

Mastergrads oppg. 2012

Heterolog proteinsekresjon i probiotiske lactobacilli ved bruk av signal peptider fra *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Heterologous protein secretion in probiotic lactobacilli using signal peptides from *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Kristina Maudal

Ust



UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
Masteroppgave 60 stp. 2012



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Instituttet for Kjemi, Bioteknologi og Matforsk ved Universitetet for Miljø og Biovitenskap i Ås, med Professor Vincent Eijsink og Ph. D. Geir Mathiesen som veiledere.

Jeg vil gjerne få takke alle som har hjulpet meg i arbeidet med denne oppgaven;

Først og fremst vil jeg takke Ph.D. Geir Mathiesen for hans gode råd i forhold til skriving av oppgaven, og for hans inspirerende, motiverende og entusiastisk veiledning i forbindelse med det praktiske arbeidet. Videre vil jeg takke Professor Vincent Eijsink for hans inkluderende og gode lederegenskaper i gruppen under tiden jeg var der, og for hans råd og optimisme i forbindelse med arbeidet med denne oppgaven. Lasse Fredriksen fortjener også en takk for sin tilstedeværelse på laboratoriet, og for sin smittende iver og konstante åpenhet for spørsmål og faglige diskusjoner. Videre takker jeg Ingrid Lea Karlskås for hjelp til planleggingen av PKN-analysen. Takk til resten av gruppen PEP, inkludert mine med-studenter Rannei, Stine, Silje og Cathrine for hjelpsomhet, hyggelige lunsjer og et godt arbeidsmiljø.

Sist, men ikke minst vil jeg takke Jarle for hans støtte, inspirasjon og tro på meg som ”forsker”. Og takk til Jonatan og Maria for tålmodighet og forståelse for at denne oppgaven til tider har krevd mye av min oppmerksomhet.

Ås, januar, 2012

Kristina Maudal

Sammendrag

Dette studiet er en del av et større prosjekt hvor det langsiktige målet er å utvikle orale vaksiner basert på lactobacilli, for eksempel vaksiner mot kreft eller tuberkulose. Lactobacilli er interessante kandidater til bruk ved oral vaksinerings fordi de har GRAS-status ("Generally Regarded As Safe"), tåler sure væsker som magesyre og har vist høy overlevelsessevne i fordøyelseskanalen. I tillegg til dette er flere *Lactobacillus*-stammer blitt sekvensert i den senere tid, og er derfor lett tilgjengelig for genetisk modifisering. Det har tidligere blitt utviklet flere induserbare systemer for effektiv intracellulær proteinproduksjon, som har blitt videre utviklet til å produsere proteiner som fraktes ut av cellen og eventuelt feste seg kovalent til overflaten på bakterien.

I dette studiet var målet å vurdere forskjellige *Lactobacillus* arter med hensyn til deres evne til og produsere og sekretere et heterologt protein, NucA. Studiet tok utgangspunkt i såkalte pSIP vektorer utviklet til bruk i *L. plantarum* og *L. sakei* og signalpeptider selektert fra *L. plantarum*. I de tidligere studiene hadde man vist at disse vektorene ga sekresjon men ofte med lav produksjonsnivå og sekresjonseffektivitet. Tre pSIP-vektorer med ulike signalpeptider (SP'er) ble valgt ut ifra et tidligere konstruert signalpeptidbibliotek med SP'er fra *L. plantarum*, og vektorene ble modifisert ved å bytte replikon fra det smalspektret vert-spesifiske replikonet fra *L. plantarum*, r256, til det mer bredspektret replikonet fra *L. lactis*, SH71. De nykonstruerte vektorene ble så transformert inn i fem ulike arter av *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus*. Resultatene viste betydelig variasjon mellom artene, men viste også at gode sekresjonsnivåer kunne bli oppnådd i fire av fem, avhengig av hvilket SP som ble benyttet. Det var kun for *L. rhamnosus* at ikke samme nivå, som tidligere sett for *L. plantarum*, ble oppnådd. Sekresjonseffektivitetene ble testet for en del av transformantene og den var generelt høy; forskjellene i sekresjonsnivåene så ut til og primært være et resultat av variasjon i produksjonsnivået, en variasjon som er vanskelig å forklare. Resultatene viser at SP'er fra *L. plantarum* WCFS1 har god tilpasning til komponenter i sekresjonsmaskineriet i andre lactobacilli og kan dirigere effektiv sekresjon i disse. Det er imidlertid en del variasjon; for eksempel så fungerte SP_2578 (SP fra Lp_2578 proteinet) i *L. curvatus* og *L. brevis* på tross av at det fungerte relativt dårlig i *L. plantarum* og *L. rhamnosus*. SP fra LP_3050 proteinet var det SP'et som jevnt over resulterte i best sekresjon i samtlige av de høyt produserende artene.

Resultatene viser at lactobacilli generelt fungerer godt med det induserbare pSIP-systemet for genuttrykk og med signalpeptidet fra *L. plantarum*. Dette tyder på at de fleste av de testede stammene mest sannsynlig er godt egnet til *in situ* produksjon og levering av terapeutiske proteiner i mennesker på lik linje med *L. plantarum*. For *L. plantarum* selv, viste dette studiet en betydelig økning i produksjon av NucA etter replikonbyttet fra r256 (*L. plantarum*) til SH71 (*L. lactis*), mest sannsynlig grunnet et høyere plasmidkopinummer ved bruk av SH71 replikonet. Dette styrker *L. plantarum* som

potensiell kandidat for leverandør av vaksiner da det er sannsynlig at bruk av SH71 replikonet også vil bedre produksjonen av et terapeutisk protein. Det er lovende at flere lactobacilli ser ut til å kunne brukes da forskjellige arter kan influere det humane immunsystem på ulike måter, og muligheten til å bruke disse bidrar derfor til å utvide verktøykassen for utvikling av levende vektorer i matbaserte produkter.

Abstract

This study is part of a larger project in which the long-term goal is to develop oral vaccines based on lactobacilli, such as vaccines against cancer or tuberculosis. Lactobacilli are interesting candidates for use in oral vaccination because they have GRAS status ("Generally Regarded As Safe"), because they can tolerate acidic fluids such as gastric acid, and because they have shown high survival in the digestive tract. In addition, the genomes of several *Lactobacillus* strains have recently been sequenced, making these bacteria more accessible to manipulation. Several inducible systems for effective intracellular protein production have been developed for lactobacilli, including systems for producing proteins that are transported out of the cell, and/or attached covalently to the surface of the bacteria.

In this study the aim was to evaluate different *Lactobacillus* species with respect to their ability to produce and secrete a heterologous reporter protein, NucA. The study was based on the so-called pSIP vectors, designed for use in *L. plantarum* and *L. sakei*, and signal peptides selected from *L. plantarum*. Previous studies had shown that these vectors yield secretion, but often with low production levels and low secretion efficiencies. Three pSIP vectors with different signal peptides (SP's) were selected from a previously designed SP-library with SP's from *L. plantarum*, and the vectors were modified by replacing their narrow-host-range *L. plantarum* replicon from plasmid p256, by broad-host-range, high copy number replicon from *L. lactis* plasmid pSH71. The newly constructed vectors were transformed to five different species of *Lactobacillus*: *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* and *L. rhamnosus*. The results revealed considerable variation between species, but also showed that high secretion levels could have been achieved in four out of five species depending on the SP used. Only one of the species, *L. rhamnosus*, did not yield the same levels of secreted protein as previously found in *L. plantarum*. Secretion efficiencies were tested for a number of transformants and were generally high. Thus, the differences in secretion levels were primarily a result of variation in production levels, which is difficult to explain. The results show that SP's from *L. plantarum* WCFS1 are well adapted to components of the secretion system in other lactobacilli and can therefore direct efficient secretion in other species. However, some variation was observed; for instance, the SP_2578 (SP from Lp_2578 protein) functions well in *L. curvatus* and *L. brevis* in spite of the fact that it functioned relatively poorly in *L. plantarum* and *L. rhamnosus*. The SP from the Lp_3050 protein generally resulted in better secretion in all of the well-producing species.

The results show that lactobacilli generally function well with the inducible pSIP expression system, using signal peptides from *L. plantarum*. This suggests that most of the tested strains most likely are suitable for *in situ* production and delivery of therapeutic proteins in humans on an equal footing with *L. plantarum*. For *L. plantarum* this study showed a significant increase in the production of NucA by exchanging the r256 replicon (*L. plantarum*) with the SH71 replicon (*L. lactis*), most likely due to a

higher plasmid copy number obtained with the SH71 replicon (as verified by qPCR). This strengthens *L. plantarum* as a supplier of vaccines as it is likely that use of the SH71 replicon also will improve the production of a therapeutic protein. It is promising that several other lactobacilli also may be used. Different species can influence the human immune system in different ways, and the ability to use these species helps to expand the toolbox for the development of live vectors for vaccine delivery in food-based products.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	9
1.1 Melkesyrebakterier	9
1.1.1 <i>Lactobacillus</i>	10
1.1.2 Bruk av LAB til <i>in situ</i> levering av terapeutiske proteiner	11
1.2 Sekresjon i Gram-positive bakterier	13
1.2.1 Sec-systemet	14
1.2.2 Flaskehalsen for heterolog sekresjon i Gram-positive bakterier	17
1.3 Systemer for genuttrykk og sekresjon	18
1.3.1 pSIP-systemet	19
1.4 Målsetning for dette studiet	22
2. Materialer	23
2.1 Laboratoriestyr og Instrumenter	23
2.2 Kjemikalier	25
2.3 Proteiner og Enzymer	26
2.4 DNA	26
2.5 Primere	27
2.6 Primernes formål	28
2.7 Bakteriestammer	29
2.8 Plasmider	29
2.9 Kit	29
2.10 Vekstmedium	31
2.11 Buffere og reagenser	33
3. Metoder	34
3.1 Dyrking av bakteriestammene	34
3.1.1 Lagring av bakteriene	34
3.2 Isolering av plasmid	35
3.2.1 Isolering av plasmid fra <i>E. coli</i> TG1	35

3.2.2 Isolering av plasmid fra <i>Lactococcus lactis</i> og <i>Lactobacillus spp.</i>	36
3.3 Kutting av plasmid og ligering av DNA- fragmentene	37
3.3.1 Kutting med restriksjonsenzymmer.....	37
3.3.2 Agarose gel elektroforese.....	38
3.3.3 Ekstraksjon av DNA fra agarose gel	39
3.3.4 Felling av DNA med See DNA.....	40
3.3.5 Konsentrasjonsbestemmelse av DNA	41
3.3.6 Ligering av DNA- fragmenter.....	41
3.3.7 Drop Dialysis	42
3.4 Lagning av elektro- kompetente celler	43
3.4.1 Lagning av elektrokompetente <i>Lactococcus lactis</i>	43
3.4.2 Lagning av elektrokompetente <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> og <i>L. brevis</i>	44
3.4.3 Lagning av elektrokompetente <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>L. acidophilus</i> og <i>L. rhamnosus</i>	45
3.4.4 Lagning av elektrokompetente <i>Lactobacillus spp.</i> ved dyrking i medium med høy saltkonsentrasjon.....	45
3.5 Transformering av celler	46
3.6 ”Polymerase Chain Reaction”	48
3.7 DNA sekvensering	50
3.8 Analyser for genuttrykk og vekstforsøk	52
3.8.1 Dyrking, indusering og høsting av celler	52
3.8.2 Knusing av celler.....	53
3.8.3 LDS-PAGE	54
3.9 Deteksjonsmetoder	55
3.9.1 Sølvfarging av Nupage Novex Bis- Tris geler.....	55
3.9.2 Western Blott analyse med ”iBlotT dry blotting” system.....	56
3.10 Plasmid kopinummer analyse.....	61
3.10.1 Ekstraksjon av total- DNA fra <i>Lactobacillus spp.</i>	61
3.10.2 Felling av DNA	62

3.10.3 "Quantitative Polymerase Chain Reaction "	63
4. Resultater	65
4.1 Valg av signalpeptider	66
4.2 Konstruksjon av sekresjonsvektorer	67
4.3 Transformasjon av <i>Lactobacillus spp.</i>	70
4.4 Vekstforsøk	71
4.5 Sekresjon i <i>Lactobacillus spp.</i>	73
4.5.1 Evne til sekresjon i <i>L. plantarum</i> ved bruk av SH71 replikon	73
4.5.2 Sekresjonseffektivitet i <i>L. plantarum</i> ved bruk av SH71 replikon	74
4.5.3 Evne til sekresjon i <i>Lactobacillus spp.</i>	75
4.5.4 Sekresjonseffektivitet i <i>Lactobacillus spp.</i>	80
4.5.5 Kvantifisering	81
4.6 Plasmid kopinummer - analyse	82
4.6.1 Validering av qPCR- analysen	85
4.6.2 Plasmid kopinummer i <i>Lactobacillus spp.</i>	88
5. Diskusjon	91
5.1 Konstruksjon av sekresjonsvektorer	91
5.1.1 Valg av reportergen	92
5.1.2 Sekresjonsplasmidene	93
5.2 Produksjon av NucA i <i>Lactobacillus spp.</i>	93
5.2.1 Effekt av bytte av replikon for produksjon av NucA i <i>L. plantarum</i>	97
5.3 Sekresjon av NucA i <i>Lactobacillus spp.</i> ved bruk av SP'er fra <i>L. plantarum</i> WCFS1	98
5.3.1 Evne til sekresjon i <i>Lactobacillus spp.</i>	98
5.3.2 Sekresjonseffektivitet i <i>Lactobacillus spp.</i>	100
5.4 Vekst av <i>Lactobacillus spp.</i> med ulike sekresjonsplasmid	101
5.5 Konklusjon	102
Referanser	103

1. Innledning

Melkesyrebakterier, herunder kalt LAB ("Lactic Acid Bacteria"), har i flere århundre blitt benyttet til bevaring og foredling av mat på grunn av deres evne til å produsere melkesyre i fermenteringen av karbohydrater, og har i dag fremdeles en sentral posisjon i fermenteringsprosesser av meieriprodukter, kjøtt og vegetabiliske matprodukter. Siden LAB finnes naturlig i den humane tarmfloraen og man for visse stammer har observert en direkte positiv effekt på human helse (Parvez et al. 2006), er LAB interessante som kandidater for *in situ* levering av terapeutiske proteiner, som for eksempel farmasøytiske produkter, antistoffer, enzymer eller vaksiner (Le Loir et al. 2005; Seegers 2002). I forbindelse med dette har det den senere tid blitt utviklet flere systemer for genuttrykk til bruk i LAB (Diep et al. 2009), og ved bruk av slike systemer har heterologe proteiner blitt vellykket produsert, sekretet og i noen tilfeller også ankret til celleveggen (Fredriksen et al. 2010; Kruger et al. 2002; Mathiesen et al. 2004; Tjalsma et al. 2004). Dette studiet omhandler produksjon og sekresjon av et heterologt reporterprotein i fem forskjellige *Lactobacillus* arter, med mål om å vurdere og å sammenlikne disse artenes potensiale som vertsorganismer (cellefabrikk) for produksjon av terapeutiske proteiner.

1.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (LAB) er en gruppe Gram-positive bakterier som generelt beskrives som fakultative, ikke-sporedannende kokker eller staver. De fleste LAB er ikke-patogene og ikke-invasive bakterier med GRAS ("Generally Regarded As Safe")-status. Den store mengden med melkesyre som LAB produserer i fermenteringen av karbohydrater resulterer i lav pH i omgivelsene rundt disse bakteriene (Axelsson et al. 1998; Eijsink et al. 2002). LAB har derfor naturlig høy syretoleranse som gir de evne til å overleve i magesyre, gallesaft og pankreasvæske, som er en nødvendig egenskap om de skal kunne brukes som vektorer for oral levering av terapeutiske proteiner. Lav pH forårsaket av LAB kan også hindre vekst av andre, skadelige bakterier, som vil være positivt for vertsorganismen. Enkelte LAB er i tillegg probiotiske, som vil si at de har direkte positive effekter på vertsorganismen når den er til stede i tilstrekkelig mengde (Kleerebezem et al. 2010; Ljungh & Wadstrom 2006; Marco et al. 2006). Store deler av de molekylære mekanismene rundt probiotiske effekter er fortsatt ukjente, men en av grunnene til at noen LAB kalles probiotiske er fordi de produserer antioksidanter som bl.a. motvirker celledskader forårsaket av oksidering hos vertsorganismen. Produksjonen av antioksidanter i LAB har også vist hemming i spredning av kreftceller *in vitro* (Choi et al. 2006), som gir grunn til å tro at disse bakteriene kan benyttes til å bekjempe sykdom. En annen assosiasjon i forbindelse med probiotiske effekter forårsaket av LAB er produksjon av antimikrobielle peptider, bakteriosiner (Corr et al. 2007). Bakteriosiner kan bl.a hindre vekst av konkurrerende Gram-positive organismer, slik som

den patogene bakterien *Listeria* ved at peptidene danner hull i dens cellemembran og forårsaker cellelysis (Eijsink et al. 2002). De siste femten år har forskere blitt mer opptatt av LAB og deres positive virkninger på menneskekroppen på grunn av deres evne til naturlig å avverge sykdom og smitte. Dessuten blir LAB (som nevnt) i dag betraktet som lovende kandidater for *in situ* levering av terapeutiske proteiner, slik som vaksiner, i matbaserte produkter (Detmer & Glenting 2006; Kruger et al. 2002; Pouwels et al. 1998).

1.1.1 *Lactobacillus*

Med over 50 arter utgjør *Lactobacillus* den største og mest heterogene gruppen av i alt 16 genus av LAB. *Lactobacillus* er mikroorganismer med lavt G+C innhold og de tilhører fylum Firmacutes, subdivisjonen *Clostridium-Bacillus* (Kleerebezem et al. 2010). *Lactobacillus* er de mest syretolerante bakteriene av LAB (Seegers 2002) og har stor utbredelse i naturen. Enkelte *Lactobacillus* arter er naturlig til stede i tarmen hos mennesker, slik som den kjente yoghurtbakterien *L. rhamnosus*, i tillegg til bl.a *L. brevis* og *L. gasseri* (Tannock et al. 1999). Mange *Lactobacillus* er antatt å være probiotiske ved at de virker modulerende på immunsystemet. *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus* (den såkalte LGG stammen er relativt kjent) er eksempler på dette. En viktig helsegevinst forårsaket av probiotiske bakterier er at de øker immuntoleransen hos vertsorganismen (Kleerebezem & Vaughan 2009). Dette skjer ved at probiotiske bakterier har en positiv påvirkning på dendritiske celler, som fremmer stimuleringen til differensiering av regulatoriske T-celler (Kleerebezem & Vaughan 2009), og derved øker produksjonen av cytokiner. *L. brevis* har f. eks evne til å indusere produksjonen av cytokiner som interleukin (IL)-12 og interferon (IFN)-gamma, og er vist å kunne bedre Th1/Th2 (T-hjelper1/T-hjelper2)-balansen ved å øke IL-12 og IFN-gamma i mus (Segawa et al. 2008). *L. brevis* antas også å virke hemmende på colon-tumorer (Ueno et al. 2011). Et annet eksempel på probiotiske effekter som har blitt beskrevet er *L. curvatus*, som produserer en bakteriosinliknende substans som er vist å være aktiv mot Gram-negative patogene bakterier (Chung & Yousef 2005). Videre kan *L. gasseri* redusere aktiviteten til flere bakterielle enzymer i fordøyelsessystemet som er kjent for å katalysere reaksjoner som kan være kreftfremkallende (Pedrosa et al. 1995). For *L. rhamnosus*, som blant annet finnes i Biola, har undersøkelser vist at den motvirker tarmsykdommer (Conway et al. 1987), undertrykker bakteriell infeksjon hos nyrepasienter (Manley et al. 2007), letter fordøyelsen av meieriprodukter hos laktoseintolerante (Pelto et al. 1998) og reduserer varigheten av diaré (Armuzzi et al. 2001; Guandalini et al. 2000). Andre *Lactobacillus* er antatt å kunne uskadeliggjøre toksiner i tarmen, føre til lavere serumkolesterol og produsere metabolitter som er essensielle for funksjon av tarmsystemets epitelceller (Liu et al. 2011).

Enkelte *Lactobacillus* arter som ikke finnes naturlig i den humane mikrofloraen har vist evne til å oppholde seg midlertidig i tarmkanalen etter inntak pga sin høye syretoleranse, slik som *L. plantarum*

(Vesa et al. 2000). Benyttelse av *Lactobacillus* arter med evne til å oppbevare seg over lenger tid i tarmene ved *in situ* levering har blitt sett i sammenheng med sterkere immunrespons enn ved benyttelse av bakterier med lavere syretoleransen, slik som hos *Lactococcus* (Grangette et al. 2002). Dette er én av faktorene som gjør lactobacilli attraktive som cellefabrikker og leverandører av vaksiner i tarmen ved oral administrering.

Lactobacilli har stor variasjon i form av molekylære egenskaper (Kleerebezem et al. 2010). Små variasjoner i oppbyggingen av peptidoglykanlaget, og ulike modifikasjoner av denne, er funnet i forskjellige *Lactobacillus* arter (Delcour et al. 1999; Vollmer 2008). Dette, så vel som den endogene evnen til å løslate muramyl-peptider, er foreslått å være viktige i ulike interaksjoner mellom bakteriene og vertsorganismen, inkludert direkte signalisering med epitel og immunceller i vertsorganismen (Kleerebezem et al. 2010). Studier har også vist at ekstracellulære polysakkarider hos lactobacilli er viktige med hensyn til interaksjoner med vertsorganismen (Delcour et al. 1999; Lebeer et al. 2008). De funksjonelle rollene av modifikasjoner i celleveggen er imidlertid ikke videre testet ut i *Lactobacillus*, og mye gjenstår også å lære om biosyntetiske veier, regulering, størrelse og konformasjon av polysakkaridene i lactobacilli (Kleerebezem et al. 2010). Forståelsen av de molekylære virkningsmekanismene ved interaksjoner mellom bakteriene og vertsorganismen i lactobacilli er altså fortsatt i startfasen, og det er til dags dato svært begrenset kunnskap om dette (Kleerebezem & Vaughan 2009; Marco et al. 2006). Hittil har bare noen få probiotiske effektor-molekyler blitt identifisert, og mens noen av disse har overbevisende bevis for deres foreslåtte rolle *in vivo*, er andre fortsatt ukjent og krever mer forskning (Kleerebezem et al. 2010). I lys av det skrevet over forstår man at ikke alle lactobacilli vil interagere like godt med vertsepitelet og/eller immuncellene i mennesker, og dette i seg selv kan være en god grunn for å studere flere *Lactobacillus* arter som vertsstammer for hetererologe proteiner.

1.1.2 Bruk av LAB til *in situ* levering av terapeutiske proteiner

Av alle terapeutiske proteiner som kan tenkes levert av LAB er vaksiner blant de mest undersøkte. Det fins en rekke sikre og effektive kommersielle vaksiner tilgjengelig, men nye og forbedrede vaksiner er fortsatt nødvendig. Selv om vaksinene finnes er det heller ikke gitt at de er tilgjengelig for de som trenger dem, fordi vaksinene er for kostbare, og dermed uoppnåelig flere steder, spesielt i U-land. Utviklingen i bioteknologi og en bedre forståelse av immunsystemet i den senere tid, har gjort rekombinante mikroorganismer til attraktive verktøy i vaksineutviklingen. Idéen er å bruke mikroorganismene som cellefabrikker og leverandører av antigener. Bruk av denne type vaksiner vil kunne redusere kostnadene av vaksineproduksjon betydelig, og vil dessuten kunne gjøre lettere å lagre (f. eks i yoghurt) og administrere vaksinene (oralt). Alt dette vil kunne føre til at vaksinene blir oppnåelig for flere land.

Sammenlignet med andre tilgjengelige vaksineringsmetoder har bruk av rekombinante LAB flere fordeler. Én av dem er at LAB er GRAS-mikroorganismer, som reduserer risikoen for smitte av blodbårne sykdommer (Spreng et al. 2006; Tao et al. 2011) i motsetning til de mer studerte ”svekket patogenene” som *Salmonella*, *Listeria* og *Shigella* (Detmer & Glenting 2006). Det er antatt at bruk av LAB som leverandører av antigener også vil føre til færre bivirkninger og allergiske reaksjoner enn tradisjonelle behandlingsmetoder fordi disse bakteriene er helsefremmende. Bruk av LAB kan også ha fordeler framfor bruk av virusvektorer ved at det bakterielle genom kan tilføres flere heterologe gener, og dermed kan rekombinante LAB teoretisk sett fungere som multi- vaksiner (Mielcarek et al. 2001). Rekombinante LAB kan også konstrueres slik at de ikke overlever utenfor menneskekroppen (Steidler et al. 2003) og dette vil hindre spredning av genmanipulerte mikroorganismer. Studier har også vist at bakterier med modifiserte egenskaper kan være gunstig for sekresjonsformål, f. eks ved å bruke stammer som mangler enkelte proteaser (Murashima et al. 2002; Vitikainen et al. 2005). Videre er LAB generelt robuste under ulike behandlinger på grunn av det tykke peptidoglykanlaget i celleveggen. Dessuten har de mekanismer for ankring av proteiner på celleoverflaten som kan være en fordel når det terapeutiske proteinet skal ankres til celleveggen hvor den er mindre utsatt for nedbrytning.

Flere studier av heterolog produksjon av proteiner i LAB er allerede utført og disse har blant annet vist at LAB som produserer antigener er i stand til å utløse/gi immunresponser i både mus og mennesker (Braat et al. 2006; Detmer & Glenting 2006; Grangette et al. 2004). Et eksempel på dette er et studie om immunisering av mus mot livmorhalskreft forårsaket av humant papilomavirus 16, hvor E7-antigener ble vellykket sekretert i *L. lactis* (Bermudez-Humaran et al. 2005). *L. lactis* har også blitt benyttet til *in situ* levering av humant IL-10, og bruk av denne stammen under behandling av Crohns sykdom ga et bedre resultat enn tidligere behandlingsmetoder (Braat et al. 2006). I den senere tid har det i flere tilfeller blitt vist at *L. plantarum* gir bedre immunrespons hos vertsoverflaten enn *L. lactis* ved lik mengde uttrykt av det samme antigenet (Cortes-Perez et al. 2007; Grangette et al. 2002), som har satt fokuset mer på å teste ut lactobacilli til bruk til heterolog produksjon og sekresjon av proteiner.

