

# Afslutningsrapport

Fysiologisk-genetisk karakterisering af varmechok i *Lactococcus*

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-16

*Maj 1998*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## Afslutningsrapport for FØTEK-samarbejdsprojektet:

### Fysiologisk-genetisk karakterisering af varmechok i *Lactococcus*.

#### Medarbejdere:

Lektor, Mejeriingeniør Finn K. Vogensen (Projektleder) Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet (MLI), Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (KVL), Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C. Tlf. 3528 3211, Fax. 3528 3231. Email [fkv@biobase.dk](mailto:fkv@biobase.dk)

Professor, Lic. Scient. Karin Hammer, Institut for Mikrobiologi (IfM), Bygning 301, Danmarks Tekniske Universitet (DTU), 2800 Lyngby. Tlf. 4525 2496, Fax. 4588 2660, Email [kh@im.dtu.dk](mailto:kh@im.dtu.dk)

Lektor, Cand. Scient. Ph.D. Mogens Kilstrup; IfM/DTU, Tlf. 4525 2498, Fax. 4528 2660, Email [mk@im.dtu.dk](mailto:mk@im.dtu.dk) (Ansæt som forskningsadjunkt i perioden 1.11.93-31.5.94, tilknyttet projektet siden 1.6.94)

Forskningslektor, Ph.D. José Arnau (MLI/KVL): (Ansæt i perioden 15.12.93-31.3.95)

Forskningsadjunkt, Cand. Scient. Ph.D. Kim. I. Sørensen (IfM/DTU): (ansat i perioden 12.9.94-28.2.97)

Forskningslektor, Cand. Polyt. Ph.D. Hanne Ingmer (MLI/KVL), Tlf. 3528 3348, Fax. 3528 3231, Email [ingmer@biobase.dk](mailto:ingmer@biobase.dk) (ansat fra 1.9.95)

Forskningsadjunkt Cand. Hort. Ph.D. Birgit Koch (MLI/KVL): ansat på afbindingsmidler på projektet (ca. 1.10.95-31.1.97)

#### Forord:

Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets ForskningsFond, Strukturdirektoratet, Erhvervsfremmestyrelsen og Undervisningsministeriet for økonomisk støtte til projektet. Vi vil også takke Styregruppen og Mejeriforeningen for den udmærkede opbakning og de gode diskussioner, der har været under projektførelsen. Endelig vil vi takke Susanne Jakobsen, Institut for Biokemi og Ernæring, DTU, for bestemmelse af N-terminale aminosyresekvenser på en række proteiner.

## Resumé (dansk):

Stress situationer for starterkulturen indgår i de fleste produktionsmetoder for fermenterede mejeriprodukter. Gennem dette projekt er der opnået ny vigtig molekylær viden om hvorledes *Lactococcus* tilpasser sig til pludselige ændringer i temperatur og saltprocent, der svarer til dem, der finder sted under ostningsprocessens eftervarmning og under saltning.

Det blev vist at *Lactococcus* under tilpasningen øger syntesen af stress specifikke sæt af proteiner, hvoraf en stor del er de samme for forskellige stress situationer, dvs. de er generelle stress proteiner. Forskellige *Lactococcus* stammer overudtrykte generelt de samme specifikke sæt af proteiner under stress.

Der er blevet identificeret nye gener og genprodukter, der induceres under varmekok og saltkok, og der blev konstrueret mutanter i nogle af dem for at afklare deres funktion i cellen under stress og under normal vækst. Generne for tre mulige protease genkendelsesenheder, *clpB*, *clpC* og *clpE*, blev identificeret, og en mulig funktion af ClpE i nedbrydningen af misdannede proteiner i cellen under stress blev indikeret. En operon, *ftsAZ-orfXYZ*, muligvis involveret i celledeling blev fundet og det blev vist at en mutant i et af generne, *orfX*, havde ændret cellemorfologi. Det blev også vist at funktionelle DnaK og DnaJ proteiner var nødvendig for vækst ved høj temperatur, samt at DnaK muligvis har en funktion i reguleringen af varmekok responset i *Lactococcus*.

Endelig blev udviklet forbedrede metoder til fysiologiske studier i *Lactococcus*. Der blev udviklet metoder til isolering af RNA, til pulsmærkning af proteiner med <sup>35</sup>S-methionin, samt til 2 dimensional separering af proteiner.

## English Summary

Stress situations are common for the starter cultures during the manufacture of fermented milk products. This project has developed new important molecular information about how *Lactococcus* adapt to sudden changes in temperature and salt content, similar to conditions found during the cooking and salting process in cheese production.

It was shown that *Lactococcus* during the adaptation increases the synthesis of stress specific sets of proteins, the majority of which were induced under both stress conditions, e.g. they were general stress proteins. Also, different strains of *Lactococcus* induced the same sets of proteins during stress.

New genes and gene products induced by heat and salt shock were identified, and in some of them mutants were constructed to identify their function in the cell during stress and during normal growth. The genes for three putative protease recognition subunits, *clpB*, *clpC*, and *clpE*, were identified, and a putative function of ClpE in degradation of denatured proteins in the cell was suggested. An operon, *ftsAZ-orfXYZ*, possibly involved in cell division was found, and a mutant in *orfX* was shown to be defective in cell division. It was also shown that functional DnaJ and DnaK proteins are necessary for growth at high temperatures, and that DnaK may have a function in regulation of the heat shock response in *Lactococcus*.

Finally, improved methods for the study of cell physiology in *Lactococcus* were developed, including improved RNA isolation methods, improved pulse-labeling of proteins with <sup>35</sup>S-methionin and improved two-dimensional separation of proteins.

## Formål:

Projektets formål var at få øget molekylær forståelse for hvorledes stress situationer, specielt varme- og saltchok, påvirker fysiologi og metabolisme i *Lactococcus*. Der blev valgt en fysiologisk-genetisk indgangsvinkel til at undersøge hvilke gener og genprodukter, der har forøget udtryk under stress. Det skulle analyseres, hvorledes mutationer i udvalgte gener påvirkede vækst og overlevelse af *Lactococcus*.

