- Det er vist, at det er muligt at producere proteinet Skc i kommercielt anvendelige mængder. Dette protein kan øge proteolysen i ost.

Relationer til andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Projektet har bidraget generelt til forståelsen af mælkesyrebakteriers genetik og fysiologi og har betydning for andre samarbejdsprojekter, hvor der arbejdes med mælkesyrebakteriers genetik og fysiologi. Der henvises til FØTEK-projekter under henholdsvis M. Kilstrup og P. Ruhdal Jensen på Danmarks Tekniske Universitet.