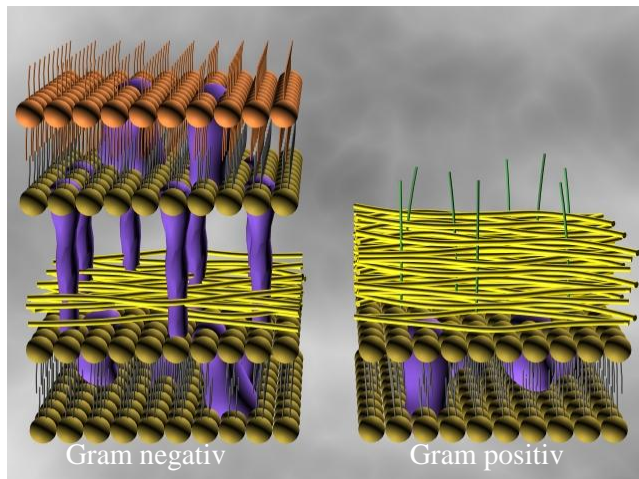
Ved bruk av bakterier til levering av terapeutiske proteiner ønsker man en god, stabil produksjon av proteinet og en mest mulig effektiv sekresjon. Tidligere studier i Gram-positive bakterier har vist at sekresjonseffektiviteten avhenger av både signal peptidet (SP’et) og målproteinets egenskaper (Brockmeier et al. 2006; Dieye et al. 2001; Slos et al. 1998). Siden mange *Lactobacillus* stammer nå er sekvensert har dette i en annen grad enn tidligere åpnet muligheten for å studere og utforske lactobacilli (Makarova et al. 2006), deriblant å finne mulige SP’er, teste funksjonaliteten av disse og analysere sekresjonseffektiviteten ved bruk av ulike SP’er. Dette har blitt gjort i *L. plantarum* WCFS1 (Mathiesen et al. 2009). Genuttrykk er vist å være svært vert-spesifikt (Halbmayer et al. 2008; Perez-Martinez et al. 1992), og for å kunne vurdere muligheten for å uttrykke og sekretere proteiner i

lactobacilli er det derfor viktig å teste flere typer vertceller. Det finnes få studier på dette på tross av at bedre oversikt over effekten av vertsstammen ville utvidet verktøykassen til bruk av LAB for biologisk interessante proteiner.

1.2 Sekresjon i Gram-positive bakterier

Teoretisk sett skulle man tro at sekresjon i Gram-positive bakterier er enklere enn i Gram-negative bakterier siden det i Gram-positive fins kun én hovedbarriere, cellemembranen, mellom cytoplasmaen og det ekstracellulære rom (Chang 1987). I Gram-negative bakterier finnes det to membran-strukturer (se figur 1.1). Selv om Gram-negative bakterier trenger mer maskineri for å kunne komme gjennom periplasma og den ytre membranen har det likevel vist seg at Gram-positive og Gram-negative bakterier bruker liknende mekanismer for å transportere proteiner ut av cellen. Translokasjon av proteiner skjer via konserverte proteinkomplekser i cellemembranen, og proteinet kommer så ut i det periplasmatiske rom (Merchante et al. 1995; Zuber et al. 2006). Normalt er proteinet koblet til et signal peptid (SP) ved N-terminal ende av proteinet, som inneholder informasjon om hvor i cellen proteinet skal og hvilken mekanisme proteinet skal føres ut av cellen med (van Wely et al. 2001). SP'et kuttes fra proteinet under eller rett etter translokasjonen gjennom cellemembranen, og blir sekretert som ferdig prosessert protein (van Wely et al. 2001). Man antar at mindre proteiner kan diffundere fritt gjennom celleveggen og ut i mediet i Gram-positive bakterier (Lambert 2002; Merchante et al. 1995).

Ved produksjon av heterologe, ekstracellulære proteiner i Gram-positive bakterier er varierende resultater oppnådd (van Wely et al. 2001). Det er mye man fortsatt ikke vet om sekresjon i Gram-positive bakterier, men det er foreslått at de siste stadiene av sekresjonsprosessen, blant annet gjennomtrengning av peptidoglykanlaget (figur 1.1), er potensielle flaskehals (Bolhuis et al. 1999).



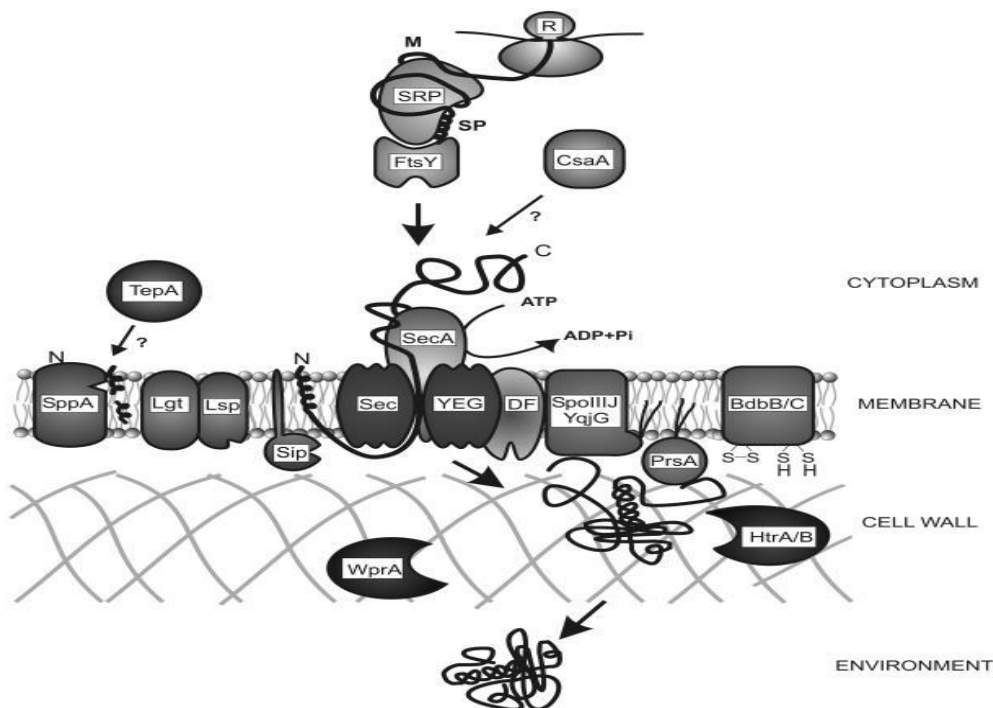
Figur 1.1 Oppbygging av cellevegg i Gram-positive og Gram-negative bakterier. Blå søyler indikerer lipo- og transportproteiner. Gule horisontale striper indikerer peptidoglykanlaget. Vertikale grønne streker indikerer polysakkarider i Gram-positive bakterier. Brune og røde lollipop- strukturer indikerer fosfolipider som utgjør membranen. Bildet er hentet fra <http://www.ppws.vt.edu/~sforza/agro/agro.html>.

Det fins totalt sju kjente mekanismer for proteinsekresjon i Gram-positive bakterier: ABC transportører, FPE-systemet, Sec-systemet, Holin-systemet, FEA-systemet, Wss-systemet og Tat-systemet (Kleerebezem et al. 2010). Sekvensering av genomer av lactobacilli har vist tilstedeværelse av gener for de fire førstnevnte sekresjonsmekanismene (Kleerebezem et al. 2010). Proteiner som sekreteres ved bruk av Sec-systemet som diskutert ovenfor, har Sec- type SP og lipoprotein SP som er substrater for henholdsvis type I og II signal peptidaser (Kleerebezem et al. 2010; van Roosmalen et al. 2004). Sekresjon i Gram-positiv bakterier er best studert i *B. subtilis* (Tjalsma et al. 2000; Tjalsma et al. 2004; van Wely et al. 2001).

1.2.1 Sec-systemet

Sec-systemet er et komplisert og sammensatt system, og mange komponenter spiller inn for å oppnå vellykket proteinsekresjon i bakterier ved bruk av dette systemet. Figur 1.2 viser en modell for Sec-avhengig sekresjon i den Gram-positive bakterien, *B. subtilis*, der preproteinet translokteres over cellemembranen og sekreteres ut i mediet. SecY, SecE og SecG (Sec YEG- figur 1.2) utgjør hovedkomponentene av translokasjonskanalen som sammen lager et hydrofilt hulrom gjennom cellemembranen (Kleerebezem et al. 2010). Når preproteinet (polypeptidet) syntetiseres på ribosomet, blir SP'et gjenkjent av "Signal Recognition Particle"(SRP), som vist i figur 1.2. Proteinene FtsY bindes til SRP og bistår med transporten til cellemembranen hvor SecA indirekte gjenkjenner preproteinet gjennom SecY. ATP binder seg så til komplekset, og ATP- hydrolyse fører til konformasjonsendring i SecA. Dette gjør at C-terminal ende av preproteinet kan føres inn i cellemembranen og gjennom translokasjonskanalen, SecYEG (figur 1.2). Hydrolyse av ATP resulterer også i at SecA løsner fra

komplekset og frigjør preproteinet. Mekanismen for SecA- aktivitet og translokasjon av proteiner er ikke fullstendig utredet, men det er antatt at den videre prosessen innebærer trinnvis translokasjon av preprotein ved gjentatt binding og frigjøring til og fra SecA (Driessen & Nouwen 2008; Tjalsma et al. 2004). Før preproteinet kan sekreteres må SP kuttes av. Dette utføres av SPaseI som bryter peptidbindingen mellom SP og reporterproteinet. Kuttsete for SPaseI blir plassert i nærheten av SP under translokasjonen. SPaseI gjenkjenner konsensus Ala-X-Ala oppstrøms for kuttsete (van Roosmalen et al. 2004). Tilstedeværelse av flere typer SpaseI er vanlig i Gram-positive organismer, antagelig pga spesifikke interaksjoner med de ulike SP'er (Kleerebezem et al. 2010). For å hindre akkumulering av frie SP'er fins SP-pedidaser, som TepA og SppA (figur 1.2). Et av de siste trinnene for vellykket sekresjon er foldingen av proteinet. Et ufoldet protein er svært utsatt for degradering av ekstracellulære proteaser, og inhibisering av proteaseaktivitet kan derfor være viktig for kvalitetssikring av sekreterte proteiner. PrsA er et membran-ankret lipoprotein som trolig fungerer som en chaperon for folding av translokerte polypeptider (figur 1.2). Det ufoldete proteinet trenger også beskyttelse intracellulært og her spiller CsaA en rolle. CsaA er identifisert som en potensiell erstatter for SecB chaperonet som finnes i *E. coli*, og som er kjent for å stabilisere ufoldet protein så de kan translokaliseres uten å bli degradert (figur 1.2) (Tjalsma et al. 2000). Det ferdig prosesserte proteinet sekreteres til slutt over celleveggen ved diffusjon (Sharipova 2002).



Figur 1.2. Hovedkomponentene i Sec-avhengig protein sekresjon i *B. subtilis*. Preproteinet translokteres over cellemembranen og sekreteres ut i mediet. SecY, SecE og SecG (SecYEG) utgjør hovedkomponentene av translokasjonskanalen. SecDF proteinet er foreslått å være translokasjon-stimulator (Kleerebezem et al 2010)). SRP er et protein-RNA kompleks som gjenkjenner preproteiner via deres SP. FtsY bindes til SRP og bistår med transporten til cellemembranen. TepA og SppA er signal peptid pedidaser som hindrer akkumulering av frie SP ved å degradere dem. PrsA er et membran ankret lipoprotein som fungerer som en foldase av type PPIase, dvs at

det fungerer som chaperon for folding av translokerte polypeptider. CsaA er identifisert som en potensiell erstatter for SecB chaperon i *E.coli* som stabiliserer ufoldet protein så de kan translokaliseres uten å bli degradert. Figur er kopiert fra Tjalsma et al (2004).

Nedenfor følger en oppsummering av viktige faktorer i sekresjon ved bruk av Sec- systemet og hvilke faktorer som idag er funnet i *Lactobacillus*;

Signal peptidene (SP) er viktige for at proteinet skal bli ledet til sekresjonsapparatet og translokert gjennom cellens membran. SP'et som brukes i Sec-systemet har en positiv ladet N-region, en hydrofobisk H-region og en polar C-region (Carlos et al. 2000; von Heijne 1990). N- og H-domenene er nødvendige for selve translokasjonen, mens C-domenet, som er den mest konserverte delen av SP-sekvensen, er nødvendig for frigjøringen av det translokerte proteinet fra det tilhørende SP (Tjalsma et al. 2000; von Heijne 1990). Netto-ladning, hydrofobisitet og lengden på signal peptidet er vist å være avgjørende for utfallet av sekresjon i Gram positive bakterier (Brockmeier et al. 2006). Et SP-bibliotek med SP'er fra *L. plantarum* er nylig konstruert (Mathiesen et al. 2009), som kan være positivt i forhold til sekresjon i *Lactobacillus*.

Signal peptidaser er viktige for å få kuttet av SP'et for at det modne proteinet kan foldes og sekreteres. Signal peptid peptidaser (SPP) er viktige for å hindre akkumulering av frie SP etter kuttingen (Driessen & Nouwen 2008; Kleerebezem et al. 2010; van Roosmalen et al. 2004).

Translokasjonskanalen må kunne dannes spontant og reversibelt for at dette komplekset skal være i stand til å motta og transportere polypeptidkjeder under translokasjonen. I tillegg er det viktig at translokasjonskanalen kan tilpasse seg konformasjonsendring i SecA (Bessonneau et al. 2002). Kopier av SecA, SecE, SecY og SecG er alle funnet i *Lactobacillus* (Kleerebezem et al. 2010). SecDF proteinet er foreslått å være translokasjonstimulator, men er ikke blitt funnet i *Lactobacillus* eller *Lactococcus* (Kleerebezem et al. 2010). Det er derimot vist at tilføring av denne subenheten kan øke sekresjonseffektiviteten i *L. lactis* (Nouaille et al. 2006) som muligens også kan være tilfelle i *Lactobacillus*.

Cytosoliske faktorer som CsaA-chaperon (*B. subtilis*) og SecB-chaperon (*E. coli*) er viktige for å stabilisere det nysynteserte, ufoldete polypeptidet fram til det translokteres. Altså, med hjelp av disse proteiner unngås både aggregering og for tidlig folding. Disse chaperoner er derimot ikke funnet i *Lactobacillus* (Kleerebezem et al. 2010), og tilføring av disse kan være en mulig strategi i tilfeller lite protein detekteres. En annen cytologisk faktor verdt å nevne er tilstedeværelse av FtsY som reseptor for SRP/preproteinet, som sikrer transport til translokasjonsapparatet (Tjalsma et al. 2004).

Ekstracellulære faktorer er viktige for at foldingen av proteinet skal gå bra. Tilstedeværelse av foldaser slik som PrsA-chaperonen er en hastighetsbestemmende faktor for riktig folding av translokerte protein. En stor andel ekstracellulære proteiner funnet i *Lactobacillus* har imidlertid fortsatt ukjente funksjoner, men flere proteiner involvert i metabolismen av proteiner i ”cell-envelope”, sekresjonen og transporten av proteiner er allerede blitt identifisert i *Lactobacillus* (Kleerebezem et al. 2010).

1.2.2 Flaskehalsen for heterolog sekresjon i Gram-positive bakterier

Liten evne til sekresjon av heterologe proteiner er et stort problem i Gram-positive bakterier, og sekresjon kan begrenses av en rekke faktorer (Bolhuis et al. 1999; Li et al. 2004). Studier i *B. subtilis* og *L. lactis* har vist at økt sekresjon av heterologe proteiner kan oppnås ved optimalisering av komponenter som sees på som flaskehalsen i sekresjonssystemet (Nouaille et al. 2006; Vitikainen et al. 2005).

Kjente flaskehalsen for heterolog sekresjon:

Proteinets: Det er tenkelig at proteinets sekvens er evolusjonært tilpasset sekresjonssystemet til dets produserende organisme. Vellykket sekresjon i andre organismer vil derved i stor grad være proteinspesifikk, som allerede vist (Halbmayr et al. 2008; Perez-Martinez et al. 1992; van Wely et al. 2001). Proteinets karakter kan også ha betydning for hvilke trinn som eventuelt blir begrensende i translokasjonen (Bolhuis et al. 1999; van Wely et al. 2001). Mutagenese studier har bekreftet at sekresjons-nivåer i Gram-positive bakterier kan variere med variasjonen i den N-terminale delen av det ferdig prosesserte proteinet der negativt ladede aminosyre er antatt å være positivt for sekresjon (Le Loir et al. 1998; Le Loir et al. 2001).

Proteaser: Tilstedeværelse av proteaser intracellulært, i cellevegg og periplasma er også et problem. Heterologe proteiner som ikke blir tilstrekkelig beskyttet av intracellulære chaperoner kan være mål for intracellulær nedbrytning og dermed aldri komme seg til translokasjonsapparatet. Chaperoner opprettholder normalt preproteinets i translokasjons-kompetent konformasjon, men begrenset antall chaperoner i Gram positive bakterier kan føre til intracellulær degradering av proteinet (Bolhuis et al. 1999; Li et al. 2004). Dette kan også resultere i dannelsen av uløselige aggregater i cytoplasma (Wu et al. 1998). En annen mulighet er at heterologe proteiner kan bli degradert ekstracellulært, etter sekresjon (Jensen et al. 2000), for eksempel fordi de folder for langsomt og dermed blir sårbare for proteaser. Det har vist seg at minst sju ekstracellulære proteaser kan være aktivert i den stasjonære vekstfasen av *B. subtilis* (Simonen & Palva 1993). Det er viktig å understreke at slik ekstracellulær protease aktivitet kan være viktig for produksjonsorganismens vitalitet. For eksempel to proteaser på periplasmatiske side av cellevegg, HtrA og HtrB, er viktige for opprettholdelse av celleintegritet hos *B.*

subtilis. HtrA og HtrB degraderer proteiner som er ufoldet eller misfoldet, og uten disse ville det blitt opphopning av inaktive proteiner i celleveggen, som igjen kunne begrense sekresjonen (Vitikainen et al. 2005). Proteaser er dermed både nødvendige og begrensende for effektiv sekresjon av heterologe proteiner (Bolhuis et al. 1999; Vitikainen et al. 2005).

Signal peptidaser: Dårlig signal peptidase-funksjon er et annet problem, og kan forårsake at proteinene blir sittende igjen ”ankret” i cellemembranen gjennom det hydrofobe N-terminale SP’et (Fu et al. 2008; Ravn et al. 2003; van Dijn et al. 1992; Zanen et al. 2005). For proteiner med transmembran ankring er dette en naturlig prosess (Desvaux et al. 2006; Tjalsma et al. 2000; Tjalsma et al. 2004).

Celleveggen: Celleveggen er også antatt å være en variabel for effektiv sekresjon med tanke på interaksjoner mellom proteinet og celleveggen basert på ladning. Optimalisering av preprotein eller bytte av cellevert kan derfor være nødvendige for å oppnå effektiv sekresjon av enkelte proteiner (Chambert & Petit-Glatron 1999; Vitikainen et al. 2005). Det antas at netto negativ ladning i celleveggen er av betydning for sekresjonseffektiviteten til proteiner (Vitikainen et al. 2005). Det er også vist at celleveggen kan være en fysisk barriere for enkelte proteiner (Saunders et al. 1987).

I lys av det som er skrevet over kan det tenkes at det ved uttrykk av heterologe proteiner er attraktivt å etterlikne det homologe sekresjonssystemet for celleverten, som for eksempel bruk av homologe SP’er. Teoretisk sett vil dette være et virkemiddel for økt sekresjonseffektivitet uten og måtte modifisere komponentene i Sec-systemet. Dette har vist å være en vellykket strategi for flere heterologe proteiner i *L. lactis* (Le Loir et al. 2001; Le Loir et al. 2005) og *L. plantarum* (Mathiesen et al. 2008; Mathiesen et al. 2009) på tross av at SP ikke er definert som en flaskehals for heterolog sekresjon i disse organismene. Om ikke homologe SP’er er tilgjengelige i alle tilfeller kan benyttelse av SP’er fra bakterier fra samme genus tenkes å være en fordel framfor benyttelse av SP’er fra bakterier fra ulike genus. Evne til sekresjon i Gram-positive bakterier avhenger imidlertid av mange faktorer og optimalisering av uttrykk og sekresjon av et bestemt heterolog protein kan være en vanskelig oppgave.

1.3 Systemer for genuttrykk og sekresjon

Det har blitt utviklet både regulerbare og ikke- regulerbare systemer for genuttrykk i LAB der man i de regulerbare systemene initierer genuttrykket ved å tilsette en induserende substans. Det mest kjente regulerbare systemet er det såkalte NICE (”Nisin-Controlled Expression”)-systemet som er basert på et regulatorisk to-komponent system som aktiverer induserbare NisA og NisF promotere, tatt fra et genkluster for produksjon av bakteriosinet nisin i *L. lactis* (de Ruyter et al. 1996; Kuipers et al. 1997). Systemet aktiveres ved tilsetning av nisin og vil initiere transkripsjon av disse spesielle promotorer som kan kobles til det genet man ønsker å uttrykke (de Ruyter et al. 1996; Kleerebezem et al. 1997).

Bakdelen med NICE- systemet er at det virker å være lite kontrollert i lactobacilli (Pavan et al. 2000; Sorvig et al. 2003) og at man må integrere regulatoriske gener i kromosomet på verten for å unngå alt for høy basal aktivitet (Pavan et al. 2000). Utvikling av nye systemer var derfor interessant i arbeidet rundt genuttrykk i LAB.

pSIP- systemet representerer et alternativt system for peptid-basert regulerbart genuttrykk i lactobacilli (Sørvig et al. 2003). Dette systemet har suksessfullt blitt benyttet til dette formålet i tidligere studier (Mathiesen et al. 2009; Straume et al. 2006). Systemet har mye likhet med NICE-systemet, men i pSIP systemet anvendes regulatoriske gener som er involvert i produksjon av klasse II bakteriosinene sakacin A og P. I tillegg er det induserende peptidet ikke et bakteriosin, som i NICE-systemet, men et peptid feromon uten anti-mikrobielle aktivitet. pSIP systemet er utviklet spesielt for lactobacilli arter (Axelsson et al. 2003; Sørvig et al. 2003) og virker svært bra i disse organismene (Sørvig et al. 2005a).

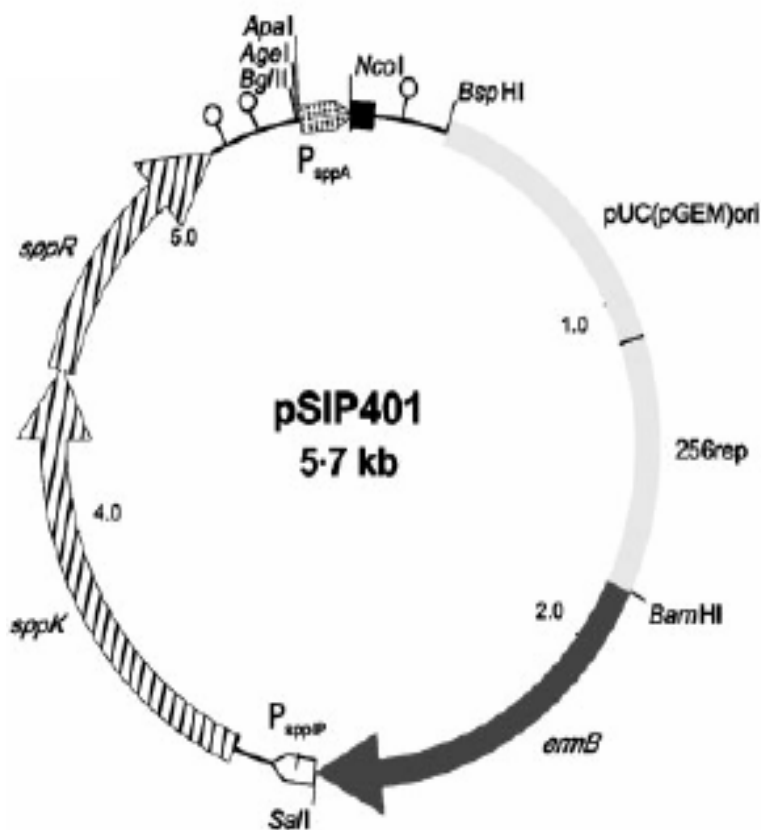
1.3.1 pSIP-systemet

pSIP-systemet benytter seg av et to-komponent system for genuttrykk der de regulatoriske elementene histidin kinase (HK) og responsregulator (RR) utgjør de to komponentene. Vektorene som anvender dette to-komponent systemet har induserbare bakteriosin promotorer som kan kobles til det genet man ønsker å uttrykke (Sørvig et al. 2003). Systemet styres av et ekstracellulært peptid feromon som har opprinnelse fra samme genkluster (operonet) som HK og RR i det naturlige systemet. Feromonets naturlige rolle er å indusere produksjon av klasse II bakteriosiner (Nes & Eijsink 1999). Feromonet binder til histidin kinasen (HK), som er et membran protein og som autofosforyleres på cytoplasmatiske side. Den aktiverte kinasen aktiverer så den intracellulære respons regulatoren (RR). Den aktiverte RR fungerer som en transkripsjonsfaktor som binder spesifikke sekvenser i de induserbare promotorene. In vivo fører dette til en eksplosiv transkripsjon fordi ikke bare bakteriosin operonene, men også det regulatoriske operonet aktiveres på denne måten (Brurberg et al. 1997; Diep et al. 1996; Eijsink et al. 1996; Nes et al. 1996; West & Stock 2001). I pSIP-vektorene har forskjellige varianter av dette systemet blitt implementert; kjerne er tilstedeværelse av HK+RR på vektoren, samt en regulerbar promoter som aktiveres av dette systemet når peptid feromonet tilsettes. Studier har vist at dette systemet gir gode muligheter for regulering, og at mengden produkt kan bli svært høy ved full indusering av systemet (Mathiesen et al. 2004; Sørvig et al. 2003; Sørvig et al. 2005a).

1.3.1.1 pSIP-vektorene

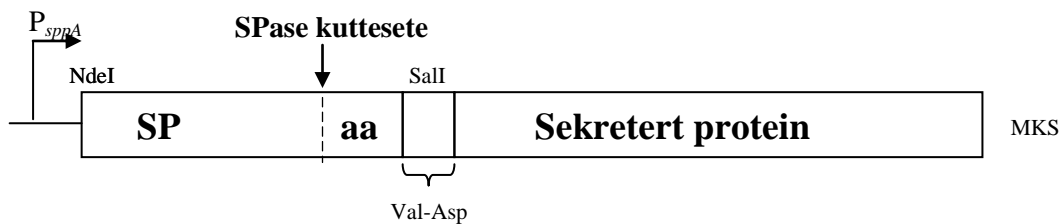
Det har blitt konstruert flere basis vektorer med ulike egenskaper for dette systemet, men vektorene basert på pSIP401 plasmidet er det som er blitt mest brukt (Sørvig et al. 2005a). pSIP401 inneholder de regulatoriske genene, *sppK* og *sppR*, som koder for HK og RR, to replikon, et erytromycin-

resistens gen, samt to induserbare promoterer, P_{sppIP} , som driver autoinduksjon av det regulatoriske operonet, og P_{sppA} som driver uttrykk av det genet man vil overuttrykke (figur 1.3). Genet for sakacin P, *sppA*, lå opprinnelig nedstrøms for genene som koder for HK og RR, *sppK* og *sppR*, og er fjernet fra ekspresjonsvektoren. Mellom P_{sppIP} *sppK* og *sppR* lå opprinnelig genet som koder for feromonet, *sppIP*, men dette genet har blitt fjernet for å muliggjøre kontroll. SppIP må tilsettes for at transkripsjon fra den strengt kontrollerte P_{sppA} promoteren skal initieres (Risøen et al. 2000), hvilket resulterer i et strengt regulerbart system (Sørvig et al. 2005a). NcoI kuttesetet linket til P_{sppA} promoter tillater en nedstrøms translasjonell fusjon til et målgen som blir klonet inn (ikke vist på figuren). I det naturlige *spp* genklusteret blir P_{sppA} promoteren fulgt av to gener som koder for bakteriosinet sakacin P og dets immunitetsprotein.