## Baggrund:

*Lactococcus lactis* er den vigtigste bakterieart, der anvendes i starterkulturer til osteproduktion. *L. lactis* består af to underarter *L. lactis* subsp. *lactis* (*L. lactis*) og *L. lactis* subsp. *cremoris* (*L. cremoris*), der bl.a. adskiller sig fra hinanden ved deres forskellige følsomhed over for varme og salt. Under produktionsprocessen udsættes starterkulturen for en række stress betingelser. Det drejer sig bl.a. om eftervarmning, syring, og saltning, men også ompodning og mangel på næringsstoffer kommer på tale. Ved projektets start var det molekylære kendskab til hvorledes stress påvirker starterkulturen meget begrænset. Tre forskningsgrupper havde i tre forskellige *Lactococcus* stammer isoleret gen operoner induceret under varmechok, nemlig *dnaK* operonen fra *L. cremoris* MG1363 (Eaton *et al.*, 1993), bestående af *hrcA*, *grpE* og *dnaK* generne, *groESL* operonen fra *L. lactis* CC9 (Kim & Batt, 1993), bestående af *groES* og *groEL* generne, samt *dnaJ* genet fra *L. lactis* NIZO R5 (van Asseldonk *et al.*, 1993). Der var meget begrænsede fysiologiske data på hvorledes *Lactococcus* tilpasser sig de stresspåvirkninger, som de udsættes for under produktionsprocessen. Imidlertid havde man gennem næsten 15 år studeret, hvorledes *Escherichia coli* reagerede på stress, og relativt nyligt var man begyndt at undersøge *Bacillus subtilis*' reaktionsmønster. Det var således klart at reguleringen af stress responset var meget forskellige i de to organismer. Ud fra en sekvens analogi til de regulatoriske elementer fra gener, der var klonet fra *Lactococcus*, ville man umiddelbart tro at *Bacillus* og *Lactococcus* ville have relativ ens regulering. Det var også klart, at i det mindste en del af generne var konserverede mellem meget forskellige organismer, et forhold der betød at det ville være muligt at anvende tidligere sekventerede gener fra andre organismer til at finde tilsvarende gener i *Lactococcus*.

## Resultater:

### Udvælgelse af forsøgsstammer og etablering af eksperimentelle stress betingelser.

Seks stammer af *Lactococcus* blev udvalgt til de indledende forsøg: *L. lactis* NCDO2118 og IL1403, *L. cremoris* MG1363, NCDO712, Wg2 og 3107. De blev valgt ud fra kriterier om at der blandt stammerne skulle være nogle fra hver underart, at der skulle være stammer, der anvendes i international forskning, at der skulle være både plasmidfrie og plasmidholdige stammer, samt at der skulle være mejeri-relevante stammer. De valgte stammer kunne vokse eksponentielt i det definerede SA substrat (Jensen og Hammer, 1993). Alle stammer undtagen NCDO2118 krævede methionin for at kunne vokse, men mængden af methionin kunne sænkes til 5 µg/ml uden at ændre på væksthastigheden. Dette var en forudsætning for at der kunne pulsmærkes med <sup>35</sup>S-Methionin med høj effektivitet.

*L. cremoris* MG1363 blev udvalgt til at definere de eksperimentelle stress betingelser for varmechok og saltchok. Ved normal væksttemperatur på 30°C vokser MG1363 med en generationstid på ca. 55 min. Ved en pludselig ændring til 42,5°C sker der først en kortvarig stigning i væksthastigheden over ca. 20 min (34 min. generationstid) efterfulgt af et efterfølgende fald i væksthastigheden (85 min. generationstid). Tilsvarende forsøg ved 44°C gav samme transiente forøgelse af væksthastigheden, men væksten gik derefter næsten i stå. På baggrund af disse resultater, blev det besluttet at anvende 43°C som model for varmechok. Ved tilsætning af salt (NaCl) til eksponentielt voksende kulturer skete der et momentant fald i væksthastigheden. Generationstiderne med NaCl steg til 100 min (2 %), 140 min (2,5 %), 220 min (3 %), >500 min (3,5 %) og total væksthæmning ved 4 % NaCl. Det blev besluttet at anvende 2,5 % NaCl som model for saltchok. Typiske vækstkurver for MG1363 er publiceret i Kilstrup *et al.*, (1997).

## Undersøgelse af genekspression ved 2-dimensional separation af puls mærkede proteiner.

Der blev implementeret en metode til pulsmærkning af proteiner i *Lactococcus* med  $^{35}\text{S}$ -methionin med efterfølgende separation i 2 dimensioner efter isoelektrisk punkt og molvægt (Kilstrup *et al.*, 1997). Ved anvendelse af denne metode er det muligt at måle ændringer i protein syntesehastigheder, som ændringer af den mængde radioaktivitet der findes i de enkelte protein pletter. Dette var essentiel ikke bare for varmechok projektet, men det har vist sig at være et overordentlig nyttigt redskab for en række fysiologiske projekter med *Lactococcus*.