Figur 1.3. Skjematisk oversikt over pSIP401- vektoren, en av "grunnvektorene" i pSIP- systemet. Lysegrå region viser to replikoner, (pUC(pGEM) fra *E.coli* and 256rep fra *L. plantarum*). Mørkegrå region viser erytromycin resistens gen. Streket regioner er gener for de to komponentene, HK og RR. Prikket region er induserbar bakteriosin promoter, og hvit region er induserbar sppIP promoter. Figuren er hentet fra Sørvig et al (2005).

pSIP-systemet har i den senere tid blitt videreutviklet for å kunne ta systemet i bruk til produksjon av ekstracellulære proteiner (Mathiesen et al. 2008). pSIP401-baserte vektorer har blitt designet for å produsere og sekretere heterologe proteiner i *Lactobacillus* ved bruk av den Sec-avhengige sekresjonsveien (Mathiesen et al. 2008). Disse vektorene inneholder en "SP-kassett" nedstrøms for P_{sppA} promotoren som tillater enkel utbytting av signal peptider (SP'er) og reporter-genet ved at det er satt inn kutteseter for kjente restreksjonsenzymmer mellom komponentene, som vist i figur 1.4. SP-kassetten består av et signal peptid (SP) etterfulgt av et par aminosyrer fra SP'ets tilhørende opprinnelige protein. Etter dette følger en "linker" på to aminosyrer (Val-Asp) som blir kodet av seks nukleotider som til sammen danner et *Sall* kuttesete, som er koblet til reporter-genet ("in-frame"). Et *NdeI* kuttesete som ligger oppstrøms for SP'et, og et multi kuttesete (MKS) som ligger nedstrøms for målgenet muliggjør sammen med *Sall* kuttesetet raskt utveksling av komponenter (figur 1.4). Bruk av disse vektorene har gitt høy produksjon og sekresjon av heterologe proteiner i *L. plantarum* og *L. sakei* (Mathiesen et al. 2004; Mathiesen et al. 2008; Mathiesen et al. 2009).



Figur 1.4. Skjematisk fremstilling av "SP-kassetten" som benyttes i pSip-vektorene. Kassetten inneholder et signal peptid (SP) med et par aminosyrer (aa) fra dets opprinnelige modne protein, en "linker" fusjonert til målgenet som gir et *Sall* kuttesete (Val-Asp), og proteinet som skal sekreteres. Nedstrøms for sekretert protein ligger det i tillegg et multi kuttesete for restreksjonsenzymmer (MKS) som muliggjør enkel utbytting av målgenet. Uttrykket av kassetten er under kontroll av P_{sppA} og indikeres med en pil oppstrøms for SP. SP er translasjonelt koblet til promoteren med et *NdeI* sete i koblingspunktet. Figuren er inspirert av en figur i Mathiesen et al (2008)

1.4 Målsetning for dette studiet

Dette studiet er en del av et større prosjekt hvor det langsiktige målet er å utvikle orale vaksiner basert på lactobacilli, for eksempel vaksiner mot kreft eller tuberkulose. Lactobacilli er interessante kandidater til bruk ved oral vaksinerings fordi de har GRAS-status, overlever i magesyre og har vist høy overlevelsessevne i fordøyelseskanalen, i tillegg til at flere genom-sekvenser er blitt tilgjengelig. Det har blitt utviklet induserbare system for effektivt, intracellulært uttrykk av heterologe proteiner (de Vos 1999; Sørvig et al. 2003) som senere har blitt videreutviklet til å produsere proteiner som fraktes ut av cellen og/eller fester seg kovalent til overflaten på bakteriene (Dieye et al. 2001; Fredriksen et al. 2010; Mathiesen et al. 2008; Tjalsma et al. 2004). Sekresjon og eventuelt ankring kan gjøre de produserte proteinene mer tilgjengelige for immunsystemet til vertsorganismen. Systemet brukt i dette studiet er utviklet til bruk i *L. plantarum* og *L. sakei* (Sørvig et al. 2003) og ett av de problemene man har støtt på er lav protein produksjon og lav sekresjonseffektivitet i disse artene.

Det har nylig blitt utført et studie rundt sekresjon i *L. plantarum* WCSF1 med systematisk tilnærming for å oppnå høy heterolog proteinsekresjon ved å screene et sett av homologe signalsekvenser (Mathiesen et al. 2009). Ved evaluering av dette SP-biblioteket ble det funnet flere SP'er som hadde bedre evne til sekresjon i *L. plantarum* enn de SP'er som til da var mest benyttet for sekresjon i LAB. Hovedmålet med dette studiet var å studere om SP'ene fra *L. plantarum* WCSF1 kan benyttes for sekresjon i en rekke andre lactobacilli. Videre var målet å sammenlikne produksjon og sekresjonseffektivitet av et heterologt reporterprotein i disse *Lactobacillus* artene. For å gjøre dette måtte en serie vektorer konstrueres, deriblant nye basis vektorer med annet replikon, som muliggjør anvendelse i andre arter enn *L. sakei* og *L. plantarum*. De konstruerte vektorene inneholder ulike SP'er for å gi ytterligere forståelse av signalsekvensenes betydning for sekresjon. Evaluering av mengde sekretert protein og sekresjonseffektivitet (=mengde sekretert protein i forhold til total mengde produsert protein) utføres ved kvantitativ analyse av reporterproteinet NucA, ved hjelp av LDS-PAGE og western blott analyser. For å studere sammenhengen mellom protein mengder og gendose, og for å se på effekten av vertsstammen på antallet plasmider per celle anvendes kvantitativ PCR (qPCR) for å bestemme disse antallene.

2. Materialer

2.1 Laborieutstyr og Instrumenter

Utstyr	Leverandør
<i>Pipetteutstyr:</i> Finn Automatpipetter [®] Pipetrus(sterilpipette) Pipettespisser- sterile Pipettespisser (labtip yellow/blue)	Thermo Labsystems Pipetrus [®] MBp molecular BioProducts Thermo scientific
<i>Reagensrør/kyvetter:</i> Qubit assay rør Corex glassrør Plastibrand [®] “disposable cuvettes”, 1.5 ml Elektroporering kyvetter, Gene pulser [®] , 0.2 cm Eppendorf rør 2 ml rør Cellstar rør, 50 ml and 15 ml Fastprep rør, 2 ml (til cellelysis) MicroAmp Fast Reaction rør(8rør pr strip)	Invitrogen Corning Inc. Brand BioRad Axygen Axygen Greiner bio- one Q- Biogene Applied Biosystems
<i>Annet:</i> Sterile filtere, 0,22 µm pore str. Sprøyter, 2 og 10 ml Diverse glassutstyr Kork til FastPrep- rør MicroAmp Optical 8-cap strip Dialysemembran, 0,025µM Petriskåler 9cm	Millex GP BD- Plastipak Labsystems MP Biomedicals Applied Biosystems VSWR Thermo scientific
<i>Instrumenter:</i> Minishaker- Rotamax 120 Wannbad Vortex Magnetrorer MR 3001 Magnetrorer Trykkkoker(certoclav) Varmeskap BLA electroporator PCR- maskin GelDoc machine StepOnePlus [™] Realtime PCR- system ABI PRISM [®] 3100 DNA sequencer	Heidolph JulaboED/Stuart sWB Tumro lab Heidolph IKA [®] RCT classic Onemod Termax BioRad VWR BioRad Applied Biosystems AME Bioscience

Sentrifuger:

Bord- sentrifuge(ependorf rør)
Bord- sentrifuge
Kjøle sentrifuge
Bord- sentrifuge(store rør)

Eppendorf centrifuge 5415R
Biofuge Pico, Heraeus
Avanti J-25 Beckman Coulter
Eppendorf centrifuge 5430R

Western utstyr:

SNAP i.d.- Millipore(vacuum)
iBlot™ Gel Transfer Device

Invitrogen

Spektrofotometer:

C08000 Cell Density Meter
Qubit™ fluorometer
pH- meter: 827pH Lab

WPA, Biowave
Invitrogen
Metrohm Swiss madet

Elektroforese utstyr:

PowerPac 300
Agarosegeler: Hoefer HE300 Mini Submarine
SDS-PAGE: Xcell Surelock™ Mini-Cell
Fastprep® -24 system for cell disruption

BioRad
Pharmacia Biotech
Invitrogen
MP biomedical

Software:

StepOne Software v2,0™

pDRAW32

NCBI

BLAST

BioEdit

Ensemble

Kilde:

www.acaclone.com

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

<http://www.ensemble.org/index.html>

2.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
Acetic acid $C_2H_4O_2$	Merck
Acetone	Merck
Agarose SeaKem® LE	Lonza
Bacto™ Yeast extract	BD
Bacto™ trypton	BD
Calcium Chloride, $CaCl_2$	sds/Merck
EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$	Merck
Erythromycin, $C_{37}H_{67}NO_{13}$	Sigma- ALDRICH
Ethanol(teknisk) 95%, C_2H_5OH	Merck
Ethidium Bromide, EtBr	Sigma
Gelatin, from bovine skin	Sigma
Glass Beads, 106 microns and finer, acid washed	Sigma
Glucose, $C_6H_{12}O_6$	AnalaR NORMAPUR
Glycerol 85%, $C_3H_8O_2$	Merck
Glycine , $C_2H_5NO_2$	Duchefa Biochemie
Magnesium chloride, $MgCl_2$	Merck
M17 Broth	Oxoid
MRS Broth	Oxoid
Natriumklorid, NaCl	Merck
Phenylmethylsulfonyl fluoride	
Polyethylen Glycol, PEG ₁₄₅₀	Sigma
Sodium acetate, $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$	Applichem
Sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$	AnalaR NORMAPUR
Trichloroacetic acid (TCA)	Sigma
Tris-base, $C_4H_{11}NO_3$	Sigma
Tween-20	Sigma

2.3 Proteiner og Enzymer

Proteiner/enzymer	Leverandør
<i>Antistoff:</i>	
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Geit IgG anti kanin HRP- konjugat	Sigma
Monoklonalt antistoffserum mot nuclease A- peptid fra kanin	Prosci
Nuclease A fra <i>Staphylococcus aureus</i>	Prosci
SppIP induser peptid	Unit
<i>Proteinladdere:</i>	
Benchmark Protein Ladder	Invitrogen
Marc XP western standard (Protein Ladder)	Invitrogen
<i>Enzymer:</i>	
Lysozym	Sigma
Phusion High Fidelity DNA polymerase	Finnzymes
Proteinase K	Sigma
T4 DNA ligase	Biolabs
Ribonuclease A (RNase A)	Sigma
Taq DNA polymerase med 10x reaction buffer	Biolabs
Mutanolysin	Sigma
<i>Restreksjonsenzymer og - buffere:</i>	
Acc65I	NEB
BamHI	NEB
bsaAI	Biolabs
SalI	Biolabs
NEBuffer 3	NEB
NEBuffer 4	NEB

2.4 DNA

DNA	Leverandør
VWR Red taq DNA polymerase Master-mix	Biolabs
Power SYBR®Green PCR Mastermix	Applied Biosystems
<i>DNA laddere:</i>	
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentes/Generuler/Biolab
NEB 1kb DNA ladder	NEB
Supercoiled DNA ladder	Invitrogen
100 kb DNA ladder	Biolabs

2.5 Primere

Navn	Sekvens(5'-3')
SekRepF	GTTGCTTATGTTTACAAACCTAACAATACAC
RepR	CACTGGTAGGAATTAATCTAACGTATT
Fussh71F	ATAAGAATTCGGTACCCCGGGT
Fussh71R	GCTTCTAAGGGGATCCTTTTGTATTGCAATCGT
SekrepF1	CCGCGTCTTTGATCGCGTC
SekRep2F	GGGGGGAAAGGAAGCGAAT
SekRep3F	GGCTATTAAATACTAAAGCTAGAAATTTTGGAT
psekF	GGCTTTTATAATATGAGATAATGCCGAC
psekAcc65I	TGGCTATCAATCAAAGCAACACGT
Lp_GroEl_f	TGGGGTTGCCGTTGTTCGTGTC
Lp_GroEl_r	CTTCTTCAACGGCGGCCCGAG
Lc_GroEl_f	ACGTCACAGCCGGCGCTAAC
Lc_GroEl_r	AGCAGCCACTTGGGCAATGGC
Lb_GroEl_f	TGAAGAACGTCCTGCTGGGGCTA
Lb_GroEl_r	AGCGGCACCAGTCGCCTTTT
Lg_GroEl_f	AGGTGCTGGCTCAAAGGATGCAA
Lg_GroEl_r	ACAGCAACACCACCAGCAAGCT
Lr_GroEl_f	ACGGTCGAAGTCGCTGGTTCG
Lr_GroEl_r	AGGCCGTGCAGGCAAGGTTAC
EryR_f	CCGTGCGTCTGACATCTAT
EryR_r	TGCTGAATCGAGACTTGAGTG

2.6 Primernes formål

Navn	Anvendelse
SekRepF	Forward(F)- primer for PCR-kontroll og sekvensering av insert i pSIP baserte vektorer med SH71 replikon til stede
RepR	Reverse(R)- primer for PCR-kontroll av insert i pSIP baserte vektorer med SH71 replikon til stede
Fussh71F	F- primer til oppamplifisering av genet for SH71replikon (in fushion)
Fussh71R	R- primer til oppamplifisering av genet for SH71replikon (in fushion)
SekrepF1	Sekvensering av SH71replikon- genet i pSIP baserte vektorer
SekRep2F	Sekvensering av SH71replikon- genet i pSIP baserte vektorer
SekRep3F	Sekvensering av SH71replikon- genet i pSIP baserte vektorer
psekF	F- primer for sekvensering av SP'er i pSIP baserte vektorer
psekAcc65I	Sekvensering av SP'ene i pSIP baserte vektorer
Lp_GroEl_f	F-primer til genet for Gro-EL i <i>L. plantarum</i> (RT-PCR)
Lp_GroEl_r	R-primer til genet for Gro-EL i <i>L. plantarum</i> (RT-PCR)
Lc_GroEl_f	F-primer til genet for Gro-EL i <i>L. curvatus</i> (RT-PCR)
Lc_GroEl_r	R-primer til genet for Gro-EL i <i>L. curvatus</i> (RT-PCR)
Lb_GroEl_f	F-primer til genet for Gro-EL i <i>L. brevis</i> (RT-PCR)
Lb_GroEl_r	R-primer til genet for Gro-EL i <i>L. brevis</i> (RT-PCR)
Lg_GroEl_f	F-primer til genet for Gro-EL i <i>L. gasseri</i> (RT-PCR)
Lg_GroEl_r	R-primer til genet for Gro-EL i <i>L. gasseri</i> (RT-PCR)
Lr_GroEl_f	F-primer til genet for Gro-EL i <i>L. rhamnosus</i> /GG (RT-PCR)
Lr_GroEl_r	R-primer til genet for Gro-EL i <i>L. rhamnosus</i> /GG (RT-PCR)
EryR_f	F- primer til genet for erytromycinressistens i pSIP-vektor (RT-PCR)
EryR_r	R- primer til genet for erytromycinressistens i pSIP-vektor (RT-PCR)

2.7 Bakteriestammer

Bakterieart	Stamme	Referanse
<i>Escherichia coli</i>	<i>T.G.I.</i>	Kjøpt av Statagene
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>IL1403</i>	GS samling til LMGT*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>WCFS1</i>	Kleerebezem et al. 2003
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>DSM20019</i>	Nofirma, Ås**
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>DSMZ20556</i>	Nofirma, Ås**
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>ATCC33323T</i>	Nofirma, Ås**
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>ATCC53103/LGG</i>	Valio, Helsinki, Finland
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>ATCC4356</i>	Nofirma, Ås**

*Stamme fått av Ingolf Nes

**Stamme fått av Lars Axelsson

2.8 Plasmider

Plasmider	Referanse
pSIP411	Sørvig et al, 2005
pLp0373NucA	Mathiesen et al, 2009
pLp3050NucA	Mathiesen et al, 2009
pLp2578NucA	Mathiesen et al, 2009
pLp0373sh71NucA	Dette studiet
pLp3050sh71NucA	Dette studiet
pLp2578sh71NucA	Dette studiet
pEV	Lasse Fredriksen, 2010

2.9 Kit

Kit	Leverandør
NucleoSpin® Plasmid miniprep Kit:	
Solution A1 (Resuspension buffer)	
Solution A2 (Lysis buffer)	
Solution A3 (Neutralization buffer)	
Wash Buffer AW	
Solution A4 (Precipitation buffer)	
Wash buffer	
AE (Elution buffer)	Machery Nagel
NucleoSpin® Extract II kit:	
Buffer NT – oppløsende og DNA- bindende buffer	
Buffer NT3 – vaskebuffer	

Buffer NE – elueringsbuffer	Macherey-Nagel
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: BigDye® Terminator v3.1 Ready reaction Premix BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (x5)	Applied Biosystems
SeeDNA kit: SeeDNA™ co-precipitant 3 M Sodium acetate, pH 5.2	GE Healthcare
ABI Prism 3100 BigDye Terminator Cycle	Applied Biosystems
Quant- iT™ dsDNA HS Assay kit: Qubit™ Assay rør Quant-iT™ buffer Quant-iT™ reagent Quant-iT™ standard 1 og 2 Qubit™ fluorometer	Invitrogen
NuPAGE® LDS kit: buffer reducing agent NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels (10%)	Invitrogen
Pierce® Silver Stain kit Sensitizer Farge Forsterkningsmiddel Fremkallingsmiddel	Thermo scientific
Western blott kit: iBlot Dry Blotting system maskin iBlot™ Transfer, Regular or Mini iBlot™ Cathode iBlot™ Anode iBlot™ svamp iBlot™ Filter Paper iBlot™ Gel Transfer Device Blotting rule	Invitrogen
Nitrocellulose membrane, 0.4 µm pore str	Invitrogen
Film: CL-XPosure™ 18x24 cm	Kodak
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrat kit: Stable Peroxide Solution Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce

2.10 Vekstmedium

GM17	37,25g M17 dH ₂ O opptil 1 liter Autoklavert ved 121 °C Tilsatt sterilfiltrert glucose til 0,5% Ved agarskåler: +15g Agar Autoklavert i trykkoker i 15minutter ved 115 °C Erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10µg/ml ved ca. 60°C
M.R.S (Man,Rogosa,Sharpe)	52 g MRS dH ₂ O opptil 1 liter Autoklavert i trykkoker i 15 minutter ved 115°C Agarskåler: +15g Agar Autoklavert i trykkoker i 15minutter ved 115 °C Erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 5µg/ml ved ca. 60°C
MRSSM	52g MRS 171g 0,5M Sukkrose 2g 0,1M MgCl ₂ x6H ₂ O dH ₂ O opptil 1 liter Sterilfiltrert med 0,22µm pore- størrelse
LB (Luria- Bertani)	10g Bacto trypton 5g Bacto gjærekstrakt 10g NaCl dH ₂ O opptil 1 liter Autoklavert ved 121 °C Agarskåler: +15g Agar Autoklavert i trykkoker i 15minutter ved 115 °C Erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 150µg/ml ved ca. 60°C
SOC medium	20g Bacto™ Trypton 5g Bacto gjærekstrakt 0,5g 1M NaCl 0,02g 1M KCl dH ₂ O opptil 1 liter Sterilfiltrert med 0,22µm pore- størrelse

SR agarskåler	10g Bacto trypton 5g Bacto gjærekstrakt 25g gelatin 15g agar 2,5mM MgCl ₂ 2,5mM CaCl ₂ 200g sukrose (tilsettes sterilfiltrert etter autoklaving) 10g glukose (tilsettes sterilfiltrert etter autoklaving) dH ₂ O opptil 1000ml Autoklavert ved 121 °C Erytromycin tilsatt til en konsentrasjon på 10µg/ml ved ca. 60°C
SGM17	GM17 medium(se over) 0,5M sucrose (sterilfiltrert før tilsetting)
SGM17 m/glycine	SGM17 medium (se over) 1,8 % glycine (sterilfiltrert før tilsetting)

2.11 Buffere og reagenser

Buffer/reagens	Innhold
Vaskeløsning for Silver Stain	10 % etanol
Fikseringsløsning for Silver Stain	30 % etanol 10 % acetic acid
Stoppløsning for Silver stain	5 % acetic acid
GTE	50mM glukose 25mM Tris-HCl, pH8 10mM EDTA, pH8
TAE (Tris-acetat med EDTA) 50X	242g Tris base 57,1ml acetic acid 100ml 0,5M EDTA(pH8) dH ₂ O opptil 1 liter
TE	30mM Tris-HCl, pH 8 1mM EDTA pH 8
TEN	10mM Tris- HCl, pH 8 1mM EDTA, pH 8 100mM NaCl
TBS	0,150M NaCl 0,01M Tris- HCl, pH 8
TTBS	TBS med 0,1% Tween 20
Washing buffer	5mM Na- fosfat 1mM MgCl ₂ , pH 7,4
MOPS buffer	100ml 20 x Mops dH ₂ O opptil 2L
E- buffer	0,9M Sucrose 3mM MgCl ₂ , pH 7,4

3. Metoder

3.1 Dyrking av bakteriestammene

Ved bruk av bakterier til genuttrykk, ønsker man optimal vekst hos bakterien for å få mest mulig av ønsket genprodukt. Bakterier trenger forskjellige vekstbetingelser på grunn av ulik metabolisme, og man har derved kommet fram til ulike medium for ulike bakterier. I dette studiet har både *L. lactis*, *E. coli* og fem lactobacilli arter blitt brukt som vertstammer for vektorer og til protein produksjon. Som en kvalitetssikring for at kun celler med vektor vokser opp ble erytromycin antibiotika tilsatt mediet (vektorene inneholder et erytromycin- resistens gen).

Lactococcus lactis IL1405 ble dyrket i GM17 medium, både i flytende form og på agar- skåler, og innkubert på 30 °C over natt uten risting. Inkubasjonstid ble forlenget til 2-3 døgn ved dyrking på agar. Erytromycin ble tilsatt mediet til en konsentrasjon på 5µg/ml.

E. coli TG1 ble dyrket i LB medium, både i flytende form og på agarskåler, og innkubert på 37 °C over. Væskekulturer ble innkubert med risting. Erytromycin ble tilsatt til en konsentrasjon på 150µg/ml.

Lactobacillus plantarum WCFS1, *L. gasseri* ATCC33323T og *L. rhamnosus* ATCC53103/LGG ble alle dyrket i MRS medium, både i flytende form og på agarskåler, og innkubert på 37 °C over natt, uten risting. Inkubasjonstid ble forlenget til 2-3 døgn ved dyrking på agar. Erytromycin ble tilsatt til en konsentrasjon på 5µg/ml.

L. curvatus DSM20019 og *L. brevis* DMSZ20556 ble dyrket i MRS medium, både i flytende form og på agarskåler, og innkubert på 30 °C over natt, uten risting. Inkubasjonstid ble forlenget til 2-3 døgn ved dyrking på agar. Erytromycin ble tilsatt mediet til en konsentrasjon på 5µg/ml.

3.1.1 Lagring av bakteriene

Det ble laget ”glycerolstock” av alle bakteriestammer. 300 µl 85 % glyserol ble tilsatt 1ml fersk, overnatts bakteriekultur og blandingen ble lagret umiddelbart ved -80 °C. Glyserol hindrer cellene i å sprekke ved nedfrysing og opptining. Videre dyrking fra glyserolstock ble utført ved å stikke en autoklavert tannpirker i glyserolstocken og deretter legge den i egnet medium under sterile forhold.

3.2 Isolering av plasmid

Isolering av plasmid ble gjort fra *E. coli*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus*. For å isolere plasmid ble Nucleospin Plasmid Miniprep Kit benyttet. I denne prosedyren lyses cellene med SDS, før genomisk DNA og proteiner felles ut med et reagens (løsning III), så man sitter igjen med plasmidet i supernatanten. Litt av eluatet ble analysert ved hjelp av agarose gel elektroforese for å sjekke mengden isolert DNA. Ved DNA isolering fra Gram-positive bakterier ble det før start foretatt en tidligere utformet forbehandling av cellene for å gjøre celleveggen mer permeabel.

3.2.1 Isolering av plasmid fra *E. coli* TG1

Nucleospin Plasmid Miniprep Kit;

Materialer:

Resuspensjonsløsning A1

Lysis løsning A2

Presipiterende og nøytraliserende løsning A3

Vaskebuffer AW

Vaske buffer A4 med etanol

Elueringsbuffer AE

2ml rør med tilhørende kolonner

Prosedyre:

- 1ml bakteriesuspensjon ble sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt for å isolere cellene.
- Supernatant (SN) ble helt av og 250µl av resuspenderingsbuffer A1 ble tilsatt og blandet ved opp- og- ned- pipettering.
- 250 µl av lysisbuffer A2 ble tilsatt for og lysere cellene. Dette ble blandet ved å snu røret opp- ned 6-8 ganger og innkubert ved rom temperatur (RT) til lysatet var blankt eller opptil maksimalt 5min.
- 300 µl av presipiteringsbuffer A3 ble tilsatt for å bli kvitt cellekomponenter og nøytralisere løsningen. Blandingen sjedde ved å snu røret opp ned 6-8 ganger.
- Det ble dannet et hvitt presipitat i suspensjonen som også inneholder av cellekomponentrester og annet. Uløselige materiale ble sentrifugert ned ved sentrifugering ved 11 000 x g i 5-10min til lysatet var helt klart igjen. Lysatet ble med videre. Pelleten ble kastet.
- Lysatet ble pipettert over i en ren ”miniprep- kolonne” plassert i et 2ml rør og sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt.

DNA sitter fra dette steg igjen i membranen i kolonnen fram til elueringen på slutten av prosedyren. All væske kastes derfor for hver sentrifugering framover, helt fram til siste punkt i prosedyren.

- 500 µl vaskebuffer AW (oppvarmet til 50 °C) ble kjørt gjennom kolonnen ved sentrifugering i 1 min for å vaske bort eventuelle nukleaser og annet rusk.
- 600 µl vaskebuffer A4 med etanol ble kjørt gjennom ved sentrifugering 1minutt for å vaske bort annet rusk.
- Kolonnen ble så sentrifugert i ytterligere 2 min for å bli kvitt rester av etanol.
- Til slutt ble det tilsatt 50 µl elueringsbuffer AE (oppvarmet til 70 °C), og kolonnen ble innkubert i 1 minutt før DNA ble eluert ut i et ependorfrør ved sentrefugering ved 11000 x g i 1 minutt.