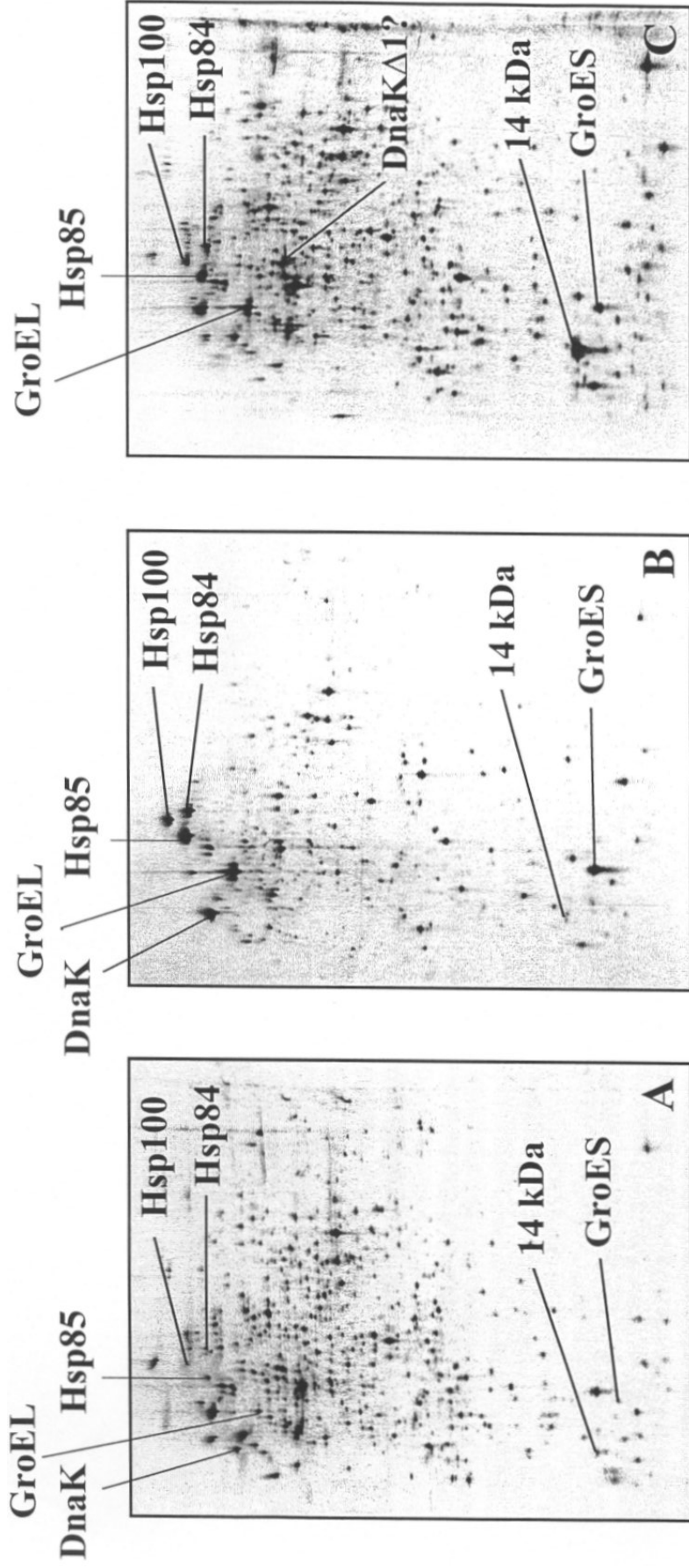
Fem af stammerne, NCDO2118, IL1403, NCDO712, MG1363, samt 3107, er blevet undersøgt for ændringer i syntesehastighed under varme- og saltchok. Resultaterne viste, at det samme overordnede billede for samme stress situation, dvs. samme proteiner blev induceret i alle stammer, men der var dog variationer i de inducerede proteinernes placering på gelen, hvilket betyder, at der må være små forskelle i de enkelte gener mellem stammerne. Samlet antydede induktionsmønsteret, at forskellige *Lactococcus* stammer reagerer på samme måde på en given stress tilstand. På den baggrund blev det besluttet at anvende den meget anvendte plasmidfri model stamme *L. cremoris* MG1363 i det efterfølgende arbejde.

Tabel 1: Proteiner induceret af varme- og/eller saltchok i *L. cremoris* MG1363

Betegnelse for protein	Identificeret protein	PI	Molvægt i kDa	Induceres under varmechok	Induceres under saltchok
Hsp9		5.3	~8.5	+	-
Hsp11	GroES	4.7	~11	+++++	+
Hsp14		4.5	14	+	+
Hsp15		5.5	15	++	-
Hsp17		4.5	17	+	+
Hsp18		5.3	18	+	-
Hsp23		4.9	23	+	+
Hsp25		5.4	25	++	+
Hsp26		4.3	26	++	+
Hsp39		5.7	39	+	-
Hsp42		5.7	42	+	-
Hsp48			48	+	+
Hsp60	GroEL	4.7	60	++++	+
Hsp70	DnaK	4.4	70	++++	+
Hsp84	ClpB	5.1	84	++	+
Hsp85	ClpE	4.9	85	++++	+
Hsp100	ClpB	5.0	100	+++	-
Ssp21		4.5	21	+	++++

Hsp=heat shock protein, Ssp=Salt shock protein. Antallet af '+'er angiver induktionen styrke

I tabel 1 er givet en oversigt over de proteiner der bliver induceret i MG1363 under varme- og saltchok. Figur 1A og 1B viser billedet af repræsentative geler af MG1363 ved hhv. 30°C og 5-15 min efter et varmechok på 43°C. I alt 18 proteiner er sikkert fundet at være induceret enten af varmechok eller af saltchok. Det ses af tabellens sidste to kolonner at størsteparten af de inducerede (12) induceres både af varme og salt, mens 6 kun induceres af varme. Førstnævnte proteiner er derfor generelle stress proteiner, mens de resterende 6 kan være specifikke for varmechok. Generelt var induktionen mindre ved saltchok end ved varmechok, dog undtaget et protein benævnt Ssp21, der induceres meget kraftigere under saltchok end under varmechok.



**Figur 1:** Todimensional separering af proteiner puls mærket med  $^{35}\text{S}$ -methionin i 10 minutter.  
**A:** syntetiseret af MGI363 ved 30°C.  
**B:** syntetiseret af MGI363 5-15 min efter varme chok til 43°C.  
**C:** Syntetiseret af BK6 (*dnaKΔ1-erm*) ved 30 °C.

Som nævnt ovenfor er mange stress inducerede proteiner meget konserverede i deres aminosyre sekvens mellem forskellige bakterieslægter. Dette betød at det var muligt at anvende 2 metoder til at identificere nogle af de kraftigt dannede proteiner, nemlig N-terminal aminosyresekventering og Western Blot teknik med antistof rettet mod specifikke stress proteiner fra *B. subtilis*, *E. coli* eller *Saccharomyces cerevisiae*. Ved hjælp af disse 2 metoder var det muligt at identificere en del af de stress inducerede proteiner på gelerne (Tabel 1, kolonne 2), samt også 3 proteiner fra glycolysen der udtrykkes i meget høj mængde under alle forhold (Glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (2 protein pletter), Pyruvat kinase og 3-Fosforglycerat kinase). Et af de proteiner der havde meget afvigende placering på 2-D gelerne mellem *L. lactis* og *L. cremoris* stammerne var GroEL.