3.2.1.1 Etterbehandling av *E. coli* TG1

E. coli TG1 ble behandlet med trypsin for å degradere nukleaser. Dette for å hindre stort tap av plasmid- DNA for videre analyse.

Materialer:

Trypsin
Plasmid DNA

Prosedyre:

- 2 µl trypsin ble tilsatt 50 µl isolert plasmid og blandingen ble innkubert i vannbad ved 37 °C i 1,5 time(maksimalt 2 timer).
- Plasmidet ble direkte tilsatt restreksjonsenzymmer og videre innkubert i vannbad, eller lagret ved -20 °C til senere analyse.

3.2.2 Isolering av plasmid fra *Lactococcus lactis* og *Lactobacillus spp.*

Gram positive bakterier ble forbehandlet før bruk av Nucleo Spin Plasmid Miniprep Kit for å gjøre det tykke laget med peptidoglykan i celleveggen med permeabelt. Dette ble oppnådd ved bruk av lysozym og mutanolysin som kutter bindinger i celleveggen.

Materialer: Oppskrift for kjemikalier: se "buffer og reagens", avsnitt 2.10

GTE- buffer

Lysozym 100mg/ml

Mutanolysin 5000 U/ml i 0,1 M K- fosfat buffer, pH6,2. Filtersterilisert.

RNase 10mg/ml, kokt i 10-20 min og avkjølt for renaturering (eliminere eventuelle DNaser).

Prosedyre:

- 10ml bakteriesuspensjon ble sentrifugert ved 5200 x g i 7 min for å isolere cellene.
- Supernatant (SN) ble kastet og pelleten ble vasket med 500µl GTE- buffer ved opp- og- ned pipettering og sentrifugering. SN med rester av medium ble kastet.
- Cellepelletten ble resuspendert i 100 µl GTE- buffer, 120 µl lysozym (100mg/ml), 5 µl mutanolysin (5000U/ml) og 25 µl RNase (10mg/ml), som ga et sluttvolum på 300 µl. Denne blandingen ble innkubert i vannbad i 37 °C i minst 1 time. I løpet av innkuberingen ble det blandet av og til ved hjelp av en Vortex.
- Resten av DNA- isoleringen ble gjort ved hjelp av Nucleospin Plasmid Miniprep Kit fra punktet der løsning A2 ble tilsatt (se 3.2.1). DNA ble eluert ut i 30 µl elueringsbuffer i stedet for 50 µl.

3.3 Kutting av plasmid og ligering av DNA- fragmentene

3.3.1 Kutting med restriksjonsenzym

Restriksjonsendonukleaser er enzymer som kutter dobbeltrådet DNA på spesifikke steder. Dette resulterer i lineære DNA- fragmenter med kjente sekvenser i endene. DNA- fragmentene kan ligeres med ønsket dobbeltrådet DNA- fragment med korresponderende sekvenser i endene (som følge av kutting med samme enzymer). For at restriksjonskuttingen skal bli vellykket må flere faktorer innfris. En buffer må tilsettes reaksjonen som tilfredsstillere det enkelte enzymets krav til bl.a. pH og saltinnhold. Videre må riktig temperatur for optimal aktivitet benyttes. I tillegg er det mange enzymer som trenger tilstedeværelse av et hjelpestoff for å fungere optimalt, slik som f.eks BSA som ble benyttet her.

Materialer:

NEBuffer 3

Restriksjonsenzym: Acc65I og BamH1

Kofaktor BSA (Bovine Serum Albumin, fortynnet 1:10)

Innskudd (pSip411)

Vektor (plp0373NucA, plp3050NucA, plp2578NucA)

Prosedyre:

To separate reaksjoner ble satt opp, én for å produsere innskudd fragment og én for å orodusere vektoren. Reaksjonene ble innkubert i vannbad ved 37 °C i 2- 2,5 timer. De samme to enzymer ble brukt i begge reaksjonene for å få kompatible ender for senere ligering. Plasmid med innskuddsfragment ble kuttet i større mengde fordi innskudd-DNA tilsettes tre ganger mer enn vektor-DNA fordi det er et mye mindre fragment. Etter endt reaksjon ble DNA fragmentene umiddelbart kjørt på gel elektroforese (se avsnitt 3.3.2). Mengde plasmid og andre komponenter brukt i kuttereaksjonen vises i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Reaksjonsblandinger for restriksjonskutting

Reagens	Innskudd(innskudd)	Vektor
Plasmid	36 µl	25 µl
Buffer 3	5 µl	5 µl
BSA(1:10)	5 µl	5 µl
Acc65I	2 µl	2 µl
BamH1	2 µl	2 µl
Sterilt dH ₂ O	0 µl	11 µl
Totalt	50 µl	50 µl

3.3.2 Agarose gel elektroforese

Agarose gel elektroforese er en separasjonsteknikk der man separerer DNA- molekyler etter størrelse i en agarosegel. Gelen plasseres i et elektromagnetisk felt der negativt ladet DNA vil vandre mot positiv pol (katoden) med en hastighet som avhenger av DNA molekylenes størrelse. DNA synliggjøres ved bruk av EtidiumBromid (EtBr) som har evne til å interkalere mellom baseparene i DNA- molekylet, og som gir fluorescence ved bestråling med UV lys. Man bruker DNA- standarder med kjent størrelse for å kunne fastslå størrelsen på DNA- molekylene som analyseres. I dette studiet ble agarose gel elektroforese brukt til å separere og identifisere DNA- fragmenter etter restriksjonskutting, til påvisning av PCR- produkter og til spesifisitetkontroll for primere benyttet til analysen for plasmid kopinumner per celle. Det ble brukt 1,2 % agarose geler til DNA- molekyler med størrelse > 1kb over 2 % agarose geler til DNA molekyler med størrelse < 1kb.

Materialer:

1L Agarose stock løsning: 12g Agarose
 1 L 1 x TAE- buffer
 Autoklaveres i trykk-koker på 115 °C
 Løsningen ble lagret i varmeskap ved 60 °C

10 mg/ml Etidium Bromid (EtBr)
1 x TAE buffer (oppskrift: se ”buffer og reagenser”)
Loading buffer (6 X)
DNA- standarder (Ladder)
Støpekar med brønnekam
Elektrisk felt

Prosedyre:

- 60ml Agarose stockløsning (60 °C) ble tilsatt Etidium Bromid til en konsentrasjon på 0,5µg/ml.
- Gel- løsningen ble helt over i et støpekar med brønnekam og satt til stivning i minst 30min.
- Stivnet gel ble satt i elektroforesekammer fylt med 1 X TAE- buffer.
- Egnet DNA standard ble applisert i første brønn.
- DNA- løsninger ble tilsatt 0,1 volum av loading buffer og applisert i resterende brønner.
- Kammeret ble lukket og påført strøm med en spenning på 90V i 30-45 min.
- DNA- båndene ble visualisert ved hjelp av UV- lys i en GelDoc maskin fra BioRad.
- Ved separering av DNA- fragmenter etter kutting ble ønsket fragment skjært ut vha skalpell og rensset med nucleospin extract II (se neste avsnitt). Evt. ble fragmentene fryst ned ved -20 °C over natt før isolering.

3.3.3 Ekstraksjon av DNA fra agarose gel

Etter gel elektroforese sitter DNA- molekylene i gelen og kan isoleres ut. Dette ble gjort vha et kit, Nucleospin® Extract II fra Macherey-Nagel.

Materialer:

NucleoSpin® Extract II kit;
Buffer NT –opløsende og DNA- bindende buffer
Buffer NT3 med etanol - vaskebuffer
Buffer NE –elueringsbuffer
2ml rør med tilhørende kolonner

Prosedyre:

- Gelbiten ble skjært ut av gel og lagt i et reagensrør.
- Det ble tilsatt 200µl NT- membranbindingsbuffer per 100mg agarose og blandingen ble satt til innkubering i et vannbad ved 50 °C for å løse opp gelen (5-10min). Blandingen ble mikset hvert femte minutt ved hjelp av en Vortex.
- Etter all agarose var oppløst ble løsningen tilsatt en "Gel-Extract-kolonne", etterfulgt av sentrifugering ved 11 000 x g i 1 min. DNA skal nå sitte i kolonmembranen og væske i oppsamlingsrør ble kastet.
- DNA ble vasket ved å tilsette den samme "Gel-extract-kolonne" 600 µl NT3 buffer og blandingen ble sentrifugert på 11 000 x g i 1 min.
- Kolonnen ble sentrifugert i ytterligere 2 min for å bli kvitt eventuelle etanolrester fra NT3 bufferen.
- DNA ble eluert ut i rent ependorfrør ved tilsetning av 30- 50 µl NE- buffer. Etter inkubasjon ved romtemperatur i 1 min ble det sentrifugert ved 11 000 x g i 1 min. Alt arbeid ble gjort på is.

3.3.4 Felling av DNA med See DNA

For å øke konsentrasjonen på DNA i tilfeller der liten mengde ble isolert, ble DNA felt ut og resuspendert i et mindre volum. Dette ble utført ved bruk av SeeDNA™ fra GE Health Care som er rosa fargede partikler konstruert spesifikt for RNA eller DNA presipitering. Disse festes til DNA og muliggjør visualisering av DNA- pelet. Felling ble utført på innskudds- DNA- fragmentene etter kutting. Dette pga lav konsentrasjon på innskudds- DNA fra *E. coli* TG1- celler, antagelig pga høy nukleaseaktivitet.

Materialer:

SeeDNA™kit:

SeeDNA kuler

3M Natriumacetat, pH 5,2

Etanol (70 og 95 %)

TE- buffer

Prosedyre:

- Løsningene ”SeeDNA” ble romtemperert og blandet godt før bruk
- 2 µl seeDNA ble tilsatt 50 µl DNA
- 0,1 volum av 3M sodium acetat ble tilsatt og blandet godt
- 2 volum av 95 % etanol ble tilsatt og vortexet
- Reaksjonsblandingeb ble innkubert i romtemperatur i 2 min
- Etter sentrifugerte i 5 min ved 16 000 x g ble supernatant samlet
- Den rosa pelleten ble vasket med 500 µl 70 % etanol, vortexet og sentrifugert ved 16 000 x g
- All supernatant ble fjernet og prøven ble tørket i 30min med åpent lokk i sterilskap
- Pelleten ble løst i 8- 15 µl TE- buffer

3.3.5 Konsentrasjonsbestemmelse av DNA

DNA konsentrasjoner ble bestemt før ligering ved bruk av Quant-iT™ HS Assay.

Materialer:

Qubit™ Assay rør
Quant-iT™ buffer
Quant-iT™ reagent
Quant-iT™ standard 1 og 2
Qubit™ fluorometer

Prosedyre:

- Quant-iT™ reagent ble fortynnet 1:200 med Quant-iT™ buffer. En stokkløsning ble laget med 200 µl til hver prøve.
- 1 µl prøve ble tilsatt 199 µl av reagent løsning og innkubert i 2 min ved romtemperatur.
- 10 µl standard 1 og 2 ble tilsatt 190 µl hver av reagentløsningen og innkubert i 2 min ved RT.
- Qubit™ fluorometer ble kalibrert vha standard 1 og 2.
- Absorbans ble målt konsentrasjon ble målt ved hjelp av Qubit™ fluorometer.

3.3.6 Ligering av DNA- fragmenter

Ligering er en enzymatisk reaksjon der DNA ligaser reparerer ”sukker- fosfat ryggraden” i DNA ved å danne kovalente fosfodiesterbindinger mellom ledige 5'- fosfat- og 3'- hydroksyl- ender. Både ATP og Mg²⁺ (fins i bufferen) er nødvendige kofaktorer for at ligering skal skje. Konsentrasjon på vektor og innskuddet ble sjekket på forhånd vha Qubit™ Assay. Mengdeforholdet mellom vektor og innskudd ble regnet ut vha kalkulator på www.clontech.com. Dette er en kalkulator opprinnelig laget for In Fusion- ligering der det tas hensyn til den ulike lengden på DNA- fragmentene i tillegg til de ulike konsentrasjonene.

Materialer:

Enzym: T4- ligase (fra T4 bakteriofag), Biolabs

Buffer: T4- ligase reaksjonsbuffer x 10, Biolabs

DNA: ferdig kuttet og rensset vektor og innskudd

Prosedyre:

- Ligeringsreaksjoner ble satt opp med mengdeforhold på innskudd og vektor på 3:1. Siden konsentrasjonen på DNA varierte ble dette tatt hensyn til i regnestykke nedenfor, både for innskudd-DNA og vektor-DNA.

Utregning (www.clontech.com):

$\text{DNA}(\text{ng})/\text{konsentrasjon av DNA} (\text{ng}/\mu\text{l}) = x \mu\text{l DNA til ligering (vektor eller innskudd)}$

- 2 μl T4 ligase ble tilsatt reaksjonen og 4 μl T4 ligase buffer ble tilsatt reaksjonen. (T4- enzym og buffer ble økt til dobbel mengde for å kompensere for uttynningen i reaksjonen pga høyt utregnet volum grunnet lav konsentrasjon på DNA.)
- Religeringskontroll ble satt opp tilsvarende (samme mengde vektor-DNA) hvor dH_2O ble erstattet med utregnet volum for innskudd-DNA.
- Reaksjonene ble innkubert i 2 timer ved RT eller over natt ved 16 °C selv om kohesive ender kan ligeres på 10min. Dette for å sikre optimale forhold for enzymet da ligeringen var noe problematisk.

3.3.7 Drop Dialysis

For å unngå at det smeller ved senere elektroporering, pga saltioner i prøvematerialet, ble Drop Dialyse utført på alle ligeringsmikser før elektroporering. Dette vil eliminere eventuelle saltioner ved at salter diffunderer gjennom membranen og ut i bufferen (TE- buffer inneholder ikke saltioner).

Materialer:

Dialysemembran

TE- buffer

Ligeringsreaksjonsuspensjon

Prosedyre:

- Dialysemembranen ble lagt flytende oppå TE- buffer i en ren skål, hvor overflaten på membran ble holdt tørr.
- Ligeringsmiksen ble applisert i midten på membran og innkubert i RT i 30 min for at saltionene kan diffundere gjennom membran og ut i TE- buffer.
- Ligeringsmiksen ble samlet fra den ellers tørre membran overflaten og benyttet til transformasjon til ulike cellevarter ved elektroporering.

3.4 Lagning av elektro- kompetente celler

For at enkelte Gram positive bakterier skal kunne ta opp fritt DNA må det tykke peptidoglykanlaget i celleveggen behandles fordi det kan være en fysisk barriere ved gjennomtrengning av DNA (Beveridge 1981). Dette ble gjort ved å la cellene vokse i medium tilsatt glycine, som i celledelingen vil ta plassen til L- alanin i celleveggen, som fører til en mer permeabel cellevegg. Prosedyren benyttet for *L. lactis* er hentet fra Holo og Nes (1989) (Holo & Nes 1989). Prosedyren benyttet for lactobacilli er hentet fra Aukrust et al (1995) (Aukrust et al. 1995), med noen små justeringer for *L. gasseri* og *L. rhamnosus* (se 3.4.3).

3.4.1 Lagning av elektrokompetente *Lactococcus lactis*

Materialer:

GM17 medium
0,5M sucrose
SGM17 medium
SGM17 med 1,8 % glycine
85 % glycerol

Prosedyre:

- *L. lactis* ble dyrket over natt i 10ml GM17 uten antibiotika på 30 °C.
- Bakteriesuspensjonen ble fortynnet 100 ganger i GM17 og innkubert i 30 °C til en OD₆₀₀ 0,5 (ca 4 timer)
- En rekke med 10ml SGM17 med ulike konsentrasjoner av glycine (1,4 – 2,4 %) ble satt opp (se tabell 3.2 neste side).

Tabell 3.2. Fortynningsrekke av SGM17 medium med ulike konsentrasjoner av glycine

Glycine kons (%)	20% Glycine (µl)	SGM17 (µl)
1,4	700	9300
1,6	800	9200
1,8	900	9100
2,0	1000	9000
2,2	1100	8900
2,4	1200	8800

- 100µl av bakteriekulturen på OD₆₀₀ 0,5 ble tilsatt hvert rør i fortynningsrekken og kulturene ble innkubert over natt i 30 °C.
- OD₆₀₀ ble målt i alle kulturene og reagensrøret med høyest glycine- innhold med OD₆₀₀ 0,3 - 0,4 ble plukket ut. etter avkjøling på is i 5 min ble cellene høstet ved sentrifugering på 5500 x g i 5 min på 4 °C.
- Supernatant ble kastet og pellet ble vasket 3 ganger med 15ml iskald 0,5M sukrose og sentrifugert mellom hver vask ved 5500 x g i 2 min ved 4 °C.
- Pelleten ble løst i 350 µl iskald 0,5M sukrose med 10 % glycerol. Løsningen ble fordelt i ependorfrør med 40 µl per porsjon.
- Cellene ble lagret på -80 °C eller brukt direkte til transformering.

3.4.2 Lagning av elektrokompetente *L. plantarum*, *L. curvatus* og *L. brevis*

Materialer:

MRS medium

2 x MRS(dobbel konsentrasjon av MRS)

20 % glycine

1mM MgCl₂

Sterilfiltrert PEG₁₄₅₀

TEN- buffer

Prosedyre:

- Lactobacilli-celler ble hentet fra den aktuelle ”glyserolstocken” og lagt over i 10ml MRS ved hjelp av en autoklavert tannpirker. Suspensjonene ble innkubert over natt ved 30 °C.
- En 10 X fortynningsrekke ble laget av overnattskulturen tilsatt ferskt medium og suspensjonene ble innkubert over natt ved i 30 °C. Dette ble gjort for å forsikre seg om å få celler i den eksponesielle fasen neste dag.

- 5- 10ml av bakteriesuspensjonen ble tilsatt 20ml 2 x MRS, 5ml 20 % glycine og 5- 10ml sterilt dH₂O i et 50ml "Cellstars"- rør (totalt= 40ml) og innkubert i 30 °C til en OD₆₀₀ ~1.
- Ved OD₆₀₀ □ ~1 kjøles røret på is i 5min og sentrifugeres deretter ved 5200 x g ved 4 °C i 5 min.
- Supernatant ble kastet og cellene ble vasket med 10ml TEN- buffer og sentrifugert ved 5200 x g ved 4 °C i 5 min.
- Supernatant ble kastet og cellene ble vasket med 40ml MgCl₂ (1mM)og sentrifugert ved 5200 x g ved 4 °C i 5 min.
- Supernatant ble kastet og cellene ble vasket med 5ml 30% PEG₁₄₅₀ og sentrifugert ved 6000 x g ved 4 °C i 10 min.
- Supernatant ble kastet og pelleten ble resuspendert i 400µl 30 % PEG₁₄₅₀ (ca 1% av høstningsvolum)og fordelt i kalde ependorfrør med 50µl per porsjon.
- Cellene med umiddelbart fryst på -80 °C.

3.4.3 Lagring av elektrokompetente *Lactobacillus gasseri*, *L. acidophilus* og *L. rhamnosus*

Materialer:

MRS medium

2 x MRS (dobbel konsentrasjon av MRS)

20 % glycine

"Vaskebuffer" (5mM Na- fosfat, 1mM MgCl₂ , pH 7,4)

E- buffer (0,9M sucrose, 3mM MgCl₂ , pH 7,4)

Prosedyre:

- Samme prosedyre som for *L. plantarum* (se 3.4.2) t.o.m fjerde punkt.
- Cellene ble vasket tre ganger i "Vaskebuffer"(5mM Na- fosfat, 1mM MgCl₂, pH 7,4) og løsningen ble sentrifugert på 5200 x g ved 4 °C i 5 min.
- Supernatant ble kastet og cellepelleten ble resuspendert i E- buffer (0,9M sucrose, 3mM MgCl₂, pH 7,4), ca 1 % av høstningsvolum (40ml=400µl) av E- buffer.
- Cellene ble fordelt i kalde ependorfrør med 50 µl per porsjon og umiddelbart fryst i – 80 °C.

3.4.4 Lagring av elektrokompetente *Lactobacillus spp.* ved dyrking i medium med høy saltkonsentrasjon

Lactobacillus acidophilus, *L. gasseri* og *L. rhamnosus* ble forsøkt gjort kompetente ved bruk av en ny metode beskrevet av Palomino et al (2010) (Palomino et al. 2010), hvor cellene dyrkes i en hypertontisk NaCl innholdende medium (høyere osmotisk press) for å gjøre celleveggen svakere. Det har før blitt sett sensitivitet til lysis ved dyrking i høy saltkonsentrasjon, og dette er antagelig

forårsaket at peptidoglykanlaget har færre kryssbindinger (Piuri et al. 2005). Dette er en enkel og billig metode for oppnåelse av elektrokompetente celler. For å unngå unødig stress for cellen ble cellene dyrket anaerob fordi cellelysis forekommer hyppigere ved dyrking i høy saltkonsentrasjon.

Materialer:

MRS x 2 (dobbel kons)
2M NaCl
Sterilt dH₂O

Prosedyre:

- Celler fra glyserolstock av aktuell art ble innokulert i 10ml MRS i 37 °C over natt (ca18 timer).
- 0,5ml bakteriesuspensjon ble overført til 49,5 ml MRS med 0,9M NaCl (22,5 ml 2M NaCl og 27ml MRS x 2). Kulturen ble innkubert anaerobt ved 37 °C til en OD₆₀₀ på 2-2,5 (ca20timer).
- Cellene ble kjølt på is i 10min for å stoppe vekst
- Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 5200 x g i 5min
- Supernatant ble kastet og cellepelleten ble vasket 3 ganger med iskald sterilt dH₂O med sentrifugering mellom hver vask ved 5200 x g i 5min. Siste sentrifugering ble gjort ved 6000 x g i 7- 10 min.
- Supernatant ble kastet og cellepelleten ble løst i 500µl iskald sterilt dH₂O og fordelt i kalde ependorfrør på 50µl per porsjon.
- Cellene ble lagret på -80 °C fram til bruk.

3.5 Transformering av celler

Elektroporering er en mye brukt metode til transformasjon av Gram-positive bakterier. Under elektroporering dannes midlertidige hull i celleveggen og cellemembranen ved at det kjøres elektriske støt gjennom cellen (Miller 1994; Potter 1988). I et elektrisk felt vil negativt ladet DNA- molekyl alltid vandre mot positiv pol og dermed være i bevegelse. DNA molekyl som plasmid vil dermed kunne penetrere de kompetente cellene. Etter elektroporering ble det selektert for transformanter ved å dyrke cellene på erytromycinholdige agarskåler.

Materialer:

Kyvetter
SGM17/MRSM/MRS/S.O.C- medium
”Electroporator” fra BioRad
Elektrokompetente celler
Plasmid- DNA
Agarskåler

Prosedyre:

Nedenfor følger en generell beskrivelse av transformeringsprosedyren. For detaljer, herunder innstilling på elektroporeringsmaskinen og vekstbetingelser, henvises det til tabell 3.3 på neste side.

- 15-20 μl (*E. coli*: 5 μl) iskald ligeringsmix og 50 μl (*E. coli*: 40 μl) kalde, ferske (evt. nytinte) elektrokompetente celler ble blandet forsiktig med pipettespiss og ført over til en iskald kyvette.
- Kyvetten ble umiddelbart satt i elektroporeringsmaskinen med passende innstillinger for bakteriestammen, og det ble sendt en elektrisk puls gjennom kyvetten.
- Kyvetten ble umiddelbart tilført egnet oppvarmet medium og innkubert i egnet temperatur i minst 2 timer.
- Hele cellesuspensjonen ble sådd ut på passende agarskåler (250 μl på hver skål) og skålene ble innkubert i varmeskap i 1-3 døgn ved passende temperatur.
- Kollonier ble plukket ved hjelp av en autoklavert tannpirker under sterile forhold og ble kjemisk lysert (se 3.2.2)
- Spesifikke primere for plasmidet ble tilsatt (se kapitel 3.6) og oppamplifisert ved bruk av PCR (Polymerase Chain Reaction).
- PCR- produkt ble størrelseskontrollert ved hjelp av gel elektroforese (se 3.3.2)
- Glyserolstock ble laget av fersk bakteriesuspensjon (se 3.1.1) fra samme koloni og fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabell 3.3. Oversikt over innstillinger og vekstbetingelser under og etter elektroporering

Bakteriestamme	Innstillinger	Medium og innkubering rett etter elektroporering	Agarskåler og innkubering
<i>E.coli TG1</i>	Kyvette: 1mm Capacitance: 25µF Volt: 1,7kV Resistance: 200ohms	750 µl S.O.C 1 time resting ved 37 °C	LB- skåler med 150µg/ml erytromycin 1-2 døgn ved 37 °C
<i>L. Lactis</i>	Kyvette: 2mm Capacitance: 25µF Volt: 2,0kV Resistance: 200ohms	700 µl SGM17 2-4 timer ved 30 °C	GM17- skåler med 10µg/ml erytromycin 2-3 døgn ved 30 °C.
<i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. brevis</i>	Kyvette: 2mm Capacitance: 25µF Volt: 1,5kV Resistance: 400ohms	450 µl MRS 2-4 timer ved 30 °C	MRS- skåler med 5µg/ml erytromycin 2-3 døgn ved 30 °C.
<i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. gasseri</i>	Kyvette: 2mm Capacitance: 25µF Volt: 2,5kV Resistance:200/400ohms	450 µl MRS 2-4 timer ved 37 °C	MRS- skåler med 5µg/ml erytromycin 2-3 døgn ved 37 °C.

Kontroller:

Det ble som oftest utført to kontrolltransformasjoner: (1) transformering med religert vektor, for å sikre at religering ikke hadde forekommet & (2) en reaksjon uten tilsatt DNA (altså kun elektrokompetente celler) som en negativ kontroll på transformeringen. Kontrollene ble elektroporert parallelt med prøvene og dyrket på erytromycinholdige skåler.

3.6 "Polymerase Chain Reaction"

"Polymerase chain reaction" (PCR) er en metode man bruker for å amplifisere DNA *in vitro* fra minimale mengder DNA-templat. For å amplifisere ønsket DNA- sekvens tilsettes oligonukleotider (primere) som er designet til å være komplementær til hver ende av det DNA fragmentet man ønsker å amplifisere. Ved å tilsette byggestener, dNTPs, og en termostabil variant av enzymet, DNA polymerase, vil polymerisering av sekvensen mellom de to primere være mulig.

PCR- reaksjonen består av tre steg, som repeteres 25 til 35 ganger (avhengig av mengden templat).

Stegene er:

- *Denaturering* av templat- DNA på 95 °C
- *Hybridisering* av primere og templat på ca 55 °C (avhengig av GC- innhold i primere)
- *Polymerisering* skjer ved ca 72 °C

I dette studiet ble PCR brukt til kontroll av transformanter, sekvensering (se kapittel 3.7) og til plasmid kopinummer (PKN)- analysen (se kapittel 3.10). Taq polymerase, isolert fra *Thermus aquaticus*, ble benyttet for å utføre polymeriseringen av DNA- trådene.

Materialer:

DNA-templat

Forward og reverse primere

2 x Taq Master mix RED;

0,05 U/μl amplocon *Taq* DNA polymerase

Buffer (150mM Tris-HCl pH 8,5, 40mM(NH₂)₂SO₄, 3mM MgCl₂, Tween20)

0,4 mM dNTP (nukleotider)

Tilsatt rød farge og stabilisator

Evt dH₂O

Prosedyre:

- Reaksjonen ble satt opp i PCR-rør ifølge tabell 3.4 (under).

Tabell 3.4. Reaksjonsoppsett til vanlig PCR

Komponent	Volum	Sluttkonsentrasjon
2 x Taq Master mix RED	25μl	1 x
Primer RepR (10pmol/ μl)	2μl	0,4μM
Primer SekRepF (10pmol/ μl)	2μl	0,4μM
dH ₂ O	17μl	---
DNA- templat*	4 μl	Variierende
Total volum	50 μl	---

*DNA templat varierte mellom isolert plasmid og lyserte kolonier fra de 18 transformanter

- Løsningene ble blandet ved hjelp av en Vortex i 2-3 sekund og løsningene ble så sentrifugert på max fart i 10 sekunder.
- PCR- rørene ble satt i PCR- maskin, og egnet program for Taq polymerase ble stilt inn på maskinen. Innstillingene vises i tabell 3.5 på neste side.

Tabell 3.5. PCR-innstillinger

Temperatur	Trinn	Tid	Sykluser
94 °C	Initiering til denaturering	3min	1
94 °C	Detanurering	1min	25
53 °C*	Hybridisering	30sec	
72 °C	Polymerisering	2min**	
72 °C	Avslutning	10min	1
4 °C	Lagring	Uendelig	---

*Temperaturen varierer i forhold til primere brukt, ca 5 °C under smeltepunktet på primer.

**Tiden varierer ettersom hvor langt produkt som skal polymeriseres er. 1 min pr 1kb

3.7 DNA sekvensering

Enzymatisk DNA- sekvensering baserer seg på at DNA-polymerasen tilfeldig inkorporerer dNTP analoger, dideoksynukleotider (ddNTP), som mangler en fri OH-gruppe. Mangelen på OH- gruppen fører til at polymerisering blir terminert der ddNTP blir innkorporert av DNA polymerasen, og dette utnyttes til sekvensering (Sanger et al. 1977). Amplifisering av DNA- fragmenter av ulik lengde utføres ved hjelp av PCR- metoden der de fire ddNTPene tilsatt PCR- reaksjonen er merket med hver sin fluoriserende farge. Statistisk sett vil samtlige nukleotider i et PCR- produkt utgjøre fluorescensmerket 3'ende i løpet av reaksjonen. Sekvensbestemmelse gjøres ved at DNA-fragmentene skilles etter størrelse over kapillærer pga ulik vandring under elektrisk spenning, med kontinuerlig laserskanning av fluorescens. I dette studiet ble DNA sekvensering utført på innskuddene i de tre konstruerte sekresjonsplasmidene (isolert fra *L. lactis*) før videre arbeid, slik som transformasjon til *Lactobacillus*, ble utført.

Materialer:

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit:
 BigDye® Terminator v3.1 Ready reaction Premix
 BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer(x5)
 Primer A, B, C, D
 DNA- templat
 dH₂O
 PCR- maskin
 Sekvenseringsmaskin

Prosedyre:

- Det ble satt opp 12 rør, ett rør pr primer- reaksjon, altså 4 rør pr konstrukt. Hver reaksjon ble satt opp i henhold til tabell 3.6 (under) og satt i PCR- maskin for oppamplifisering av ulike DNA- fragment.

Tabell 3.6. Oppskrift for DNA sekvensering

Reagens	Volum
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Premix	2µl (1/4 X)
Templat. Isolert plasmid DNA*	3 µl
Primer A, B, C eller D** (5pmol/ µl)	1 µl
BigDye® Terminator v 3.1 Sequencing Buffer (5x)	3 µl
Sterilt dH ₂ O	11 µl
Total	20 µl

*DNA-templat:plasmidene plp0373NucA-sh71, plp3050NucA-sh71 og plp2578NucA-sh71

**Primere pSekRepF, pRepR, psecF og pAcc651R. (se kapitel 2.5 og 2.6)

- PCR- innstillinger benyttet er vist i tabell 3.7 (under).

Tabell 3.7. PCR- innstillinger for sekvensering

Temperatur	Trinn	Tid	Antall sykluser
96 °C	Initiering av denaturering	1min	1
95 °C	Denaturering	10sec	25
50 °C	Hybridisering	5sec	
60 °C	Polymerisering	4min	
4 °C	Lagring	---	---

- Etter endt PCR- reaksjon ble alt materiale overført til sekvenseringsrør
- 2µl 125mM EDTA ble tilsatt hvert rør
- 62,5 µl 95 % EtOH ble tilsatt hvert rør. Løsningen ble blandet ved opp- og- ned- pipettering.

- Blandingene ble innkubert i 15min ved romtemperatur
- DNA ble sentrifugert med max fart i 30min ved 4 °C.
- Supernatant ble fjernet umiddelbart med en hul nål og vakuumsug
- Pelleten ble vasket med 60 µl 70 % EtOH
- DNA ble sentrifugert ned igjen med max fart i 25min ved 4 °C
- Supernatant ble fjernet umiddelbart med en hul nål og vakuumsug
- Pelleten ble tørket i sterilskap med åpent lokk i 30 min (eller 10 min i frysetørkemaskin)
- Sekvensering ble gjort av personal ved instituttet vha ABI PRISM® 3100 DNA Sequencer (AME Bioscience). Sekvensfilene ble overført til BioEdit og analysert ved multi sequence alignment.

3.8 Analyser for genuttrykk og vekstforsøk

3.8.1 Dyrking, indusering og høsting av celler

All dyrking, indusering og høsting av celler som skulle benyttes til analyser for genuttrykk og vekstforsøk ble utført ved bruk av samme prosedyre, hvor optimal innkuberingstemperatur for gjeldende art ble benyttet. Prosedyren er hentet fra Mathiesen et al (2004b) hvor det brukes et peptidferomon med en sluttkonsentrasjon på 25ng/ml for å indusere.

Materialer:

MRS- medium
Erytromycin (10mg/ml)
Induserpeptid SppIP
0,9 % NaCl

Prosedyre:

- Bakteriene ble dyrket i MRS med 5µg/ml erytromycin over natt på 30 °C eller 37 °C
- Bakteriekulturene ble fortynnet i 50ml forvarmet MRS med 5µg/ml erytromycin og til en OD₆₀₀ på 0,13-0,15
- Kulturene ble innkubert i egnet temperatur til OD₆₀₀ var mellom 0,27 og 0,33
- Feromon ble tilsatt til en konsentrasjon på 25ng/ml i ett av de to reagensrørene.

- 2ml av kulturene ble satt på is for hver time og OD₆₀₀ ble målt. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)** ble tilsatt til en total konsentrasjon på 1mM. Kulturene ble merket og fryst ved -20 °C etter å ha blitt sterilfiltrert.
- 4 timer etter induksjon ble resterende celler satt på is i 10min for å stoppe vekst. Cellene ble høstet ved sentrifugering på 6000 x g 5-7min ved 4 °C.
- Supernatanten fra 4 timer etter induksjon ble tilsatt PMSF til en konsentrasjon på 1mM, sterilfiltrert og fryst ved -20 °C
- Cellepelleten som ble høstet 4 timer etter induksjonen ble vasket med 0,9 % NaCl og sentrifugert ned med 6000 x g i 5-7min ved 4 °C. De ble så midlertidig fryst ved -20 °C over natt, eller direkte løst i TEN- buffer og knust ved bruk av glasskuler (se 3.8.2).

**L. brevis* og *L. curvatus* ble dyrket på 30 °C og *L. gasseri*, *L. rhamnosus* og *L. plantarum* ved 37 °C.

**PMSF hemmer en type proteaser.

3.8.2 Knusing av celler

Knusing av celler for analyse av intracellulære proteiner ble utført ved bruk av små glasskuler som knuser cellene under ekstrem risting. Metoden er hentet fra Exterkate et al (1984) (Exterkate 1984) med noen små modifikasjoner.

Materialer:

Cellepellet

Glasskuler

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)50mM

TEN- buffer

Fastprep® -24 system for cell disruption fra MP biomedicals

Prosedyre:

Alt arbeid nedenfor ble utført på is.

- Cellepelleten ble løst i (5% av høstingsvolumet) TEN- buffer. Dette for at 1µl lysat alltid skulle tilsvare 20µl SN ved senere analyser
- PMSF ble tilsatt løsningen til en konsentrasjon på 1mM *
- Prøvematerialet ble overført til et kaldt ependorfrør med skrukork, tilsatt 0,5ml glasskuler
- Cellene ble lysert i ”Fastprep® -24 system for cell disruption” fra MP biomedicals med en fart på 6,5 i 45 sekunder

- Løsningen sentrifugeres i 1 min på 13 000 x g ved 4 °C for å bli kvitt glasskulene
- Supernatant overføres til et rent og kaldt ependorfrør med skrukork
- Løsningen sentrifugeres i 1 min på 13 000 x g ved 4 °C for å bli kvitt resterende glasskuler
- Supernatant overføres til et rent og kaldt ependorfrør med kork og fryses ned ved -20 °C inntil videre analyse.

3.8.3 LDS-PAGE

Proteiner ble separert ved hjelp av Lithium Dodecyl Sulfate PolyacrylAmide Gel Electrophoresis (LDS-PAGE) (analog metode til SDS- PAGE). Proteiner har ulik ladning ettersom hvilke aminosyrer de har, og ble derfor behandlet med Lithium dodecyl sulfat (LDS), et anionisk detergent. Den hydrofobe delen av LDS binder seg til proteinets hydrofobe grupper, og proteinet denatureres. Den hydrofile delen av detergentet vil da vende ut mot omgivelsene og gi proteinene en jevn negativ ladning som gir lik vandringsretning i et elektrisk felt og som gjør at antall negative ladninger vil være proporsjonal med lengden på polypeptidet. Dermed kan de ulike proteiner separeres etter størrelse i en gel plassert i et elektrisk felt. En blanding av kjente polypeptider ble brukt som størrelsesmarkør. Metoden ble kjørt med ferdiglaget NuPage geler (10 %) og elektroforeseutstyr fra Invitrogen.

Materialer:

Prøvemateriale (SN eller lysat)

NuPage LDS "Sample buffer" (innhold: LDS, Glycerol, fargestoff)*

NuPage "Reducing agent"***

Xcell Surelock™ Mini-Cell

MOPS buffer X 1

NuPage®Novex Bis- Tris ferdigstøpte geler fra Invitrogen

BenchMark™protein ladder fra Invitrogen

MagicMarc XP western standard

*LDS denaturer og gir negativ ladning til proteiner, glycerol gjør at løsningen synker i brønnen fordi glycerol er tyngre enn vann, fargestoffer muliggjør visualisering ved applisering, og DTT bryter disulfidbindinger

** Reducing agent inneholder 500 mM dithiothreitol (DTT) som bryter disulfidbindinger og hindrer derved tertiærstruktur

Prosedyre:

- SN eller lysat ble behandlet i henhold til tabell 3.8 (under).

Tabell 3.8 Prøveoppsett til LDS-PAGE

Komponenter	Supernatant(SN)	Lysat
Prøvemateriale	20 µl*	1 µl*
NuPage LDS Sample buffer	7 µl	2,5 µl
NuPage reducing agent	3 µl	1 µl
dH ₂ O	0 µl	5,5 µl
Totalvolum	30 µl	10 µl

* Til sammenligning ble det alltid brukt 20µl av SN og 1 µl lysat. Dette kunne gjøres fordi lysat alltid ble blandet i 5 % av totalvolumet ved høstingen. Slik ville alltid 1 µl lysat tilsvare 20µl SN.

- Reaksjonsblandingen ble satt i varmebad ved 70 °C i 10min
- Ferdigstøpte geler i støpeformer av plast ble klargjort ved fjerning av brønn- kammen og beskyttelsestapen som åpner for kontakt mellom gel og buffer i ytre kammer under elektroforesen. Etter oppsatt i bufferbeholderen (Xcell Surelock™ Mini-Cell) blir nylaget Mops buffer x 1 fylt opp så de dekket brønnene i de indre kammere, og halvfullt i de ytre kammere.
- 5µl lysat og 15µl supernatant, samt 2µl egnet ladder ble applisert i hver sin brønn.
- Elektroforesekammeret ble koblet til en spenningskilde i 30min på 200V
- Gelen ble fjernet fra elektroforesekammeret og plastbeholderen og skylt i dH₂O før videre deteksjonsanalyser.

3.9 Deteksjonsmetoder

3.9.1 Sølvfarging av Nupage Novex Bis- Tris geler

Ved deteksjon av ekstracellulære proteiner ble det brukt Pierce® Silver Stain Kit. Sølvfarging er en rask og ultrasensitiv metode for detektering av proteiner i polyacrylamid geler der sølvionene i løsningen felles ut som metallisk sølv ved hjelp av reduserende grupper i proteinene (proteinet er tilsatt en reduserende agent på forhånd).

Materialer:

Sølvfargings forsterkningsmiddel
Sølvfargings "sensitizer"
Sølvfarge
Sølvfargings fremkallingsmiddel
Fikseringsløsning (30 % EtOH, 10 % edikksyre)
Vaskeløsning (10 % EtOH)
Stoppløsning (5 % edikksyre)
Sterilt dH₂O

Prosedyre:

- Fikseringsløsning, vaskeløsning og stoppløsning ble laget
- Gelen ble vasket 2 x 5min i sterilt dH₂O på risteinkubator.
- Gelen ble fiksert 2 x 15min i Fikseringsløsning
- Gelen ble vasket 2 x 5min i Vaskeløsning
- Gelen ble vasket 2 x 5min i sterilt dH₂O
- "Sensitizer" jobbløsningen ble laget: 50µl Sensitizer i 25ml sterilt dH₂O
- Gelen ble innkubert i "Sensitizer" jobbløsning i 1 min
- Gelen ble vasket 2 x 1min i sterilt dH₂O
- Fargeløsningen ble laget: 0,5ml Forsterkningsmiddel i 25ml Sølvfarge
- Gelen ble innkubert i fargeløsningen i 30min
- Fremkallingsløsning ble laget: 0,5ml Forsterkningsmiddel i 25ml Fremkallingsmiddel
- Gelen ble vasket 2 x 20 sekunder med sterilt dH₂O
- Gelen ble innkubert i Fremkallingsløsning til proteinbåndene vistes (2-3min)
- Gelen ble innkubert i Stoppløsning 1 x 1min og 1 x 10min
- Gelen ble skannet, merket og overført til data samme dag.

3.9.2 Western Blott analyse med "iBlotT dry blotting" system

For analyse av intracellulære proteiner (i lysatene) ble det brukt en western blott metode der proteinene i polyacrylamidgelen blir overført til en membran med høy affinitet til proteiner (se figur 3.1). Etter overføringen blir membranen mettet med en blokkeringsløsning før det innkuberes med et antistoff spesifikt rettet mot det proteinet man ønsker å detektere (se figur 3.2). For å få en forsterket visualisering blir det etter vask tilsatt et sekundært polyklonalt antistoff som binder spesifikt til primærantistoffet, som vist i figur 3.2. Sekundærantistoffet er merket med et horseradish peroksydase (HRP)- konjugat som sammen med sitt substrat gir chemiluminescence som kan synliggjøres på film. I dette studiet var primærantistoffet anti- NucA, produsert i kanin, og sekundærantistoffet var HRP-konjugert Geit IgG anti- kanin (IgG produsert av geit injisert med primærantistoffet produsert av

kaninen). Det sekundære antistoffet hadde tre HRP konjugat pr IgG- molekyl, noe som forsterker signalet (se figur 3.2).

3.9.2.1 iBlot™ "Dry- blotting system"

Materialer:

Gelen med proteinene

iBlot™ Dry Blotting system maskin (iBlot™ Gel Transfer Device)

iBlot™ Cathode

iBlot™ Anode

iBlot™ svamp

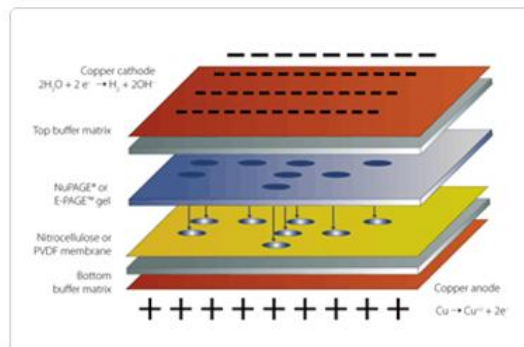
iBlot™ Filter Paper

Blotting rulle

TBS- buffer

Prosedyre:

- Gel fra LDS- PAGE ble skylt med dH₂O i et beger.
- iBlot™ Gel Transfer Device- maskinen ble slått på og anoden ble lagt på maskinen.
- Gelen ble lagt oppå anoden og membranen (nitrocellulose) med høy affinitet til proteiner (figur 3.1). Alle luftbobler ble rullet bort med rulle.
- Et filterpapir ble vætet med dH₂O og lagt oppå gelen og alle luftbobler ble rullet bort med rulle.
- Katoden ble lagt oppå gelen og filterpapiret
- En svamp ble satt i lokket på Blot Gel Transfer Device- maskinen og lokket ble lukket
- Som anbefalt av leverandør ble "Program 2" benyttet i 7-9 min (maks 9 min).
- Membranen med overførte proteiner ble fjernet fra maskinen vha en ren pinsett og lagt i TBS- buffer med proteinene vendt oppover.



Figur 3.1. Western blott analyse. Skjematisering av stabelen der proteinene overføres fra gel til membran er illustrert til høyre i figuren- fra bunnen: anoden, membran av nitrocellulose med høy affinitet til proteiner, LDS gel og katoden. Stabelen plasseres i iBlot™ Gel Transfer Device- maskinen som er vist til venstre i figuren, som kobler stabelen til et elektromagnetisk felt. Figuren er hentet fra Invitrogen™.

3.9.2.2 Antistoff hybridisering

Materialer:

Membran fra blotting

TBS- buffer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5

Vaskeløsning TTBS: TBS buffer med 0,1 % Tween-20

Blokkeringsløsning: TTBS med 1 % Bovine Serum Albumin (BSA)

TTBS med 0,5 % BSA

Primærantistoff

Sekundærantistoff

Oppbevaringskassett med filter for vakuumsfiltrering

Single Well Blot Spencer

Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrat kit:

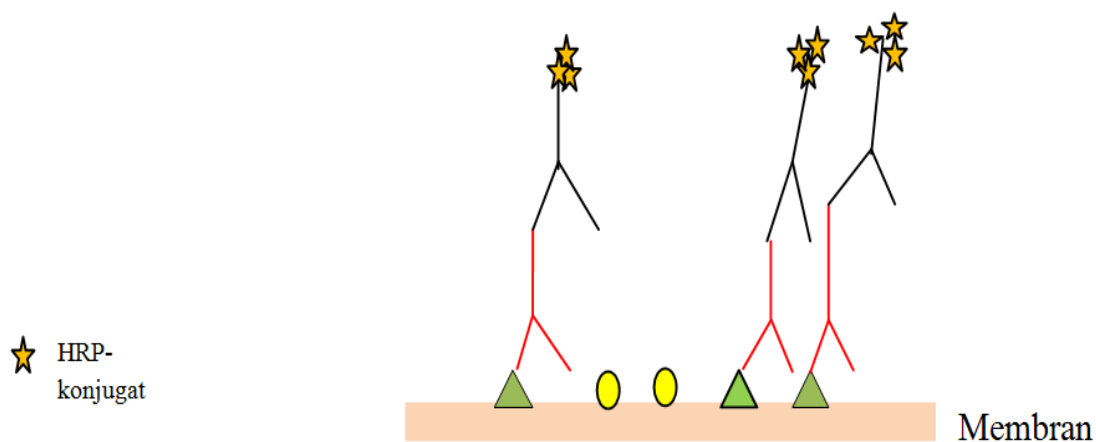
Stable Peroxide Solution

Luminol/Enhancer Solution

Prosedyre:

- Filteret på oppbevaringskassetten for vakuumsfiltrering av membranen ble våtet med ren dH₂O
- Membranen med proteiner fra "dry- blottingen" ble lagt med proteinene ned på det våte filteret i oppbevaringskassetten og alle luftbobler ble rullet bort med rulle. "Single Well Blot Spencer" ble lagt oppå membranen, og alle luftbobler ble igjen fjernet med rulle.
- Oppbevaringskassetten ble lukket og satt på plass i en vakuums- maskin med proteinene vendt oppover.
- 30ml blokkeringsløsning (TTBS med 1 % BSA) ble tilsatt jevnt utover membranen og sugd gjennom membranen vha vakuums.

- 5µl primærantistoff, anti- NucA fra kanin, ble løst i 3ml TTBS med 0,5 % BSA og ble tilsatt jevnt utover membranen. Membranen ble innkubert (i romtemperatur) i 10min og antistoffet ble deretter fjernet vha vakuuum.
- 10ml TTBS ble skylt gjennom membranen vha vakuuum tre ganger
- 0,2µl sekundærantistoff, Geit IgG anti- kanin, ble løst i 3ml TTBS med 0,5 % BSA og fordelt jevnt utover membranen. Membranen ble innkubert (i romtemperatur) i 10 min og antistoffet ble deretter fjernet vha vakuuum



Figur 3.2. Illustrasjon av immunodeteksjon på en membran ved bruk av western blott metode. Primærantistoffet (rød) binder spesifikt til epitoper på NucA i gelen (grønn trekant). Sekundærantistoffet (sort) binder spesifikt til primærantistoffet. Sekundærantistoffet er linket til et HRP- konjugat (tre gule stjerner) som sammen med sitt substrat gir chemiluminescense som kan synliggjøres på film.

- 10ml TTBS ble skylt gjennom membranen vha vakuuum tre ganger
- Deteksjonsløsning (substratet til HRP- konjugatet på sekundærantistoffet) ble laget ved å blande 1:1 Stable Peroxide Solution og Luminol/Enhancer Solution
- Membranen ble fjernet fra oppbevaringskassetten ved hjelp av en pinsett og lagt i deteksjonsløsningen med proteinene vendt oppover. Membranen ble innkubert i 5min ved romtemperatur og deretter fjernet fra deteksjonsløsningen og lagt i plastfolie.

3.9.2.3 Chemiluminescens deteksjon

Materialer:

Film: CL-XPosure™ 18x24 cm

Filmkassett

Fremkallingsløsning

Fikseringsløsning

Prosedyre:

Deteksjon av antistoff ble gjort ved bruk av GelFotoSystem fra Tectum Lab

- Etter innkubering i deteksjonsløsningen i 5 min ble membranen fisket opp vha pinsett og lagt i plastfolie og inn i en lysbeskyttet filmkassett.
- Videre deteksjon av hybridisert antistoff ble gjort på mørkerom der en film ble lagt over membranen med plastfolien på.
- Fremkalling av filmen ble gjort i fremkallingsvæske i ca 30 sekunder. Filmen ble så fiksert i fix- løsning i minimum 2 minutter før den ble skylt i vann og hengt opp til tork.

3.9.2.4 Stripping av membran

Stripping av membran ble utført under optimalisering av mengde primær- og sekundærantistoff for å få et klart bilde av proteinbåndene. Optimale mengder er angitt i 3.9.2.2

Materialer:

Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer

Vaskebuffer TTBS

Prosedyre:

- Den ferdig blottede membranen ble vasket i 10ml TTBS 2 ganger
- Membranen ble innkubert i Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer i 15min
- Membranen ble vasket med 10ml TTBS 2 ganger
- Membranen ble innkubert på nytt med primærantistoff (se fra punkt fem i avsnitt 3.9.2.2)

3.10 Plasmid kopinummer analyse

3.10.1 Ekstraksjon av total- DNA fra *Lactobacillus spp.*

Total- DNA til bruk i plasmid kopinummer- analysen ble ekstrahert ved bruk av fenol og kloroform, som beskrevet i Pushnova et al (2000) (Pushnova et al. 2000).

Materialer:

TE- buffer (50mM Tris- HCl/50mM EDTA)

Proteinase K (15mg/ml)

RNase(10mg/ml)

10 % SDS

Fenol:kloroform:isoamyl (1:1:1) alkohol

Prosedyre:

- Cellepelletten fra 40ml overnattskultur ble resuspendert i 400µl TE- buffer (50mM Tris- HCl/50mM EDTA). TE- bufferen hindrer degradering av DNA bl.a ved å opprettholde optimal pH.
- Løsningen ble vortexet 2-3 sekunder for å forsikre en homogen blanding.
- Cellene ble lysert ved bruk av små glasskuler og ekstrem risting (se avsnitt 3.8.2).
- For fjerning av proteiner ble cellesuspensjonene (ca 420µl) tilsatt 8µl Proteinase K (15mg/ml) og 4 µl 10 % SDS for øking av aktiviteten til Proteinase K.
- Cellene ble innkubert ved 50 °C i 30min (aktiverer proteinase K), og ved 75 °C i 10min (deaktiverer Proteinase K).
- 2 µl RNase (10mg/ml) ble tilsatt og blandingen ble innkubert ved 37 °C i 30 min (degraderer RNA).
- 414µl fenol:kloroform:isoamyl (1:1:1) alkohol ble tilsatt cellesuspensjonen og vortexet umiddelbart i 20 sekunder. Cellesuspensjonen ble så sentrifugert ved 10 000 x g i 5 min ved 4 °C.
- Tre faser ble observert i ependorfrøret. Nedre fase inneholder for det meste RNA og lipider. Mellomfasen inneholder for det meste proteiner. Øvre fase inneholder for det meste DNA og ble denne siste ble derfor pipettert forsiktig over i et nytt, rent ependorfrør ved bruk av en pipettespiss med stor åpning (avskjært ca 0,5cm).
- DNA- løsningen ble tilsatt 400µl kloroform og vortexet umiddelbart i 20 sekunder.

- Cellesuspensjonen ble så sentrifugert ved 10 000 x g i 5 min ved 4 °C.
- Øvre fase ble igjen pipettert forsiktig over i et nytt, rent ependorfrør ved bruk av en pipettespiss med stor åpning (avskjært ca 0,5cm).
- Cellesuspensjonen ble så sentrifugert ved 10 000 x g i 5 min ved 4 °C.
- Øvre fase ble igjen pipettert forsiktig over i et nytt, rent ependorfrør ved bruk av en pipettespiss med stor åpning (avskjært ca 0,5cm).
- DNA- løsningen ble fryst på -20 °C inntil videre bruk.