Det var bemærkelsesværdigt at GroES, GroEL og DnaK proteinerne blev induceret både af salt og varme (Kilstrup *et al.*, 1997). Karakteristisk for disse proteiner er at de kodende gener sidder i operons, der alle har et såkaldt CIRCE regulatorisk element, som også findes foran de tilsvarende operons i *B. subtilis* (Hecker *et al.*, 1996). I *B. subtilis* induceres CIRCE operons kun af varmekok, men ikke af saltkok (Valker *et al.*, 1994).

Der blev set 2 reaktionsmønstre for varmekok induktionen blandt de inducerede proteiner. En gruppe på syv proteiner (DnaK, GroEL, GroES, Hsp26, ClpB (2 proteiner) og ClpE) induceredes meget hurtigt (inden for 10 min), hvorefter syntese hastigheden igen faldt. De resterende proteiner induceres langsommere (i løbet af 25 minutter) og for de fleste falder syntese hastigheden ikke under forsøgsperioden. Dette antyder at der er flere varmekok regulatoriske systemer i *Lactococcus*.

### **Undersøgelse af genekspression ved mRNA analyse.**

Ved projektets start var der ikke nogen tilfredsstillende metode til at oprense RNA fra *Lactococcus*. Derfor blev en metode udviklet som gav godt udbytte af ikke-nedbrudt RNA (Arnau *et al.* 1996). Denne metode blev i første omgang brugt til at følge transskriptionen vha. Northern Blot med allerede tilgængelige stress-gener som probe. *hrcA=orf1*, *grpE*, og *dnaK* generne (*dnaK* operonen) fra MG1363 fik vi fra Eaton *et al.* (1993), *ftsH=hflB* genet fra MG1363 blev modtaget fra Nilsson *et al.* (1994), mens *dnaJ* genet blev klonet fra MG1363 (se nedenfor) og *groEL* blev amplificeret ved PCR fra MG1363 kromosomalt DNA med primere konstrueret ud fra den publicerede *L. lactis* CC9 sekvens (Kim & Batt, 1993). Resultaterne viste samme transskriptionsforløb under varmekok for *dnaK* operonen, *dnaJ* og *groEL*. Ved 30° C sker en svag transskription, mens der 10-15 min efter varmekok er voldsom stigning i mRNA niveauet, efterfulgt af et fald efter 20 min. Dette forløb stemmer overens med de resultater der er set for proteinsyntesen af DnaK og GroEL under varmekok (Kilstrup *et al.*, 1997). Ovennævnte gener har alle det såkaldte CIRCE element oven for generne. Transskriptionsforløbet for *ftsH*, der koder for en membranbundet ATP-afhængig protease, er anderledes. Som ovenfor ses en kraftig stigning i mRNA niveauet 10-15 minutter efter varmekok, men derefter sker der ikke noget fald. Dette antyder også at varmekok responset bliver reguleret af flere forskellige veje (mindst 2). Der understøttes af at der ikke findes et CIRCE element foran *ftsH* genet (Nilsson *et al.*, 1994)

Der blev også anvendt prober fremstillet ud fra RNA isoleret fra varmekok behandlede celler. Dette RNA blev oversat tilbage til det komplementære DNA (cDNA) og efterfølgende blev det cDNA, der stammede fra gener der bliver udtrykt under normal vækst (30°C) bundet med overskud af RNA isoleret fra kulturer dyrket ved 30°C (Arnau & Sørensen, 1997). Ved anvendelse af sådanne cDNA subtraktionsprober i Northern Blot analyser blev der påvist specifikke mRNA i RNA isoleret varmekok behandlede kulturer, som ikke fandtes i RNA fra kulturer dyrket ved 30°C. Disse resultater antydede, at sådanne prober ville være anvendelige i en screening af genbiblioteker for tilstedeværelse af varmekok inducerede gener, men også kloner indeholdende ribosomal RNA gener og vækstfase regulerede gener ville kunne forventes.

### **Konstruktion af genbiblioteker.**

En måde at finde stress inducerede gener fra *Lactococcus* er at lede i genomiske biblioteker (e.g. et sæt af tilfældige DNA stykker fra *Lactococcus* kromosomet, repræsentativ for hele genomet, og indsat i en vektor, *der* efterfølgende er transformeret ind i en passende vært) med hybridiseringsprober. Der er i forbindelse med projektet konstrueret flere genbiblioteker fra *L. cremoris* MG1363 i vektoren pBR322, indsat i *E. coli*. Bibliotekerne indeholder partielle *Sau3AI* fragmenter med en gennemsnitlig størrelse på ca. 4000 bp, så det kunne forventes at der ville være flere gener på samme kloner. Det blev vist at bibliotekerne var anvendelige til at finde stress inducerede gener, ved at dele af *dnaJ* genet fra MG1363 blev isoleret på to kloner i biblioteket, når *dnaJ* genet fra *L. lactis* NIZO R5 (van Asseldonk *et al.* 1993) blev anvendt som probe. En af disse kloner, pKS2, blev anvendt til Northern Blot analyserne beskrevet ovenfor. Under projektet fik vi også mulighed for at anvende et cosmid genbibliotek af MG1363, fremstillet af Peter Ruhdal Jensen (DTU).

### **Screening af stress inducerede gener fra gen biblioteker.**

Der blev fremstillet cDNA subtraktionsprober fra mRNA isoleret 3, 5 og 10 minutter efter varmechok. Disse prober blev efterfølgende brugt i en screening af de konstruerede pBR322 biblioteker. Der blev fundet i alt 10 kloner, som hybridiserede med proberne. Heraf viste 3 sig at indeholde det samme *Sau3AI* fragment, mens to af klonerne indeholdt flere fælles fragmenter (Arnau & Sørensen, 1997). Northern Blot analyse viste, at flere af klonerne så ud til at indeholde varmechok inducerede gener. De tre ens kloner, benævnt pJAK1, gener der koder for transposase gener fra IS-elementer. På pJAK2 klonen, der så ud til at være varmechok induceret, blev fundet en del af en operon hvis homologer i *E. coli* og *B. subtilis* har vist at være involveret i celledeling. Denne operon blev nøjere undersøgt (se nedenfor). pJAK3 klonen så også ud til at indeholde varmechok inducerede gener. Den indeholdt to *Sau3AI* fragmenter. På det ene blev fundet en del af et gen der havde homologi til et varmechok gen, *hsp86*, fra *Pseudomonas falciparum*. Det andet fragment indeholdt en del af et transposase gen. pJAK4 klonen indeholdt et gen med homologi til en *deoR*-lignende repressor, mens der på pJAK5 klonen blev fundet et gen med homologi til et alkalisk chok protein, *asp23*, fra *Staphylococcus aureus*. Klonerne pJAK6 og pJAK7 indeholdt flere fælles *Sau3AI* bånd. På pJAK7 klonen blev det vha. Northern Blot vist, at der et varmechok gen på et af fragmenterne (*pJAK6* ikke undersøgt). Et af fragmenterne indeholder en del af et gen, der har homologi til et cytochrom oxidase D gen, *cydB*, fra *E. coli*. Dette var overraskende da *der* er ikke er påvist cytochrom i *Lactococcus*. Dette gen sidder i en operon med *eydA* i *E. coli* og er et varmechok induceret gen. Genet bliver undersøgt yderligere i forbindelse med et biologi speciale på DTU. Ovenfor det *eydB*-lignende gen er et *eydA*-lignende gen fundet, hvilket antyder at *der* er den samme genorganisation som i *E. coli*.

Bibliotekerne er også blevet brugt til at screene efter en *ion* analog i *Lactococcus*, med et *ion* gen fra *B. subtilis* som probe (Riethdorf *et al.*, 1994). *Ion* proteinet er en ATP-afhængig protease, som i *E. coli* står for hovedparten af den intracellulære nedbrydning af varmedenatureret protein, der finder sted i celler efter varmechok. Det lykkedes ikke at finde *ion* genet fra *Lactococcus*. Tilsvarende blev cosmid biblioteket screenet med PCR produkter indeholdende interne fragmenter af de såkaldte *clp* protease genkendelsesenheder (se nedenfor), og det lykkedes at finde kloner indeholdende *clp* gener. Resultaterne viser de konstruerede bibliotekers anvendelighed til at isolere ønskede gener fra *Lactococcus*.

### **Karakterisering af stress inducerede gener, samt konstruktion og karakterisering af mutanter.**

En række varmechok inducerede gener fra MG1363 er blevet identificeret og DNA sekventeret i løbet af projektet. En del af disse er ikke tidligere identificerede gener i *Lactococcus*, mens andre er gener som tidligere er karakteriseret fra *L. lactis*, men ikke fra *L. cremoris* (*dnaJ* og *groESL*). Af hensyn til muligheden for at konstruere specifikke mutanter i *L. cremoris* MG1363, var det vigtigt at have rådighed over sekvenserne på generne fra samme underart. Alle mutanter er konstrueret som såkaldte "gene disruption" mutanter. Denne type mutanter har deletioner fra den C-terminale del af proteinet. Nedenfor beskrives de gener, der er blevet analyseret nærmere.



### clpB, clpC og clpE

Clp står for caseinolytisk protease og proteinerne er først beskrevet i *E. coli* og siden fundet i andre bakterier, men også i eukaryoter. De danner et kompleks, der består af to enheder, en substrat genkendelsesenhed samt en egentlig proteolytisk enhed kaldet ClpP, og de adskiller sig fra normale proteaser ved at de kræver ATP (energi) for aktivitet. Substrat genkendelsesenhederne har to meget konserverede ATP bindende domæner, hvis indbyrdes afstand anvendes til at klassificere dem som ClpA (ca. 5 aminosyrer), ClpB (ca. 125 aminosyrer) eller ClpC analoger (ca. 60 aminosyrer). Substrat genkendelses enhederne har ud over deltagelse i nedbrydning af denaturerede proteiner formentlig også en chaperone funktion, dvs. de forsøger at folde nydannede og denaturerede proteiner korrekt, og kun hvis dette ikke lykkes nedbrydes proteinerne. I løbet af projektforløbet blev det klart at flere af sådanne Clp proteiner er stress inducerede. Det blev derfor besluttet at søge efter *clp* lignende gener i *Lactococcus*.

#### *Kloning og sekvensanalyse:*

På baggrund af de konserverede ATP domæner konstrueredes primere der blev anvendt til PCR amplifikation på kromosomalt DNA af interne fragmenter af mulige *clp* gener i *L. cremoris* MG1363. PCR fragmenterne blev klonet. Efterfølgende DNA sekventering, viste at der var tre forskellige kloner (Ingmer *et al.*, sendt ind). Dette blev bekræftet ved DNA hybridisering til kromosomalt DNA i en Southern Blot analyse. Det er første gang, der er påvist tre forskellige *clp* gener i grampositive bakterier. Ud fra sekvens- og PCR-analyse af generne kunne det vises, at det ene mest lignede *clpB*, mens de to øvrige tilhører *clpC* gruppen, da afstanden mellem de 2 konserverede ATP-bindende domæner er ca. 60 aminosyrer (Ingmer *et al.*, sendt ind). De to sidste benævnes efterfølgende hhv. *clpC* og *clpE* og det strukturelle gen for begge disse er fuldstændigt sekventeret. *clpC* genet kan kode for et protein med 816 aminosyrer med en beregnet molvægt på 90 kDa. *clpE* genet er lokaliseret lige oven for genet for glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase genet (Cancilla *et al.*, 1995). Det kan kode for et protein på 748 aminosyrer med en beregnet størrelse på ca. 84 kDa. Det har en lidt kortere region foran det første ATP bindende domæne, hvilket også er fundet i et *clp* lignende gen fra *Lactobacillus sake* (Stentz *et al.* 1997), samt for et plasmidkodet *clp* lignende gen kaldet *clpL* fra *L. lactis* CNRZ270. Begge proteiner har stor homologi til ClpC proteiner fra andre grampositive bakterier (Ingmer *et al.*, sendt ind). Det sidste gen, *clpB*, er endnu ikke fuldstændig sekventeret.