3.10.2 Felling av DNA

For å oppkonsentrere DNA etter isolering ved bruk av fenol og kloroform ble DNA felt med isopropanol. DNA er polar på grunn av den ladede fosfatryggraden. Denne polariteten gjør DNA løselig i vann, som også har høy polaritet. Isopropanol og etanol er mye mindre polar enn vann. Ved å tilsette etanol til en vannløsning med DNA vil derved oppløsningen forårsaket av det polare vannet forstyrres. Ved tilsetning av nok etanol vil elektrisk tiltrekking mellom fosfatgruppene i DNA og positive ioner i løsningen bli sterke nok til å lage stabile ionbindinger og dermed presipitere DNA. Dette skjer som regel når etanol- konsentrasjonen (volum/volum) blir over 65 %. For at presipitering av DNA skal kunne skje må positive ioner være tilstede i løsningen. Dette er vanligvis Na⁺, NH₄⁺ eller Li⁺.

Materialer:

Isopropanol eller 95 % EtOH
 70 % EtOH
 Isolert DNA
 3M Sodium acetat

Prosedyre:

- DNA- løsningen ble tilsatt 3M Sodium Acetate, pH 5,2 til en sluttkonsentrasjon på 0,3M
- 2- 3 volumer ble tilsatt av isopropanol
- DNA- løsningen ble innkubert i 10- 20min i -80 °C.
- Løsningen ble sentrifugert 10-30min ved maksimal fart.
- Supernatant ble pipettert bort etter sentrifugeringen
- Pelleten ble tørket i 10- 15min på benk
- Pelleten ble vasket med 2-300µl 70 % EtOH

- Løsningen ble sentrifugert 10-30min ved maksimal fart og supernatant ble fjernet
- DNA- presipitat ble løst i 50µl Sodium acetat

3.10.3 "Quantitative Polymerase Chain Reaction "

"Quantitative Polymerase Chain Reaction" (qPCR), også kalt Real Time PCR, er en metode for oppamplifisering og kvantifisering av en ønsket DNA- sekvens. Som i vanlig PCR brukes spesifikke primere designet for å binde til hver ende av målsekvensen. Ordene "Real Time" innebærer at man følger oppamplifiseringen av genet der og da ved at det blir visualisert på en tilkoblet datamaskin. For at visualisering skal kunne skje er det i dette studiet brukt "SYBR Green". "SYBR Green" inneholder fluoroforer og gir fluorescerende signal bare når den er bundet til "minor groove" i dobbeltrådet DNA, slik som ved PCR- produkt. Signalet blir dermed proporsjonalt med mengden oppamplifisert målsekvens. Resultatet etter endt reaksjon er en verdi, "quantification Cycle" (C_q) (Bustin et al. 2009), som er nummeret på antall sykluser som må til for at fluorescence-signalet passerer bakgrunnstøyen i prøven, altså helt i begynnelsen av den eksponentielle fasen av reaksjonen (se figur 4.12 i Resultatdel). I dette studiet ble qPCR brukt til å finne plasmidkopinummer i ulike bakterieceller ved å sammenligne C_q - verdien til plasmid- DNA med C_q - verdien til en endogen kontroll, genet for Gro-EL chaperon, som ligger på kromosomet og som eksisterer kun i ett eksemplar per celle.

For å unngå pipetteringsfeil ble mastermikser laget av PCR- komponentene og DNA-løsningen fra den aktuelle bakteriestamme. Hver reaksjon ble satt opp i tripletter. Templatet ble erstattet med sterilt dH₂O i en triplett- reaksjon som en negativ kontroll på PCR- analysen.

Materialer:

Power SYBR®Green PCR Mastermix fra Applied Biosystems
 Isolert DNA
 Primer I (10pmol/ µl) *
 Primer II (10pmol/ µl) *
 Sterilt dH₂O
 Ependorfrør med lokk for RT-PCR (leses gjennom lokk)

* Art- spesifikke primere for påvisning av kromosomalt DNA (genet for Gro EL) eller plasmidspesifikke primere for påvisning av plasmid-DNA (genet for erytromycinressistens) (se avsnitt 2.5 og 2.6).

Prosedyre:

- Reaksjons- mastermiks for én prøve ble satt opp i henhold til tabell 3.9 (under). For å unngå ufoldsmessig store pipetteringsfeil ble reaksjonene satt opp på en slik måte at det minste volumet som måtte pipetteres var så stor som 9 µl.

Tabell 3.9 Oppskrift for q PCR

Reagens	Volum
Power SYBR®Green PCR Mastermix(x 2) fra Applied Biosystems	90 µl
Isolert DNA *	9 µl
Primer A eller C** (10pmol/ µl)	9 µl
Primer B eller D** (10pmol/ µl)	9 µl
Sterilt dH ₂ O	63 µl
Total	180 µl

- 60 µl av mastermiksen ble fordelt i tre PCR-rør. Dvs. at 20 µl ble benyttet i hver reaksjon.
- PCR- reaksjonen ble utført med innstillinger i henhold til tabell 3.10 (under).

Tabell 3.10 PCR- innstillinger for qPCR

Temperatur	Trinn	Tid	Sykluser
95 °C	Initiering til denaturering	10min	1
95 °C 60 °C	Detanurering Hybridisering og Polymerisering	15sekunder 1min	40
95 °C 60 °C 95 °C	Smeltekurve	15sekunder 1 minutt 15sekunder	1*
4 °C	Lagring	Uendelig	---

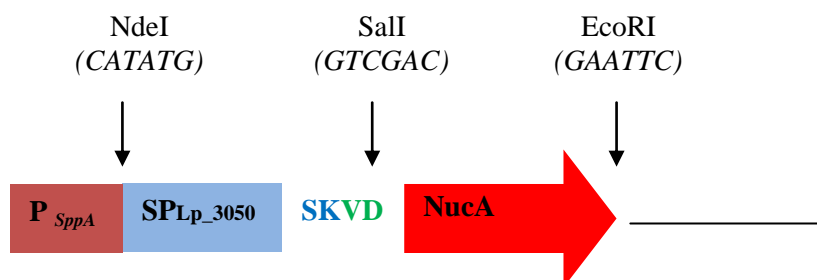
*Fra 60- 95 °C er det 0,3 °C i stigning om gangen for å finne smeltepunktet på produktet

4. Resultater

I tidligere studier av heterologt genuttrykk i *Lactobacillus* (hvor *L. plantarum* og *L. sakei* er de mest brukte arter) har det ofte blitt observert at mengden produsert og sekretert protein ikke er så høy som ønsket. Testing av andre *Lactobacillus* arter for heterolog produksjon og sekresjon er derfor et viktig aspekt i videre utvikling av *Lactobacillus* som cellefabrikk og leverandører av terapeutiske proteiner. Det er tidligere konstruert et SP-bibliotek av signal peptider (SP'er) fra *L. plantarum* (Mathiesen et al. 2009) hvor det ble funnet SP'er som ga bedre sekresjon (i *L. plantarum*) enn de tidligere mest brukte SP'ene, slik som SP'ene fra Usp45- proteinet i *Lactococcus* (van Asseldonk et al. 1990) og fra M6- proteinet fra *Staphylococcus pyogenes* (Hols et al. 1997). I dette studiet har vi benyttet noen av disse SP'ene og sett på variasjon i vertsorganismen ved å teste dem i fem *Lactobacillus* arter.

SP-biblioteket ble konstruert i vektorer som kun kan replikere i et fåtall *Lactobacillus* arter (bl.a *L. plantarum* og *L. sakei*). I dette studiet har tre av disse vektorene med SP'er fra biblioteket derfor blitt modifisert for å kunne brukes til heterologt uttrykk i de fire andre artene av *Lactobacillus*, og produksjon og sekresjonseffektivitet av reporterproteinet NucA har derfor blitt sammenliknet med resultatene funnet i *L. plantarum*. Målet var og finne andre *Lactobacillus* arter som er egnet til produksjon og sekresjon av heterologe proteiner, både med tanke på å bedre sekresjonen i *Lactobacillus* og å utvide verktøykassen for vektorer til bruk ved *in situ* levering. Med hensyn på det siste er det viktig å legge merke til at *Lactobacillus* arter har ulike levesteder og modulerer immunforsvaret på ulike måter og at det dermed kan være store forskjeller mellom arter når det gjelder deres egnethet som mikrobielle vaksiner.

Vektorene fra SP- biblioteket er derivater av den induserbare ekspresjonsvektoren pSIP403 (Sorvig et al. 2003) (en variant av pSIP401) som er en vektor blant de såkalte pSIP- vektorene (se pSIP401, figur 1.3). Vektorene fra SP- biblioteket inneholder en SP-kassett (figur 4.1) som består av et signal peptid (SP) etterfulgt av et par aminosyrer fra SP'ets tilhørende opprinnelige protein og en linker på to aminosyrer (Val-Asp) kodet av seks nukleotider som til sammen danner et *Sall* kuttesete. Den induserbare promotoren til sakacin P (P_{SppA}) ligger oppstrøms for SP'et fra *L. plantarum* og er translasjonelt koblet til denne. SP'et er koblet til reporterproteinet NucA, som vist i figur 4.1. *Sall*-setet i den åpne leserammen mellom SP'et og reporterproteinet muliggjør lett utbytting av SP'et eller målgenet. For mer detaljer om vektorene fra SP- biblioteket henvises det til Mathiesen et al. 2009.



Figur 4.1. Skjematisk oversikt av viktig moduler i vektorene fra SP- biblioteket (Mathiesen et al 2009). Den lille boksen indikerer den induserbare promotoren for Sakacin P (P_{SppA}), den blå boksen representerer SP'et (her fra proteinet Lp_3050 i *L. plantarum* WCFS1), og den røde pilen representerer reporterproteinet NucA. Mellom reporterproteinet og SP'et er det satt inn en "linker" bestående av VD, som inneholder setet for restriksjonsenzymet SalI. De blå aminosyrene, SK, er de første to aminosyrene av Lp_3050 proteinet. To andre kuttsteder for restriksjonszymer er også vist på tegningen; disse kan brukes til å bytte ut de ulike komponentene ved restriksjonskutting og ligering.

I dette studiet ble Nuclease A (NucA) fra *Staphylococcus aureus* benyttet som reporterprotein fordi det tidligere er oppnådd vellykket sekresjon av dette proteinet i melkesyrebakterier (Dieye et al. 2001; Le Loir et al. 1998; Le Loir et al. 2001; Mathiesen et al. 2009; Poquet et al. 1998). NucA er et lite protein på ca 17kDa, med en forholdsvis stabil struktur som gjør det lite utsatt for nedbryting av proteaser (Alexandrescu et al. 1990).

4.1 Valg av signalpeptider

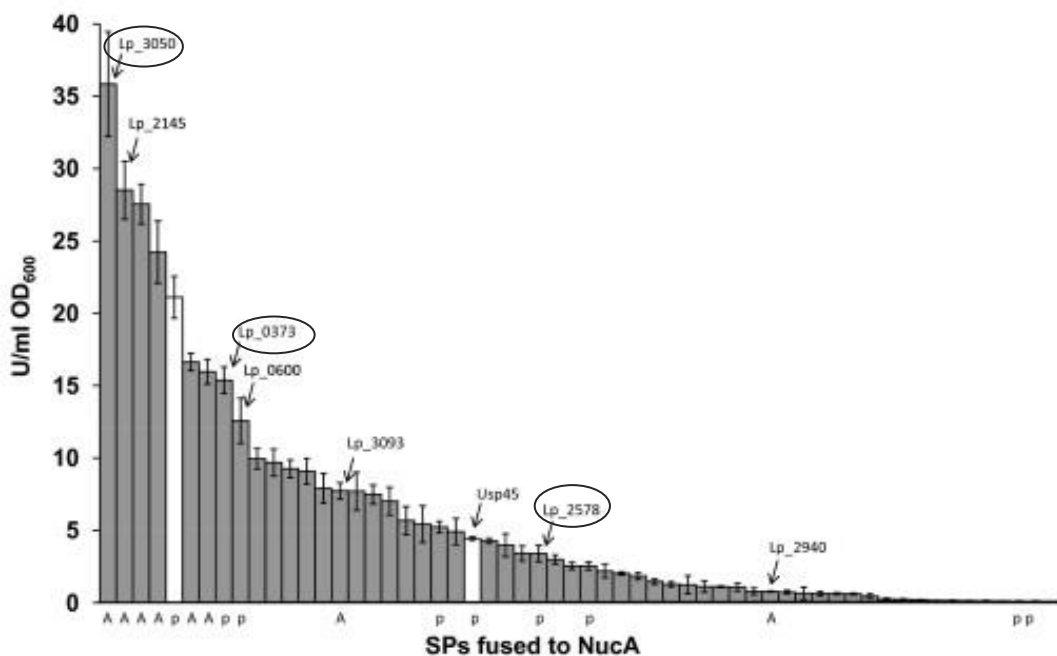
Angivelse av de ulike SP'er vil heretter gjøres med forkortelsen SP etterfulgt av et 4-sifret tall som representerer proteinet som dette SP'et er hentet fra i *L. plantarum* WCFS1 (Kleerebezem et al. 2003) (se eksempel i tabell 4.1).

Tabell 4.1. Aminosyresekvenser til SP'er fra proteinene Lp_0373, Lp_3050 og Lp_2578 i *L. plantarum*. Bindestreken på slutten av sekvensen angir hvor SPaseI er predikert å kutte. De to påfølgende aminosyrene utgjør aminosyrene 1 og 2 i det ferdig prosesserte proteinet som opprinnelig tilhører SP'et, og er inkludert i SP-kassetten N- terminalt for NucA, som vist i figur 4.1 (over). Sekvensene er hentet fra Entrez gendatabase via nettsidene til NCBI.

Navn	Aminosyresekvens
SP_0373	MYTENTGKHHRNGLPVWLLPLIVVISFWGVSQNIMVVDA-SS~*
SP_3050	MKKFNFKTMLLIVLASCVFVVVNVTTSLGPQTAITAQA-SK~*
Sp_2578	MRRKLVGYMLSMLTVILALFMLGSTAHA-KE~*

I Mathiesen et al (2009) ble det bekreftet at sekresjonseffektiviteten i stor grad påvirkes av hvilket SP som blir benyttet for sekresjon, mens det samtidig ble vist at det totale produksjonsnivået av NucA (intracellulært + ekstracellulært) varierte relativt lite mellom konstruktene som ble testet. Det ble bestemt å prøve ut *tre* ulike SP'er som hadde vist å gi nokså forskjellig sekresjonseffektivitet i *L. plantarum*; SP_3050, SP_0373 og SP_2578 (Mathiesen et al. 2009). Aminosyresekvensene til de tre SP'er er vist i tabell 4.1.

Figur 4.2 viser mengden ekstracellulær NucA som ble oppnådd i det opprinnelige studiet av Mathiesen et al (2009).



Figur 4.2. Nuclease A aktivitet i supernatant fra *L. plantarum* WCFSI ved bruk av homologe signal peptider (SP'er). De tre utvalgte SP'ene er merket med en ring rundt navnet på proteinet SP'et er hentet fra. Nuclease A aktiviteten er uttrykt som U/ml. Bildet er hentet fra Mathiesen et al (2009).

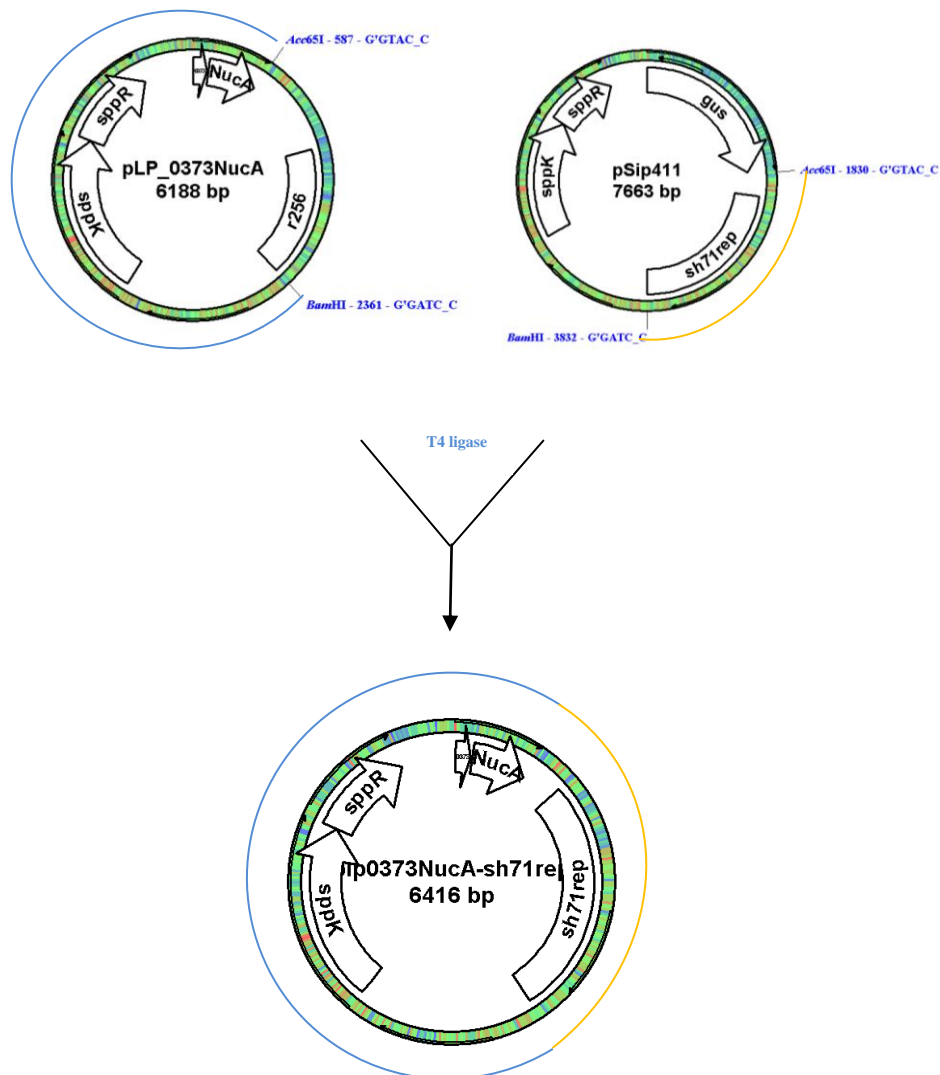
4.2 Konstruksjon av sekresjonsvektorer

Plasmidene pLp0373NucA, pLp3050NucA og pLp2578NucA er alle derivater av pSIP403 (en variant av pSIP401, figur 1.3) hvor P_{sppA} driver uttrykk av sekretert NucA slik som vist i figur 4.1. pSIP403 inneholder det smalspektret art- spesifikke replikonet, r256, fra plasmid 256 i *L. plantarum* (Sørvig et

al 2005b). Dette replikonet virker i et fåtalls *Lactobacillus* arter (per. med G. Mathiesen). Siden vektorene skulle benyttes i ulike arter av *Lactobacillus*, ble dette replikonet erstattet med det mer bredspektret replikonet, SH71, fra *Lactococcus lactis* (De Vos 1987), som tidligere har vært mye brukt i utvikling av vektorer (Sørvig et al 2005 og ref i denne).

Replikonet fra pSH71 er til stede i pSIP- vektor 411 (Sorvig et al. 2005). Subkloninger med dette replikonet må gjøres i *L. lactis* eller i en spesiell *E. coli* stamme, *E. coli* TG1; replikonet er ikke stabil i vanlige *E. coli* stammer. Kloning i *L. lactis* er noe mer komplisert enn å gjøre subkloninger i *E. coli* TOP10, som vanligvis benyttes til dette formålet. Plasmidet pSIP411 ble isolert med vanlig mini Prep kit prosedyre, men det viste seg at plasmidet ble brutt ned, trolig grunnet høy nukleaseaktivitet i *E. coli* TG1. I et forsøk på å inaktivere nukleasene ble plasmid innokulert med trypsin direkte etter isoleringen. Dette ga positivt resultat ved at ikke plasmidene ble brutt ned ved DNA- isoleringen.

Sekresjonsplasmidene ble konstruert ved at replikon SH71 ble klippet ut fra pSIP411 ved å benytte restriksjonsenzymene *Acc65I* og *BamHI*. Dette fragmentet på 2kb ble ligert inn i 4,2- 4,5kb fragmentene av *Acc65I/BamHI*- kuttet pLp3050NucA, pLp0373NucA eller pLp25787NucA (Mathiesen et al ,2009; se avsnitt 2.7). Dette resulterte i plasmidene pLp3050NucA-sh71, pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71. Kloningsprosessen illustreres i figur 4.3.



Figur 4.3. Skjematisk fremstilling av konstruksjonen av én av de tre sekresjonsvektorene, pLp0373NucA-sh71. SH71 replikonet ble klippet ut av pSIP411- vektoren (isolert fra *E. coli* TG1) ved å benytte restriksjonsenzymene *Acc65I* og *BamHI*. r256 replikonet i vektoren pLp_0373NucA (isolert fra *E. coli* Topo10) ble fjernet med de samme restriksjonsenzymene. Fragmenter av pLp0373NucA uten replikon (avmerket i blått øverst til venstre) og SH71 replikon (avmerket i gult øverst til høyre) ble isolert ved gel elektroforese og ligert sammen ved bruk av T4- ligase, som resulterte i en ny sekresjonsvektor, pLp0373NucA-sh71 (avmerket med blå/gul sirkel nederst). Bildet er laget i pDraw.

I første omgang ble disse konstruksjoner forsøkt gjort ved å bruke *E. coli* TG1, men av ukjent årsak ble ingen positive transformanter funnet. Dette kan bl.a. skyldes degradering av DNA pga høy nukleaseaktivitet i disse cellene. Siden *E. coli* TG1 krever en del optimalisering for å benyttes som mellomvert, ble det bestemt å benytte *Lactococcus lactis* IL1403 som subkloningsvert fordi SH71 også replikerer i denne arten. Det fins kjente metoder for å gjøre disse bakteriecellene kompetente og det har tidligere blitt oppnådd effektiv transformering (Gerber & Solioz 2007; Holo & Nes 1989; Hols et al. 1999). Likevel, for å oppnå transformanter ble det utført en del optimaliseringsarbeid. To ulike medier (GM17 og SR) ble testet ut, og ulike mengdeforhold av ligeringsløsning og celler under transformasjon ble også prøvd ut. Den optimaliserte transformeringsprosedyren er beskrevet i kapittel 3.5, tabell 3.3.

Det ble *ikke* regnet ut "Colony Forming Unit" (CFU) for de ulike bakteriene i dette studiet da det var lite relevant i forhold til problemstillingen i oppgaven, og det kun trengtes én koloni for å gå videre til analysene for genuttrykk. Ingen videre optimalisering ble derfor gjort for å oppnå *bedre* kompetente celler, selv i de tilfellene hvor det var tydelig at CFU pr µg DNA var langt under 10^6 som er den normale grensen for en god kompetent celle.

Tilstedeværelse av riktige konstrukter i mulige transformanter ble detektert med PCR etter kjemisk DNA-isolering (koloni- PCR var ikke godt nok), og størrelse på PCR- produkt ble sjekket (se kapittel 3.2.2 og 3.6). Primere benyttet er angitt i kapittel 2.5 og 2.6.

Kun 228bp skilte PCR- produktet fra de nye vektorene fra PCR- produktet til den opprinnelige vektoren. Plasmidkonstruktene ble derfor DNA sekvensert som en ekstra kontroll på at riktig innskudd og type SP var til stede. Dette ble gjort for å kvalitetssikre det videre arbeidet ved sekresjonsanalysene.

4.3 Transformasjon av *Lactobacillus* spp.

De tre konstruerte plasmidene (figur 4.3) ble isolert fra *L. lactis* (se avsnitt 3.2.2) og forsøkt transformert inn i seks utvalgte arter av *Lactobacillus* (tabell 4.2). Transformering av Gram-positive bakterier kan være tidkrevende og komplisert siden mange av bakteriene ikke er naturlig kompetente, og må derfor forbehandles og gjøres kompetente før transformering. For å være sikker på å unngå krysskontaminering mellom de ulike artene, ble artene gjort kompetente og transformert på ulike dager.

Først ble alle artene, hver for seg, forsøkt gjort kompetente med metoden basert på Aukrust (1995) (Aukrust et al. 1995). Transformasjon ble gjort ved elektroporering. Det ble funnet korrekte transformanter for alle tre plasmidkonstrukter for *L. plantarum*, *L. curvatus* og *L. brevis*, men ikke for *L. acidophilus*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus*. Det ble så prøvd ut en ny og enklere metode for å gjøre de

gjenværende *Lactobacillus* arter kompetente (Palomino et al. 2010). Denne metoden går ut på å dyrke cellene i medium med høy saltkonsentrasjon og er enklere fordi det kun trengs NaCl i tillegg til vekstmediet. Metoden ble prøvd ut på *L. acidophilus*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus*, men det ble heller ikke her funnet transformanter for disse tre artene. På basis av en etablert lab- prosedyre fra Nofima ble det så gjort noen endringer i metoden beskrevet av Aukrust et al (1995), som beskrevet i avsnitt 3.4.3. Positive transformanter for alle tre plasmidkonstrukter ble da funnet også for *L. rhamnosus* og *L. gasseri*, men ikke for *L. acidophilus*. Det ble deretter bestemt å eliminere *L. acidophilus* fra dette studiet..

Tabell 4.2. *Lactobacillus*- stammer benyttet i dette studiet.