#### *Konstruktion af clp mutanter og identifikation af genprodukter:*

Det amplificerede område dækkede det første konserverede ATP-bindende domæne i ClpB, ClpC og ClpE genkendelsesenhederne. Dette område blev anvendt til at lave mutanter i vildtypestammen MG1363. Ved konstruktion laves et kortere, og sandsynligvis inaktivt protein. Ved en analyse af mutanterne ved 2-D gelelektroforese så vi at *clpB* mutanten manglede to proteiner, benævnt Hsp100 og Hsp84 (se tabel 1), mens *clpE* mutanten manglede proteinet kaldet Hsp85. Disse proteiner havde også vist reaktion i Western Blot analyse med antistof mod Hsp104, der er en Clp analog fra *Saccharomyces cerevisiae*. Det har ved 2-dimensional gelelektroforese ikke været muligt at identificere et manglende protein i *clpC* mutanten.

#### *ClpB og ClpE induceres af forskellige stress påvirkninger:*

Med kendskabet til hvilke proteiner *clpB* og *clpE* koder for var det muligt ved 2-D gelelektroforese at undersøge under hvilke stress betingelser ClpB og ClpE induceres. Disse analyser viste at begge proteiner induceres af varme- og saltchok (tabel 1). ClpB induceres derudover af kuldechok (10°C) og ethanol tilsætning, mens ClpE ikke induceres under disse betingelser. Dette antyder *clpB* og *clpE* er under forskellig regulering.

#### *Northern blot analyse af clpC og clpE:*

Ved Northern blot analyse med en *clpC* specifik probe blev påvist to mRNA bånd på hhv. 2,5 kb og 1 kb, der blev induceret ca. 3-5 gange under varmechok. Dette tyder på at reguleringen af *clpC* er transskriptionel. Yderligere et svagt bånd på 3,5 kb blev også iagttaget. Størrelsen af 2,5 kb båndet svarer til det forventede, hvis *clpC* er monocistronisk. Ved en tilsvarende analyse med en specifik *clpE* probe, blev påvist tre mRNA bånd på hhv. ca. 3.8, 2.5 og 1.5 kb, der blev induceret ca. 15 gange under varmechok, hvilket også tyder på transkriptionel regulering. Det kraftige 3.8 kb bånd antyder at *clpE* kan sidde i en operon.

#### *Analyse af clp mutant fænotyper:*

De konstruerede mutanter blev undersøgt for ændret termotolerance, vækst ved forskellige temperaturer (10°C, 35°C, 37°C), følsomhed over for salt og ethanol. Der blev ikke iagttaget nogen forskel mellem vildtypestammen MG1363 og mutanterne i disse analyser. Dette kan skyldes at de enkelte Clp genkendelsesenheders funktion helt eller delvist kan overtages af de to øvrige.

I et tilfælde blev der set forskel mellem MG1363, *clpC* og *clpE* mutanterne. Det var ved vækst i tilstedeværelse af puromycin. Puromycin er et stof, der ligner tRNA, og som forårsager for tidlige termineringer af protein kæder under protein syntesen. Disse forkortede protein kæder er ofte ikke korrekt foldede og derfor udløser puromycin varmechok responset, bl.a. i *E. coli*. Specielt *clpE* mutanten har vist sig at være meget mere følsom end vildtype MG1363 overfor puromycin. Derimod er *clpC* og *clpB* mutanterne mindre følsomme end MG1363 overfor puromycin. Vi forestiller os, at hvis Clp proteiner er associeret med den formodede protease del (ClpP) kan der være en konkurrence mellem de forskellige Clp'er for binding til ClpP. Hvis kun den ClpE associerede protease kan nedbryde de puromycin denaturerede proteinkæder vil mutanter i dette gen være særligt sensitive overfor stoffet, mens mutanter i andre Clp'er (såsom ClpC og ClpB) vil give bedre adgang for ClpE til ClpP og dermed tillade en mere effektiv nedbrydning. Et interessant spørgsmål er hvorfor denaturering med varme ikke denaturerer proteiner, således at vi ser forskel mellem vores mutanter, mens vi ser forskel med puromycin.

#### *dnaK:*

DnaK, GrpE og DnaJ proteinerne indgår i *E. coli* i chaperone kompleks der hjælper med at folde nydannede og denaturerede proteiner korrekt. Derudover er de i *E. coli* direkte involveret i reguleringen af varmechok responset ved at styre nedbrydningen af en sigma-faktor,  $\sigma^{32}$ , der er nødvendig for at udtrykke varmechok responset. *dnaK* mutanter i *E. coli* er temperaturfølsomme og overudtrykker varmechok proteiner ved normalvæksttemperatur. I *B. subtilis* er det vist at varmechok responset er under kontrol af en repressor HrcA, der binder til et såkaldt CIRCE element og dermed represserer udtrykket af varmechok generne. *hcrA* genet sidder i operon med *grpE*, *dnaK* og *dnaJ* og styrer derudover også udtrykket af *groESL* operonen (se nedenfor). *B. subtilis* mutationer i *dnaK* påvirker kun væksten ved meget høje temperaturer, og varmechok proteinerne overudtrykkes ikke ved normal væksttemperatur.

#### *Konstruktion af dnaK mutanter i L. cremoris MG1363:*

*Lactococcus dnaK* operonen indeholder generne *orf1* (*hcrA*), *grpE* og *dnaK* i nævnte rækkefølge. Genet *orf1* koder for et protein med homologi til HrcA fra *B. subtilis* og er derfor sandsynligvis den tilsvarende repressor i *Lactococcus*. Foran *dnaK* operonen findes et CIRCE element. Operonen er tidligere blevet sekventeret fra *L. cremoris* MG1363 (Eaton *et al.*, 1993), og en klon indeholdende det meste af operonen har været stillet til rådighed af Dr. M. Gasson. Da *dnaK* sidder sidst i operonen, var det muligt at konstruere mutationer, der fjernede C-terminale dele af DnaK uden at påvirke gener nedenfor *dnaK* genet. Mutanter i *dnaK* blev konstrueret ved at krydse interne *dnaK* fragmenter, klonet i et *E. coli* plasmid med en erythromycin (*erm*) selektionsmarkør, ind på kromosomet af *L. cremoris* MG1363 (Koch *et al.* indsendt). Herved fremkom *dnaKΔ1-erm* mutanten, benævnt BK6, der manglede de sidste 174 aminosyrer, mens *dnaKΔ2-erm* mutanten, benævnt BK11, manglede de sidste 65 aminosyrer. BK6 mutanten forventedes at indeholde et inaktivt DnaK protein, da ca. halvdelen af et formodet

substratbindingsdomæne manglede. BK11 mutanten havde hele det formodede substratbindingsdomæne og dermed et muligt funktionelt DnaK protein. En tredje mutant, benævnt BK8, med *erm* indsat efter *dnaK* fungerede som kontrol.