Genus og Art	Stamme	Referanse
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	Kleerebezem et al. 2003
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSM20019	Nofima, Ås**
<i>Lactobacillus brevis</i>	DMSZ20556	Nofima, Ås**
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATTCC33323T	Nofima, Ås**
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC53103/LGG	Valio, Helsinki, Finland
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC4356	Nofima, Ås**

*Stamme fått av Ingolf Nes

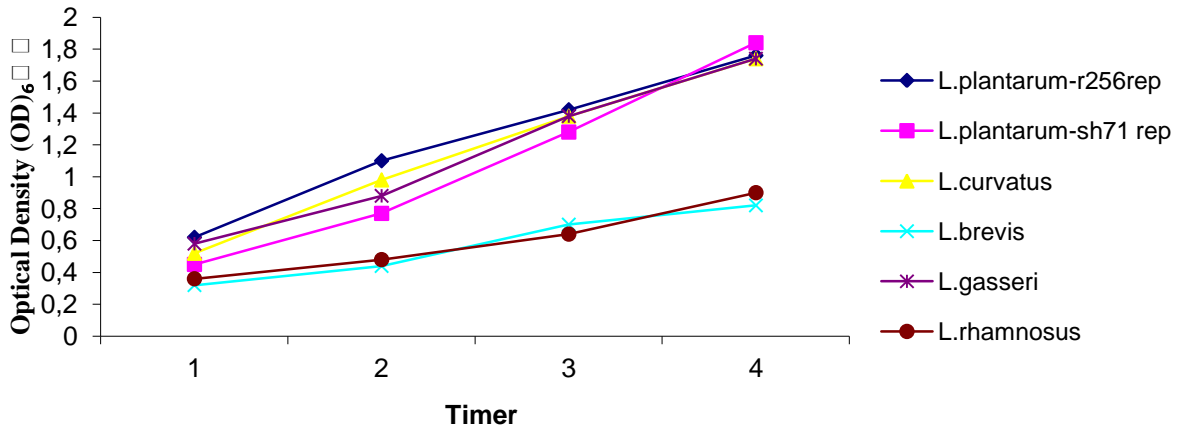
**Stamme fått av Lars Axelsson

4.4 Vekstforsøk

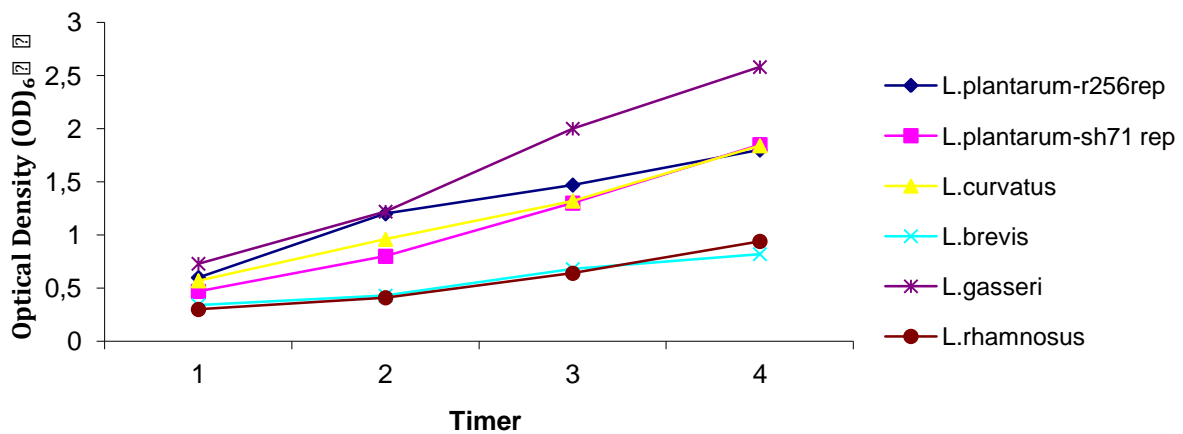
Det har tidligere vist seg at produksjon og/eller sekresjon av et fremmed protein kan føre til vekstforstyrrelser av vertsbakterien (Bolhuis et al. 1999; Lulko et al. 2007; Mathiesen et al. 2008). For å sjekke om tilstedeværelse av plasmidene og/eller induksjon av NucA produksjonen påvirker veksten av de ulike *Lactobacillus* artene ble to overnatts-kulturer av hver bakterietransformant dyrket i egnet vekstmedium tilsatt erytromycin. Kulturene ble så fortynnet til OD₆₀₀ ~0,1 i ferskt medium. De fortynnede kulturene ble innkubert videre til OD₆₀₀ ~0.3 (se kapitel 3.8.1). For å kunne se på påvirkningen av indusering ble uttrykk av *nucA*- genet indusert i kun ett av to rør per transformant ved å tilsette 25ng/ml sppIP.

For å følge veksten i de ulike kulturene ble OD₆₀₀ målt for hver time fra og med induseringstidspunktet i både induserte og uinduserte *Lactobacillus*-celler som alle inneholdt plasmidet pLp3050NucA-sh71. For *L. plantarum* er plasmidet pLp3050NucA også tatt med, altså er begge typer replikon med i analysen for denne arten.

A) Induserte celler



B) Uinduserte celler



Figur 4.4. Vekstkurve for induserte celler (A) og uinduserte celler (B) av ulike *Lactobacillus* arter med sekresjonsplasmidet pLp3050NucA-sh71. Optical Density₆₀₀ (OD₆₀₀) ble målt hver time etter indusering fram til fire timer etter induksjon av NucA- produksjonen.

Figur 4.4A viser at veksten på de induserte cellene med plasmidet pLp3050NucA-sh71 deler seg i to grupper. *L. curvatus* og *L. gasseri* vokste med omtrent samme hastighet som *L. plantarum*, og OD₆₀₀ var ca 1,8 fire timer etter induksjon. Derimot vokste *L. brevis* og *L. rhamnosus* betydelig langsommere i det samme tidsrommet og endte opp på en OD₆₀₀ på ca 0,8 etter 4 timer. Uinduserte celler med det samme plasmidet viser tilsvarende verdier for samtlige arter (figur 4.4B), med unntak av *L. gasseri* som viser nedgang i veksthastigheten etter indusering (figur 4.4A, lilla stjerne). Veksthastigheten for

de samme artene ble også undersøkt med plasmidene pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71. Cellene ble dyrket under samme forhold og det samme mønsteret kunne sees hos samtlige arter, også her med unntak av *L. gasseri*, som ikke viste like stor variasjon i vekst av uinduserte og induserte celler ved bruk av pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 som ved pLp3050NucA-sh71 (data ikke vist). Dette er interessant da *L. gasseri* også viste stor variasjon i produksjonen av NucA ettersom hvilket plasmid som ble benyttet.

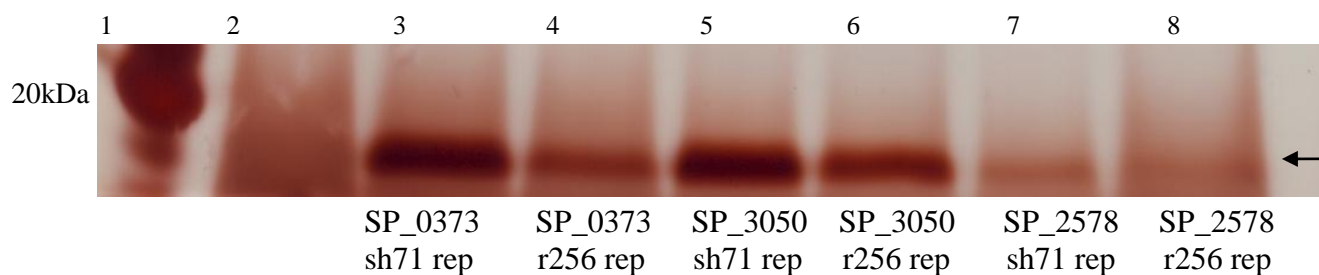
4.5 Sekresjon i *Lactobacillus* spp.

Første steg i sekresjonsanalysen var å teste evnen til sekresjon (dvs mengde sekretert NucA) ved bruk av de nykonstruerte pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 i de forskjellige vertsstammene, og å sammenligne sekresjonsnivåene med de nivåene som oppnås med sekresjonsplasmidene med r256 replikonet (pLp0373NucA, pLp3050NucA og pLp2578NucA) med *L. plantarum* som vert.

I innledende forsøk ble supernatantene (SN'ene) analysert ved ulike tidspunkt. Proteiner fra SN ble separert ved LDS- PAGE og synliggjort ved sølvfarging. SN ble analysert fra tre ulike tidspunkt, nemlig to, tre og fire timer etter induksjon. Siden det skulle dyrkes fem ulike arter parallelt, ble det satt et felles tidspunkt for høsting av cellene. Tidligere studier i *L. plantarum* har vist at maksimum nivå på protein produksjon er ved OD₆₀₀ 1,5-2,0, som normalt oppnås etter ca 4 timer etter induksjon (Axelsson et al. 2003; Sorvig et al. 2003). Cellene ble derfor høstet fire timer etter induksjon for samtlige arter (prosedyren for høsting er beskrevet i avsnitt 3.8.1).

4.5.1 Evne til sekresjon i *L. plantarum* ved bruk av SH71 replikon

For å sjekke evne til sekresjon i *L. plantarum* for de tre SP'ene når man bytter fra r256 replikonet til SH71 replikonet, ble 20µl SN per brønn kjørt på LDS gel og gelen ble sølvfarget. Figur 4.5 viser klart at et bånd på ca 17kDa kan sees i SN fra alle prøvene unntatt prøven fra den tomme vertsstammen (uten plasmid). Dette viser at *L. plantarum* også har evne til å produsere og sekretere NucA ved bruk av konstruktene inneholdende SH71 replikonet. Figuren viser at de ekstracellulære NucA mengdene oppnådd med SH71-baserte konstrukter er noe høyere enn mengdene oppnådd med r256-baserte konstrukter. Produksjon og sekresjon ved bruk av de ulike konstrukter inneholdende r256 replikonet samsvarer ellers med observasjoner i tidligere studier, hvor det ble funnet at SP_3050 gir de høyeste nivåene og SP_2578 de laveste (Mathiesen et al. 2009).

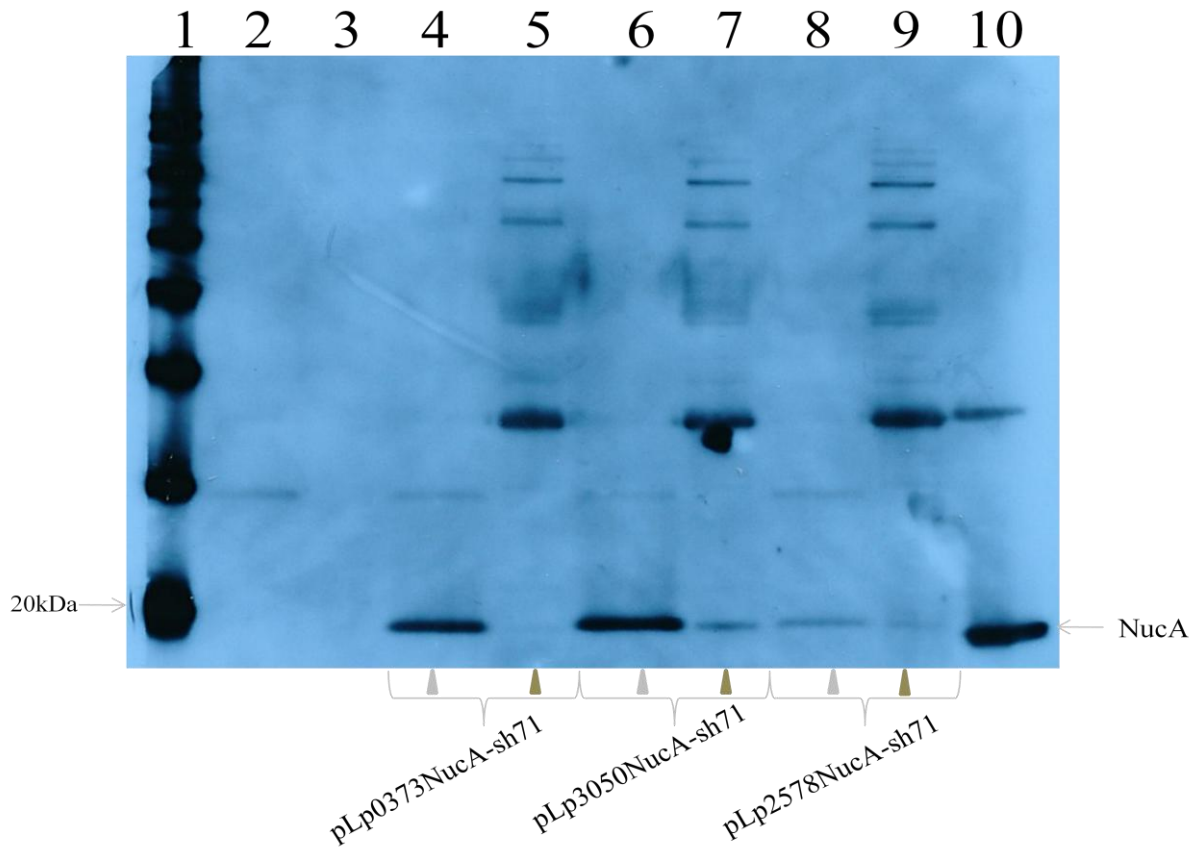


Figur 4.5. LDS-PAGE analyse av supernatant fra forskjellige *Lactobacillus* kulturer. Prøvene inneholder 20 µl supernatant fra kulturer av *L. plantarum* WCFS1, som inneholder følgende plasmider: Ingen (2), pLp0373NucA-sh71 (3), pLp0373NucA (4), pLp3050NucA-sh71 (5), pLp3050NucA (6), pLp2578NucA-sh71 (7), pLp2578NucA (8). Prøve 1 inneholder standardproteiner. Gelen ble sølvfarget. Ekstracellulært NucA vises som et bånd på ca 17kDa. Type SP og type replikon er også angitt under gelen. Materialet ble høstet 4 timer etter induksjon.

4.5.2 Sekresjonseffektivitet i *L. plantarum* ved bruk avSH71 replikon

Etter å ha påvist økt evne til sekresjon i *L. plantarum* med *Lactococcus*-replikonet SH71, ble det undersøkt om sekresjonseffektivitet var blitt bedre eller om det var produksjonen av proteinet som var økt. Med sekresjonseffektivitet menes det hvor effektivt det produserte målprotein sekreteres ut i mediet. Dette gjøres ved å sammenlikne ekstracellulær mengde og intracellulært mengde NucA. Til dette ble det benyttet LDS- PAGE og Western blott analyse med immunodeteksjon.

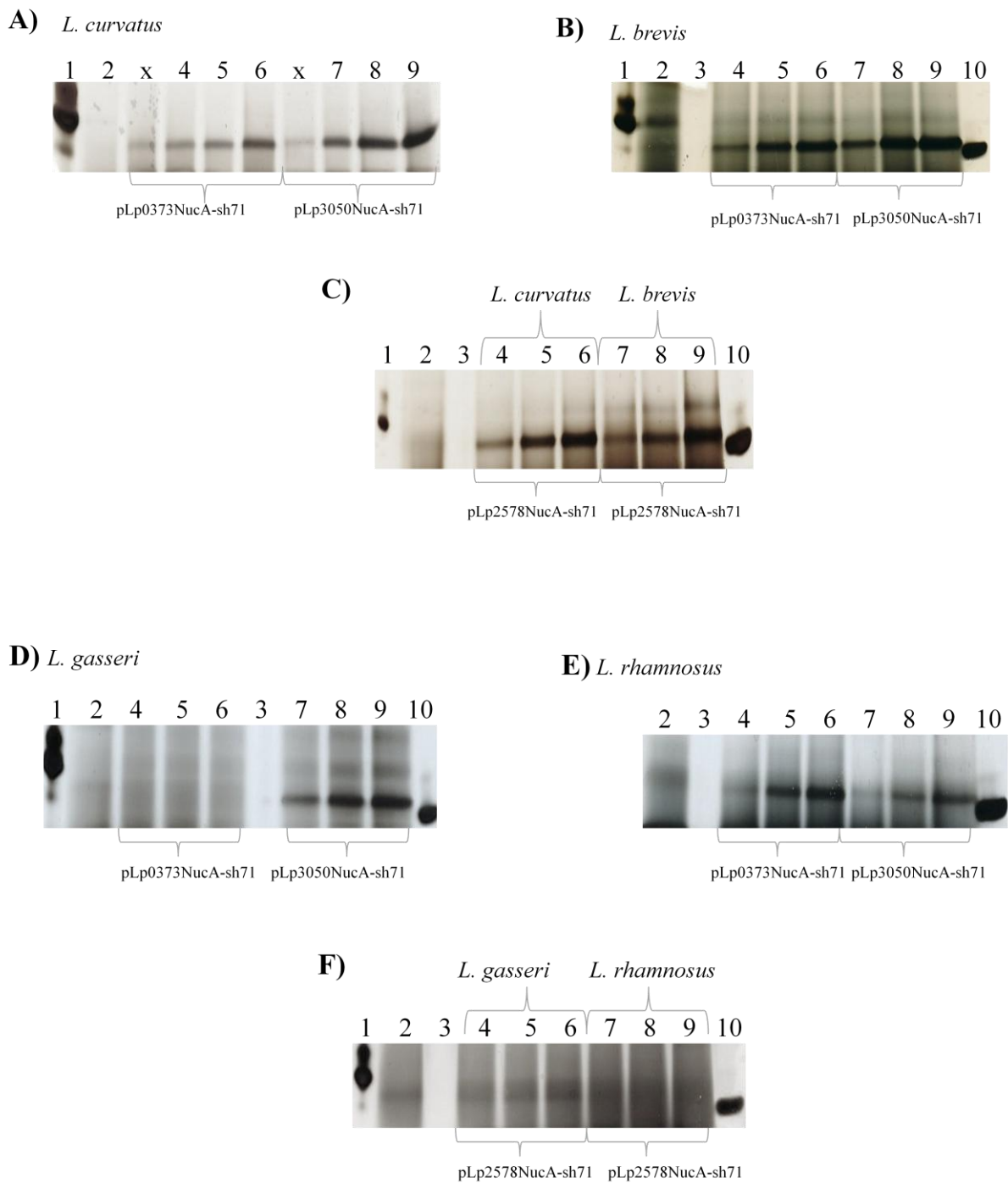
Celler høstet fra samme kultur som over ble knust ved hjelp av glasskuler og cellelysatsat ble analysert for intracellulært NucA ved hjelp av western blott analyse. Mengdene intracellulært NucA ble sammenliknet med mengdene NucA i SN. Som negativ kontroll ble *L. plantarum*/pEV ("empty vector" som mangler *nucA* genet og SP) benyttet. Figur 4.6 viser at sekresjonseffektiviteten generelt er høy, dvs at det meste av NucA finnes i SN- fraksjonen. For pLp0373NucA-sh71 er effektiviteten nærmest 100 %, mens den for pLp3050NucA-sh71 også ligger tett opp mot 100 %. pLp2578NucA-sh71 viser et mye lavere produksjonsnivå og sekresjonseffektiviteten virker også lavere, selv om det er vanskelig å slå fast på basis av figur 4.6. For å få en idé om mengdene NucA som ble produsert og sekretert ble 0,5µg rensset NucA tilsatt siste brønn (10) på alle geler i dette studiet. Ved å sammenlikne bånd kan man da komme til en grov kvantifisering av hvor mye NucA som ble produsert. Estimaten er: pLp0373NucA-sh71 (figur 4.6, brønn 5+6), - ca 22,5µg/ml; pLp3050NucA-sh71 (figur 4.6, brønn 6+7), - ca 32,5µg/ml; pLp2578NucA-sh71 (figur 4.6, brønn 9+10), - ca 7,5µg/ml.



Figur 4.6. Western blott analyse av intracellulære (brunt pilhode) og ekstracellulære (grått pilhode) proteinfraksjoner fra *L. plantarum* WCFS1 stammer med forskjellige plasmider. Type signal peptid (SP) oppgis i navnet på plasmidet under gelen. Pilen til høyre viser NucA- båndet. Gelen viser fra venstre: Standardproteiner (1), supernatant (SN) fra *L. plantarum*/pEV (2), Tom brønn (3), lysat (brun) og SN (grå) ved bruk av ulike sekresjonsplasmid som er angitt under gelen (4- 9) og 0,5 µg renset ferdig prosessert NucA protein (10). Materialet ble høstet 4 timer etter induksjon og prøvevolumene tilsvarte 20µl av den opprinnelige kulturen.

4.5.3 Evne til sekresjon i *Lactobacillus* spp.

For å undersøke om *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus* (tabell 4.2) kunne sekretere NucA og ved hvilket tidspunkt det var størst mengde NucA i vekstmediet, ble SN analysert to, tre og fire timer etter induksjon. Cellefri SN fra de ulike *Lactobacillus* artene ble analysert på LDS-PAGE gel (figur 4.7). Figur 4.7 viser at det generelt var mest NucA i SN 4 timer etter indusering hos samtlige arter. Størst mengde NucA ble detektert ved bruk av SP_3050 i samtlige arter med unntak av *L. rhamnosus*, og dette samsvarer med mønsteret sett i *L. plantarum* (se kapittel 4.5.1 og 4.5.2). Ut ifra figur 4.7 var SP_3050 også det eneste som førte til sekresjon i alle stammene fordi det ved bruk av SP_0373 og SP_2578 ikke ble detektert noe ekstracellulært NucA i *L. gasseri* (figur 4.7D og F, brønn 4-6) og *L. rhamnosus* (figur 4.7F, brønn 7-9). Det er interessant å se at SP_2578 ser ut til å fungere mye bedre i *L. curvatus* og *L. brevis* (figur 4.7C) enn i *L. plantarum* (figur 4.5).



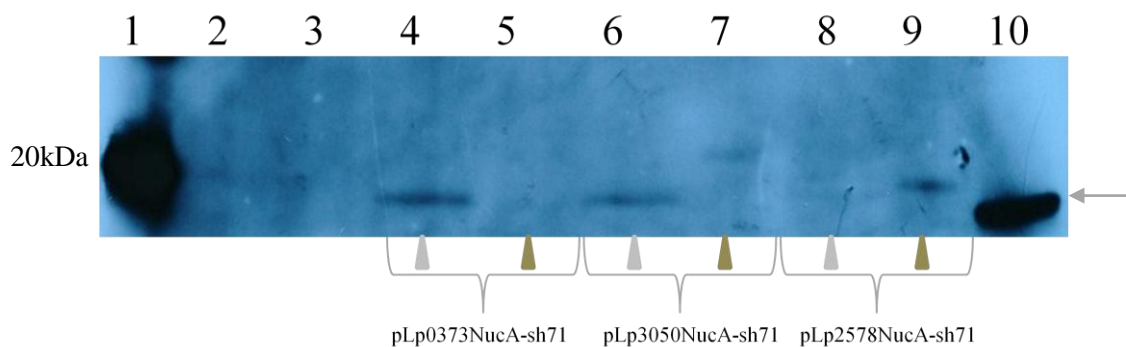
Figur 4.7. LDS-PAGE analyse av supernatant fra forskjellige *Lactobacillus* kulturer. Prøvene inneholder 20µl supernatant fra kulturer av *L. curvatus* DSM20019, *L. brevis* DMSZ20556, *L. gasseri* ATCC33323T og *L. rhamnosus* ATCC53103/GG, som inneholder følgende plasmider: pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71. Supernatanter ble samlet inn for hver time etter induksjon. Gelene er sølvfarget. *Lactobacillus* art er angitt over gelene og type plasmid er angitt under gelene. Tallene over gelen angir standardproteiner (1), *L. plantarum*/pEV 4 timer etter induksjon (2), tom brønn (3), SN fra to timer etter induksjon (4 og 7), SN fra tre timer etter induksjon (5 og 8), SN fra fire timer etter induksjon (6 og 9) og 0,5µg renset NucA protein (10). I gel A er SN fra første time etter induksjon også tatt med (brønn merket med X).

For å undersøke om det var produsert noe NucA i de tilfellene der det ikke ble detektert ekstracellulær NucA (dvs. noen *L. gasseri* og *L. rhamnosus* stammer), ble western blott analyse utført av både SN og cellelysate (figur 4.8). Siden signalene var svake var det nødvendig med en del optimalisering (f. eks testing av ulike konsentrasjoner av primært og sekundært antistoff) for å få et klart bilde. *L. plantarum*/EV ("empty vector") ble benyttet som negativ kontroll.

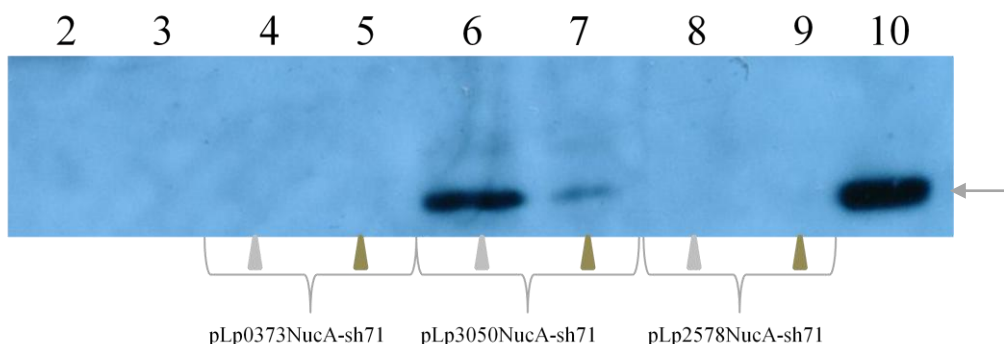
Figur 4.8A viser at produksjon av NucA i *L. rhamnosus* er generelt lav. Figur 4.8A viser i tillegg at samme mengde NucA produseres i *L. rhamnosus* ved bruk av pLp2578NucA-sh71 som ved bruk av de to andre sekresjonsplasmidene, men at sekresjonseffektiviteten er betydelig lavere ved bruk av SP_2578. Dette samsvarer med at det ikke ble funnet noe ekstracellulært NucA ved bruk av pLp2578NucA-sh71 (se også figur 4.7F, brønn 7-9).

Figur 4.8B viser at det er ingen produksjon av NucA ved bruk av pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 i *L. gasseri*, mens det er høy produksjon og høy sekresjonseffektivitet ved bruk av pLp3050NucA-sh71. Dette var et overraskende resultat da sekresjonsplasmidene er identiske, med unntak av SP- sekvensen. Det ble utført western blott analyse på SN og cellelysate fra *L. gasseri* to ganger til, med samme resultat.

A) *L. rhamnosus*;



B) *L. gasseri*

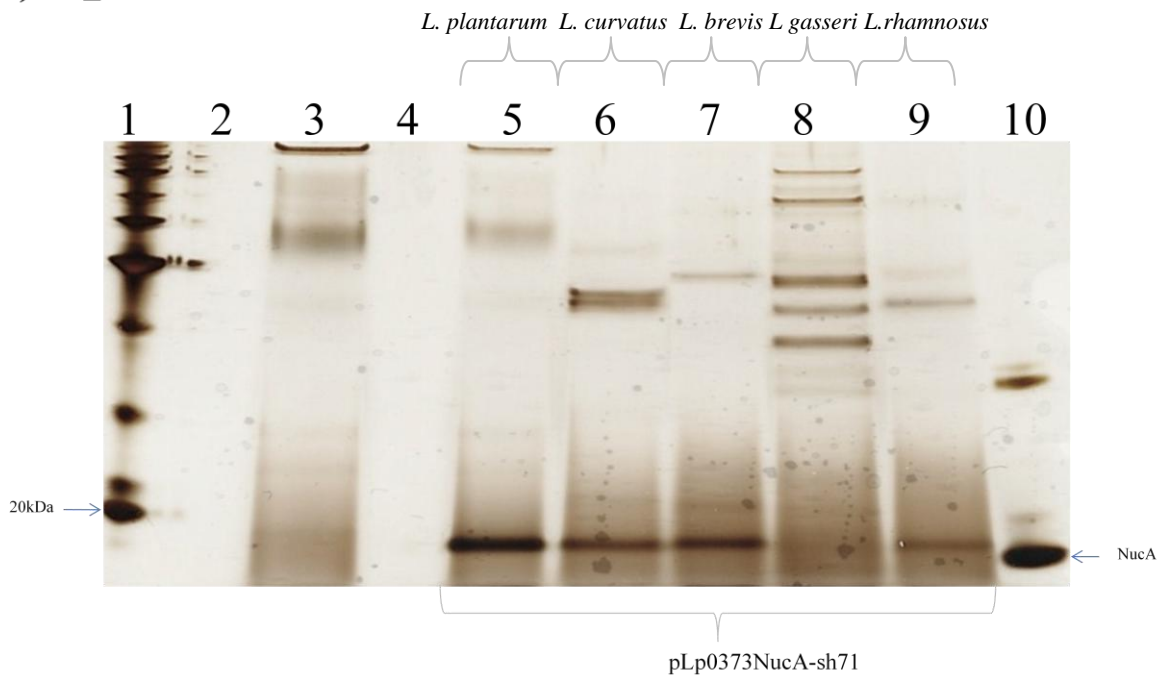


Figur 4.8. Western blott analyse av proteinfraksjoner fra *L. rhamnosus* ATCC53103/GG (A) og *L. gasseri* ATCC33323T (B) med tre ulike sekresjonsplasmid. Materialet ble høstet 4 timer etter induksjon og prøvevolumene tilsvarte 20µl av den opprinnelige kulturen. Type sekresjonsplasmid er angitt under gelen. Pilene til høyre viser NucA-bånd på ca 17kDa. Gelene A og B viser fra venstre: Standardproteiner (1), *L. plantarum*/pEV (2), Tom brønn (3), SN (grått pilhode) og lysat (brunt pilhode) (4-9), og 0,5µg ferdig prosessert NucA (10).