#### *Analyse af dnaK mutant fænotyper:*

De tre mutanter, samt vildtypestammen MG1363 blev undersøgt i vækstforsøg. Undersøgelserne viste, at BK6 voksede med ca. halv væksthastighed ved temperaturerne 10°, 30°, 33°, og 35°C, men slet ikke ved 37°C, mens BK11 kun var svagt påvirket ved 37°C, hvor variabel kolonimorfologi blev iagttaget. I mikroskopet var vækstmorfologien af BK6 ændret, idet den voksede i lange kæder. BK6 var mere varmfølsom ved 53°C, og termotolerance opbygningen ved 40°C gik langsommere, mens der ikke blev set ændringer i saltfølsomhed. I alle disse forsøg afveg BK11 ikke signifikant fra kontrolstammerne MG1363 og BK8. Da BK6 mutanten blev undersøgt for proteinekspresion ved 30°C, viste 2-D gelerne forøget udtryk af en række varmechok proteiner, bl.a. GroEL og GroES var udtrykt kraftigt ved normal væksttemperatur (se Figur 1C). Det manglende Hsp70 protein på disse geler bekræftede identifikationen af Hsp70 som værende DnaK proteinet (se Tabel 1). Disse observationer er interessante i lyset af, at der i tilsvarende mutanter i *B. subtilis* ikke ses forhøjede udtryk af varmechok proteiner. Der kan være flere årsager til denne forskel. I *B. subtilis* er det vist, at chaperonekomplekset GroESL er ansvarlig for korrekt foldning af repressoren HrcA, således at det kan binde til CIRCE elementet og undertrykke overudtryk af varmechok. Under varmechok stiger mængden af denaturerede proteiner, og GroESL komplekset vil derfor ikke findes i tilstrækkelig mængde til at holde HrcA i korrekt form, hvorved der lukkes op for udtryk af varmechok gener, der er under kontrol af CIRCE elementet incl. *groESL* operonen. Når der igen er tilstrækkeligt GroESL til stede til at folde repressoren HrcA korrekt, vil der blive lukket ned for varmechok genernes ekspresion. Hvis repressoren HrcA i *Lactococcus* derimod foldes korrekt af DnaK-DnaJ-GrpE chaperonekomplekset, kan de fundne resultater forklares ved at BK6 ikke længere er i stand til at folde HrcA korrekt og dermed ses et forøget udtryk af varmechok proteinerne. Årsagen kan dog også være indirekte, idet manglen på et funktionelt DnaK protein kan føre til forhøjet mængde denaturet protein i cellen der skal foldes af GroESL chaperonekomplekset, da DnaK-DnaJ-GrpE komplekset formentlig ikke er funktionelt. Besvarelsen af DnaK's rolle i reguleringen af varmechok i *Lactococcus* vil indgå i det nye MFF/FØTEK-samarbejdsprojekt: "Varmechok i *Lactococcus*: reguleringsmekanismer og mutanter."

#### *dnaJ*:

I *B. subtilis* sidder *dnaJ* genet i *dnaK* operonen. I modsætning hertil og til de fleste andre grampositive bakterier undersøgt, sidder *dnaJ* genet i *Lactococcus* alene og foran genet findes et CIRCE element. *dnaJ* genet var tidligere sekventeret fra *L. lactis* NIZO R5. På grund af ønsket om at konstruere mutanter i *dnaJ* genet i MG1363, blev genet fundet i pBR322 genbiblioteket (se ovenfor) og sekventeret.

Et internt *HindIII* fragment hhv. et internt *SspI* fragment blev indsat i en *E. coli* vektor indeholdende et erythromycin selektionsmarkør anvendt til at fremstille mutanterne KIS1001 og KIS1004. Begge mutanter viste sig at være varmesensitive, idet de voksede dårligere ved 35°C og 37°C end MG1363. Ligeledes blev iagttaget ændret cellemorfologi i mutanterne, idet *dnaJ*-mutanterne havde samme tendens til, at danne længere kæder som blev set i *dnaK*. Yderligere undersøgelser af *dnaJ* mutanter er planlagt i det fremtidige MFF samarbejdsprojekt.

### ftsAZ-orfXYZ -operonen:

Med de subtraktive cDNA hybridiseringsprober blev et gen identificeret, der koder for et protein med homologi et celledelingsprotein fra *E. coli*, kaldet *ftsZ* (se ovenfor). Indledende Northern Blot undersøgelser antydede at dette gen kunne være reguleret af varmechok. De flankerende områder blev sekventeret og afslørede en mulig 4.5 kb celledelingsoperon, bestående af mindst 5 gener, *ftsA*, *ftsZ*, *orjX*, *orjY*, og *orjZ*. Foran *ftsA* blev fundet en typisk laktokokpromoter med et muligt regulatorisk omvendt repeat, der overlapper promotoren.

Der blev forsøgt at fremstille mutanter i MG1363, der var ødelagt i *ftsZ*, som beskrevet ovenfor. Dette viste sig ikke at være muligt. Derimod kunne en mutant, KIS1003, der var ødelagt i *orjX* konstrueres. Denne mutant var varmfølsom, og voksede i lange pølser uden tydelig adskillelse mellem de enkelte celler. Dette tyder på af et eller flere af produkterne fra generne *orjX*, *orjY* eller *orjZ* deltager i den afsnøring af enkeltceller, der finder sted under celledelingen.

### **Konklusion:**

Projektet har ført til forbedret molekylær forståelse af varmechok responset i *Lactococcus lactis*. Det blev vist at responset mellem forskellige stammer ligner hinanden, uanset forskelle i stammerne mht. væksttemperatur. Det blev også vist at de fleste varmechok inducerede proteiner var generelle stress proteiner, idet de både blev induceret af varme- og saltchok. En række varmechok proteiner er blevet identificeret på 2-D geler. Resultaterne tyder på at der er flere reguleringsveje for varmechok responset. Der er identificeret flere nye varmechok inducerede gener, bl.a. tre der koder for såkaldte Clp genkendelsesenheder, ClpB, ClpC, og ClpE, der formodes at være involveret i nedbrydning af ikke korrekt foldede proteiner. Alle tre er varmechok induceret. Mutant analyse af disse gener antyder, at ClpE medvirker til nedbrydningen af unormale proteiner i cellen, men ellers sås ingen tydelige mutant fænotyper. Dette kan skyldes at de tre Clp genkendelsesenheder kan helt eller delvist kan erstatte hinandens funktion eller at andre genprodukter kan overtage funktionerne. Dette vil blive yderligere undersøgt i det fremtidige samarbejdsprojekt.

Ved subtraktiv RNA hybridiserings teknik er der blevet identificeret en mulig cytochrom D operon, *cydAB*, samt en formodet celledelingsoperon bestående af fem gener, *ftsAZ-orjXYZ*. Begge kan muligvis være varmechok induceret. En mutant i *orjX* underbyggede, at operonen kunne være involveret i celledeling, idet cellerne voksede i lange pølser uden tydelig adskillelse mellem cellerne.

Der blev konstrueret mutanter både i *dnaJ* og *dnaK* som voksede dårligere ved høj temperatur. De havde også ændret cellemorfologi, idet de havde forøget kædelængde. I en af de konstruerede *dnaK* mutanter sås forhøjet udtryk af varmechok proteiner, der indikerer at DnaK i *Lactococcus* har en rolle i reguleringen af varmechok responset, et forhold der nøjere skal studeres i det kommende MFF samarbejdsprojekt.

Endelig blev *groESL* operonen og *dnaJ* sekventeret fra *L. cremoris* MG1363. Disse gener var tidligere blevet sekventeret fra *L. lactis* stammer. Dette var forudsætningen for de konstruerede *dnaJ* mutanter og for fremtidige mutanter i det nye MFF samarbejdsprojekt i de nævnte gener. Projektet har derudover medført udvikling af en række forbedrede metoder der har og vil finde anvendelse i fysiologiske studier i *Lactococcus*. En forbedret RNA isoleringsprocedure er blevet udviklet. Desuden er en reproducérbar metode til pulsmærkning af proteiner blevet udviklet, således at forskelle i protein syntesehastigheder kan bestemmes.

Projektet har betydet, at vi nu råder over en enestående samling af varmechok gener, alle fra samme stamme *L. cremoris* MG1363. Dette er betydningsfuldt for det kommende MFF samarbejdsprojekt.

### Referencer i teksten:

- Cancilla, M.R., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1995): *Lactococcus lactis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gap*: further evidence for strongly biased codon usage in glycolytic pathway genes. *Microbiology* 111: 1027-1036
- Eaton T., Shearman C., Gasson, M. (1993): Cloning and sequence analysis of the *dnaK* gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Gen. Microbiol* 139: 3253-3264
- Hecker, M., Schumann, W., Valker, D. (1996): Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19: 417-428
- Jensen, P.R., Hammer, K. (1993): Minimal requirement for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4363-4366
- Kim, S.G., Bau, C.A. (1993): Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *groESL* operon. *Gene* 127: 121-126.
- Nilsson, D., Lauridsen, A.A., Tomoyasu, T., Ogura, T. (1994): A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product. *Microbiology* 140: 2601-2610
- Riethdorf, S., Valker, D., Gerth, D., Winkler, A., Engelmann, S., Hecker, M. (1994): Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* *lon* gene. *J. Bacteriol.* 176: 6518-6527
- Stentz, R., Lauret, R., Ehrlich, S.D., Morel-Deville, F., Zagorec, M. (1997): Molecular cloning and analysis of the *ptsHI* operon in *Lactobacillus sake*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2111-2116
- van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., de V\_g, W.M., Simons, G. (1993): Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* *dnaJ* gene. *J. Bacteriol.* 175: 1637-1644
- Volker, D., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Volker, A., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M. (1994): Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140: J41-752

### Publikationer i tidsskrifter med referee:

- Arnau, J., Sørensen KI., Appel, KF., Vogensen, F.K., and Hammer, K: Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology*, 1996, 142, 1685-1691
- Arnau, J. Sørensen KI.: The isolation of novel heat shock genes in *Lactococcus lactis* using RNA subtractive hybridization. *Gene*, 1997, 188, 229-234
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Vogensen, F.K., and Hammer, K: Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 1826-1837

### Publikationer i tidsskrifter uden referee:

- Vogensen, F.K., Ingmer, H., Kilstrup, M., Koch, R., Sørensen, KI., Hammer, K. Når mælkesyrebakterier får stress! Mælkeritidende, 1996, 109, 389-391
- Vogensen, F.K., Ingmer, H., Kilstrup, M., Sørensen, KI., Koch, B., Arnau, J. Hammer, K. Syrevækkerens tilstand ved eftervarmning. Mælkeritidende, 1998, 111, 76-78

### Manuskripter indsendt til publikation:

- Ingmer, H., Kilstrup, M., Hammer, K., Vogensen, F.K: Multiple *clp* genes in *Lactococcus lactis*: Characterization of two members of the ClpC family. Sendt til *Mol. Microbiol.*
- Koch, B., Kilstrup, M., Vogensen, F.K, Hammer, K: Induced levels of heat shock proteins in a *dnaK* mutant of *Lactococcus lactis*. Sendt til *J. Bacteriol.*

### Andre medarbejdere:

- Laborant Kristina Brandborg Jensen, DTU  
Laborant Karen Appel, KVL/DTU  
Laborant Charlotte Nyholm, KVL  
Laborant Tim Evison, KVL (afbindingsmidler)