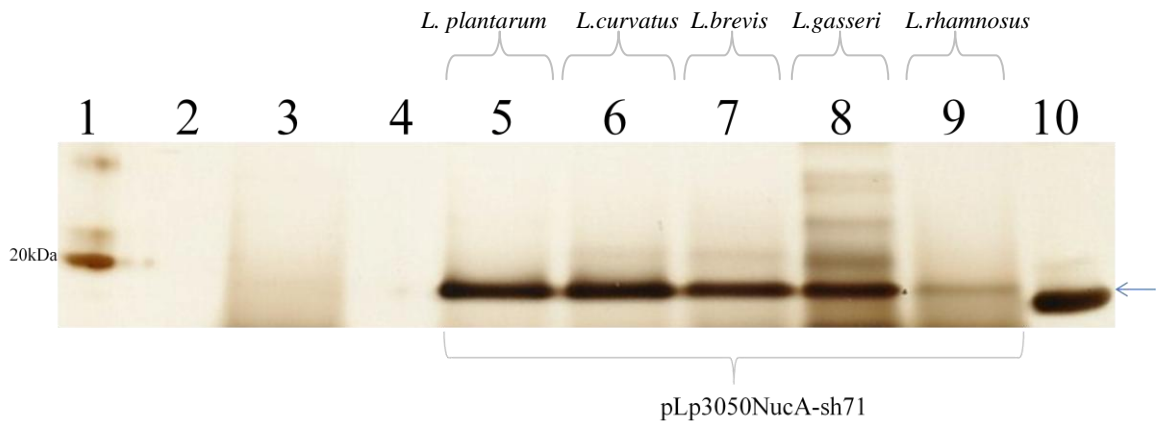
Ut ifra resultatene i figur 4.6-4.8 ble det bestemt å gjøre nøyere analyser av sekresjonskapasiteten for de to mest effektive SP'ene, SP_0373 og SP_3050. Prøver fra stammer med disse SP'ene ble kjørt på samme LDS-gel for lettere å kunne sammenlikne mengde sekretert protein i de ulike artene (figur 4.9). Som kontroll ble *L. plantarum*/pEV benyttet. Figur 4.9B viser generelt høy sekresjon av NucA hos samtlige arter ved bruk av SP_3050, med unntak av *L. rhamnosus*. For SP_0373 var sekresjonsmengdene generelt noe lavere og det var mer variasjon mellom artene (figur 4.9A).

Interessant nok var den målte OD₆₀₀ halvparten så høy hos *L. brevis* (figur 4.9A og B, brønn 7) og *L. rhamnosus* (figur 4.9A og B, brønn 9) sammenliknet med de andre artene. Likevel sekreterer *L. brevis* samme mengde NucA som de artene som har dobbelt så høy OD₆₀₀.

A) SP_0373



B) SP_3050

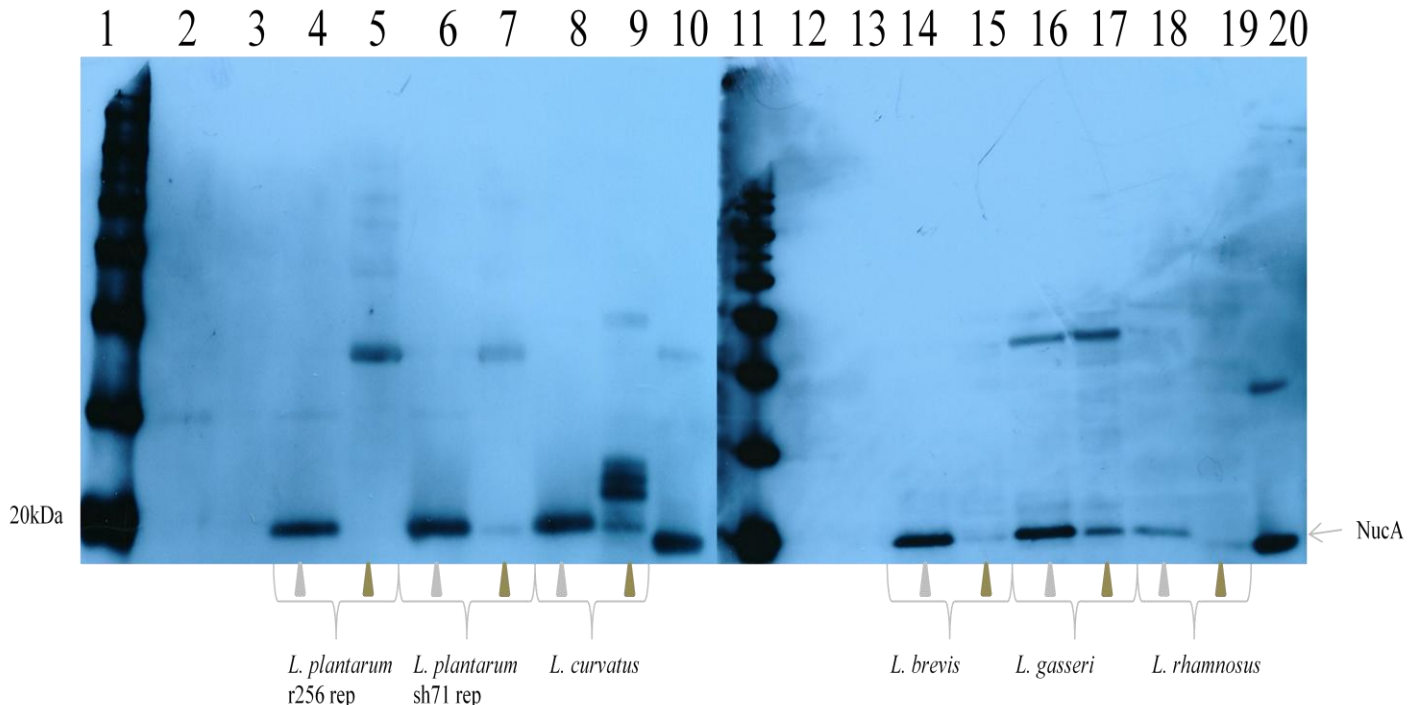


Figur 4.9. LDS-PAGE analyse av supernatant fra forskjellige *Lactobacillus* kulturer. Art og type sekresjonsplasmid er angitt over og under gelene i både **A)** og **B)**. Pilen til høyre viser NucA- bånd. Gelene viser fra venstre: Standardproteiner (1), tom brønn (2), *L. plantarum*/pEV (3), tom brønn (4), *L. plantarum* (5), *L. curvatus* (6), *L. brevis* (7), *L. gasseri* (8), *L. rhamnosus* (9) og 0,5µg renset NucA (10). Materialet ble høstet 4 timer etter induksjon og prøvevolumene tilsvarte 20µl av den opprinnelige kulturen. Gelene er sølvfarget.

4.5.4 Sekresjonseffektivitet i *Lactobacillus* spp.

For å sjekke og sammenlikne sekresjonseffektiviteten mellom det best fungerende SP i hver art, ble SN og cellelysatsat kjørt på LDS- PAGE og NucA ble detektert ved western blott analyse, som vist i figur 4.10. Basert på figur 4.6- 4.8 (over) ble plasmidet pLp3050NucA-sh71 valgt for alle artene med unntak av *L. rhamnosus*, hvor pLp0373NucA-sh71 ble valgt. *L. plantarum*/pEV ble benyttet som negativ kontroll.

Figur 4.10 viser at *L. curvatus*, *L. brevis* og *L. gasseri* produserer omtrent lik mengde NucA totalt (ekstracellulært + intracellulært) som *L. plantarum*, mens *L. rhamnosus* produserer tilsynelatende mye mindre NucA totalt. Lysatprøven fra *L. curvatus* (figur 4.10, brønn 9) skiller seg derimot ut ved at den viser en del bånd som er noen kDa større enn NucA- båndet. Dette er en interessant observasjon fordi totalmengden produsert NucA i *L. curvatus* øker betydelig om de intracellulære båndene skulle vise seg å være uprosessert NucA. Videre viser figur 4.10 at sekresjonseffektiviteten er høy i samtlige arter, som tidligere også vist i *L. plantarum* (figur 4.6) for de to SP'er som er benyttet her (SP_0373 og SP_3050). Små mengder NucA-fraksjoner på ca 17kDa kan likevel sees intracellulært hos enkelte av arter, slik som *L. curvatus* (figur 4.10, brønn 9) og *L. gasseri* (figur 4.10, brønn 17). Figur 4.10 viser også at totalproduksjonen av NucA er større i *L. plantarum* etter bytte av replikon, men at sekresjonseffektiviteten blir noe lavere, som samsvarer med figur 4.5 og 4.6.



Figur 4.10. Western blott analyse av proteinfraksjoner fra SN (grått pilhode) og lysat (brunt pilhode) fra *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis* og *L. gasseri* med sekresjonsplasmid pLp3050NucA-sh71, og *L. rhamnosus* med sekresjonsplasmid pLp0373NucA-sh71. Materiale ble høstet 4 timer etter induksjon og prøvevolumet tilsvarer 20 µl av den opprinnelige kulturen. Art er angitt under gelen. Uttrykk av *L. plantarum* er vist med to

typer replikon, også angitt under gelen. Pilen til høyre viser NucA- bånd. Gelen viser: Standardproteiner (1 og 11), *L. plantarum*/pEV (2 og 12), tom brønn (3 og 13), SN (grått pilhode) og lysat (brunt pilhode) fra ulike arter som er angitt under gelen (4-9 og 14-19) og 0,5 µg renset NucA (10 og 20).

4.5.5 Kvantifisering

Siden det ble tatt med en prøve med 0,5 µg renset NucA i alle gelene beskrevet ovenfor er det mulig å få grove estimater på mengde NucA produsert og mengde NucA sekretert ved å sammenlikne intensiteten på de forskjellige båndene. En oversikt over disse (grove) estimatene gis i tabell 4.3, som er basert på figurene 4.5 - 4.10.

Tabell 4.3. Estimater på mengde (µg/ml) NucA produsert og sekretert fire timer etter induksjon i fem *Lactobacilli*- arter ved bruk av tre ulike sekresjonskonstrukter. Konsentrasjonen er anslått ved sammenligning med 0,5µg renset NucA som ble kjørt i brønn 10 i alle geler. (i.b står for ”ikke bestemt”)

Arter	pLp0373Nuc- <i>sh71</i>	pLp3050Nuc- <i>sh71</i>	pLp2578Nuc- <i>sh71</i>	pLp3050Nuc
<i>L. plantarum</i>	Produsert:22,5µg/ml	Produsert:32,5µg/ml	Produsert:7,5µg/ml	Produsert:25µg/ml
	Sekretert:22,5µg/ml	Sekretert:30µg/ml	Sekretert:5µg/ml	Sekretert: 25µg/ml
<i>L. curvatus</i>	Produsert: i.b.	Produsert:35(65)µg/ml*	Produsert: i.b.	i.b.
	Sekretert:20µg/ml	Sekretert:32,5µg/ml	Sekretert:25µg/ml	i.b.
<i>L. brevis</i>	Produsert: i.b.	Produsert:27,5µg/ml	Produsert: i.b.	i.b.
	Sekretert:25µg/ml	Sekretert:25µg/ml	Sekretert:25µg/ml	i.b.
<i>L. gasseri</i>	Produsert:0 µg/ml	Produsert:30µg/ml	Produsert:0 µg/ml	i.b.
	Sekretert:0 µg/ml	Sekretert:25µg/ml	Sekretert: 0 µg/ml	i.b.
<i>L. rhamnosus</i>	Produsert:5µg/ml	Produsert:5µg/ml	Produsert:5µg/ml	i.b.
	Sekretert:5µg/ml	Sekretert:5µg/ml	Sekretert:0 µg/ml	i.b.

*Den høyeste verdien er medregnet de sterke intracellulære bånd observert som var noen kDa større enn de ekstracellulære NucA- båndene.

4.6 Plasmid kopinummer - analyse

Fries et. al (2004) har vist at plasmid kopinummer (PKN) ikke uforventet kan ha betydelig effekt på syntesen av rekombinante proteiner som er kodet av gener som ligger på plasmidet. Slike mulige forskjell i gendosen må det tas hensyn til når man vurderer systemer for genuttrykk, slik som i dette studiet. PKN kan også påvirke cellenes vekst (Friehts 2004), som er interessant i forhold til at artene vokser med noe ulik hastighet (figur 4.4).

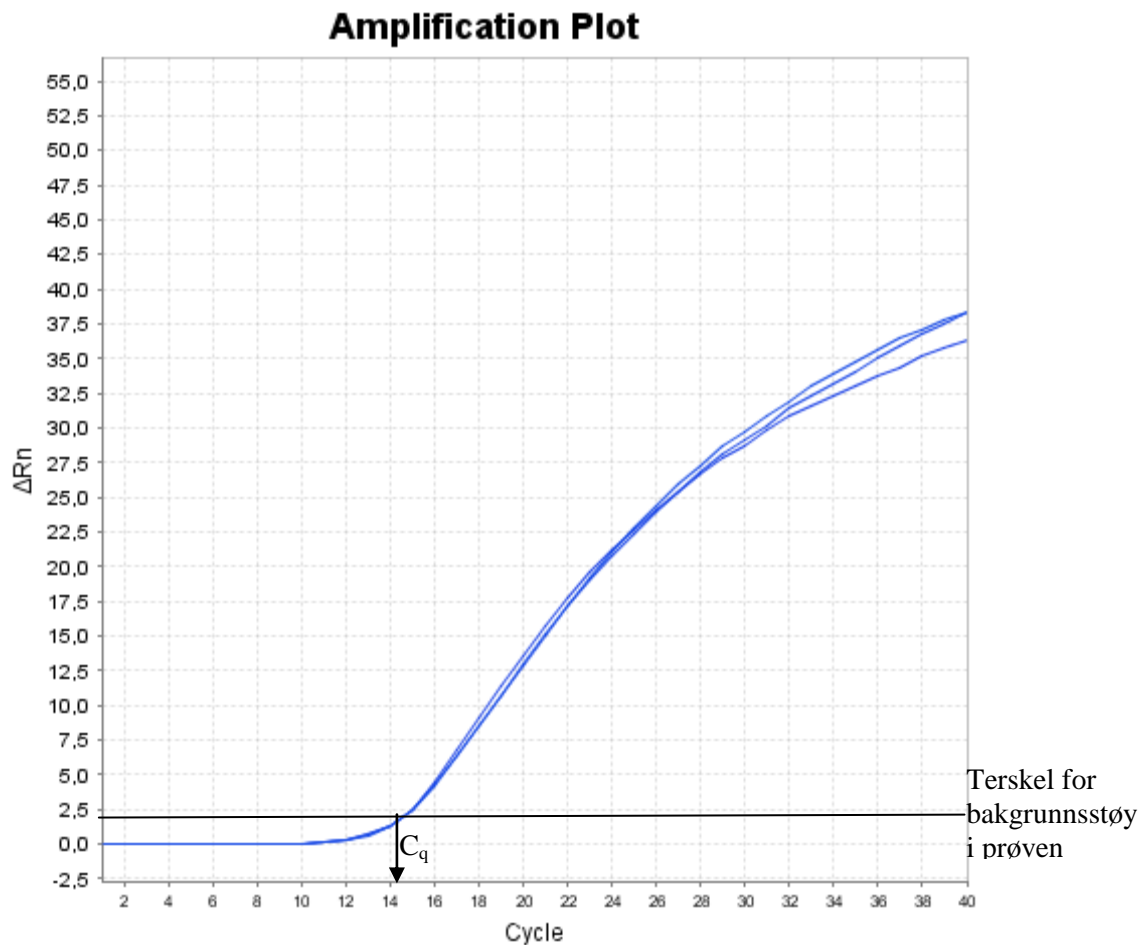
I figur 4.10 (over) ser man at produksjonen av NucA varierer mellom *L. rhamnosus* og resten av artene. I tillegg viser figur 4.5 (over) en økning i produksjonen av NucA ved bytte av replikon i *L. plantarum*. For å sjekke om variasjon i produksjon og sekresjon av NucA kunne være forårsaket av et høyere plasmid kopinummer (PKN), ble det utført en PKN- analyse på de transformantene som vises i figur 4.10 (over). Dvs. at alle fem lactobacilli ble testet og at begge replikon ble testet for *L. plantarum*. Analysen ble utført ved bruk av kvantitativ PCR (qPCR) med SYBR Green deteksjon, som beskrevet i kapittel 3.10.3. Primere benyttet i PKN- analysen er angitt og beskrevet i kapittel 2.5 og 2.6.

De utvalgte transformantene, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis* og *L. gasseri* med sekresjonplasmidet pLp3050NucA-sh71, *L. plantarum*/pLp3050NucA(r256 rep) og *L. rhamnosus*/pLp0373NucA-sh71, ble dyrket og høstet som tidligere (se kapittel 3.8.1). Total- DNA ble isolert fra cellene ved to ulike tidspunkt for hver art, henholdsvis rett før og (4 timer) etter induksjon. DNA-isoleringen ble gjort ved bruk av fenol- kloroform- metoden, beskrevet i kapittel 3.10.1. Begrunnelsen for å isolere DNA fra to ulike tidspunkt var at PKN kan forandres etter induksjon av genuttrykk på rekombinante plasmid (Friehts 2004), og PKN ble derfor beregnet rett før og fire timer etter induksjonen av uttrykket av NucA i de forskjellige *Lactobacillus* artene.

I en PKN analyse lager man spesifikke primere mot genomet og plasmidet for å kunne sammenlikne mengden genom med mengden plasmid i en kvantitativ PCR reaksjon. Genet for Gro-EL ble valgt som markør for kromosomalt DNA (endogen kontroll) i PKN-analysen, ikke minst fordi dette området allerede var sekvensert hos samtlige arter i dette studiet, noe som gjorde ”primerdesign” lettere. Det ble imidlertid ikke funnet en felles DNA-sekvens i de ulike artene, og derfor ble det laget ett primerpar for hver art. Som markør for plasmid- DNA ble genet for erytromycinresistens (heretter kalt Ery^R) benyttet, fordi dette genet hadde blitt brukt i et nyere studie med vellykket resultat (Nguyen et al. 2011).

Kvantitativ PCR kan benyttes til å bestemme antall målsekvenser tilstede i en gitt prøve (se også kapittel 3.10.3). ”Quantification cycle” (C_q) er betegnelsen som brukes for å måle dette og er nummeret på PCR- syklusen der amplifiseringskurven møter den automatisk satte terskelen for målt bakgrunnstøy i prøven (se eksempel i figur 4.11). C_q er derved et relativt mål på konsentrasjonen av målgenet i PCR-reaksjonen; desto mindre templat til stede i prøven ved start desto høyere vil C_q bli

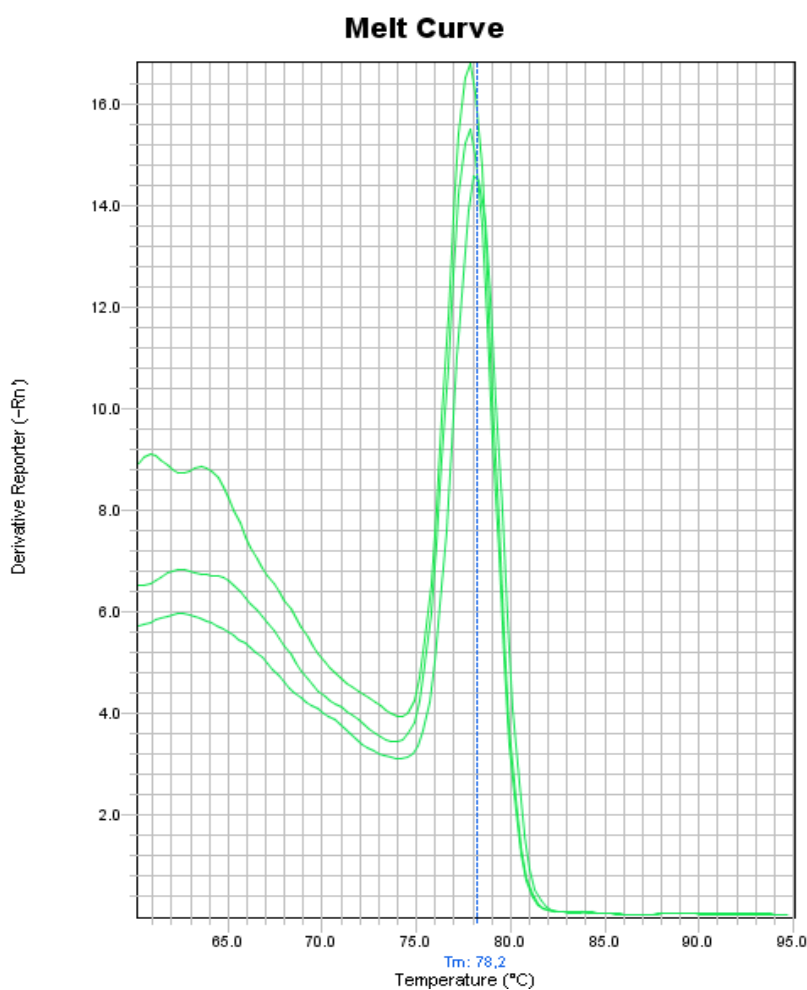
fordi det trengs flere sykluser for å komme i den eksponentielle fasen og møte den satte terskelen for bakgrunnstøy i prøven. ”SYBR Green” inneholder fluoroforer og gir grønt fluorescerende signal (når den utsettes for blått lys) bare når den er bundet til ”minor groove” i dobbeltrådet DNA, slik som ved PCR-produkt. Signalet blir dermed proporsjonalt med mengden oppamplifisert målsekvens.



Figur 4.11. Amplifiseringskurven for tre replikat-prøver av genomisk DNA fra *L. plantarum*. Terskel for målt bakgrunnstøy i prøven er vist med sort horisontal linje. Pil der amplifiseringskurven møter den automatisk satte terskelen viser ”Quantification Cycle” (C_q)-verdien. Data er hentet fra Applied Biosystems/Step One Software.

Uspesifikke qPCR-produkt vil ved bruk av SYBR Green deteksjon gi ukorrekte C_q -verdier. For å sjekke om de konstruerte primerne ga spesifikke produkt ble det først utført vanlig PCR etterfulgt av agarose gel elektroforese med EtBr deteksjon på de aktuelle DNA-preparatene. Alle primerpar viste spesifikke PCR-produkt. Primer spesifisiteten ble bekreftet i PKN-analysen, hvor det ble bestemt en

smeltekurve på alle PCR-produktene etter hver analyse for å sjekke for eventuell heterogenitet i produktet. Som et eksempel på dette viser figur 4.12 smeltekurven til PCR-produktet av genomisk DNA fra *L. plantarum*, hvor kurvens topp viser at smeltepunktet til ampliconene fra qPCR-analysen ligger på 78,2 °C. Eventuelle uspesifikke PCR-produkt, som en primer- dimer, ville dannet en egen topp ulik det spesifikke produktet fordi ulike sekvenser gir ulike smeltepunkter. Det ble utført smeltekurver på alle DNA-preparater (dvs alle fem arter), både med GroEL-, og Ery^R-primere der det ble sjekket for uspesifikke produkt. Triplikatprøver fra samtlige DNA-preparatene viste homogenitet i PCR-produktene.



Figur 4.12. Smeltekurve for qPCR-produktet av genomisk DNA fra *L. plantarum*. Temperatur angis på x-akse og signal fra "SYBR Green" reporter angis på y-akse. Prøven er kjørt i triplikater og alle tre kurver vises. Smeltepunktet er på 78,2 °C. Data er hentet fra Applied Biosystems/Step One Software.

I PKN-analysen ble to separate reaksjoner kjørt for hver av de to ulike høstingstidspunktene for hver art. Én reaksjon ble satt opp for deteksjon av plasmid DNA, og én reaksjon ble satt opp for

detektesjon av kromosomalt DNA. For nøyaktighetens skyld ble det laget mastermikser av reagensene, og ingen volum < 9µl ble pipettert for å minimere sjansen på større pipetteringsfeil. Hver reaksjon ble satt opp i triplikater, og en reaksjon der dH₂O erstattet templatet ble brukt som negativ kontroll. Til sammen ble det satt opp 93 reaksjoner.

4.6.1 Validering av qPCR- analysen

For å sjekke om amplifiseringseffektiviteten til primere avhenger av templat-fortynningen ble det utført en valideringsanalyse av qPCR før PKN- analysen. Variasjonen av C_q ble sjekket for 3 til 5 (10 x) fortynninger av templat-DNAet for hver art, med både Ery^R primerparet og Gro-EL primerparet (se eksempel tabell 4.4 og figur 4.13). For å sikre nøyaktighet ble det laget en mastermiks av reagenser også her, og det ble ikke pipettert volum < 6µl. Tabell 4.4 viser data fra qPCR-analyse av en 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ og 10⁻⁴ fortynningsrekke av genomisk DNA fra *L. plantarum*. 0-fortynningen (tabell 4.4) viser en veldig høy C_q, som kan forekomme i qPCR ved for høy konsentrasjon av templat. Denne verdien ble derfor sett på som slenger og tatt bort. C_q-verdiene fra de ulike prøvene ble plottet versus log₁₀ av DNA- fortynningene (se eksempel figur 4.13). Når grafen til den aktuelle prøven viser et stigningstall på -3,332 C_q per 10 x fortynning, vil dette si en fordobling av PCR-produkt for hver syklus, altså 100 % amplifiseringseffektivitet (E= 2). En slik optimal situasjon blir sjeldent observert og det er vanlig i qPCR å godta eksperimenter hvor stigningstallet ligger innenfor området 3,1-3,5 (Livak & Schmittgen 2001).

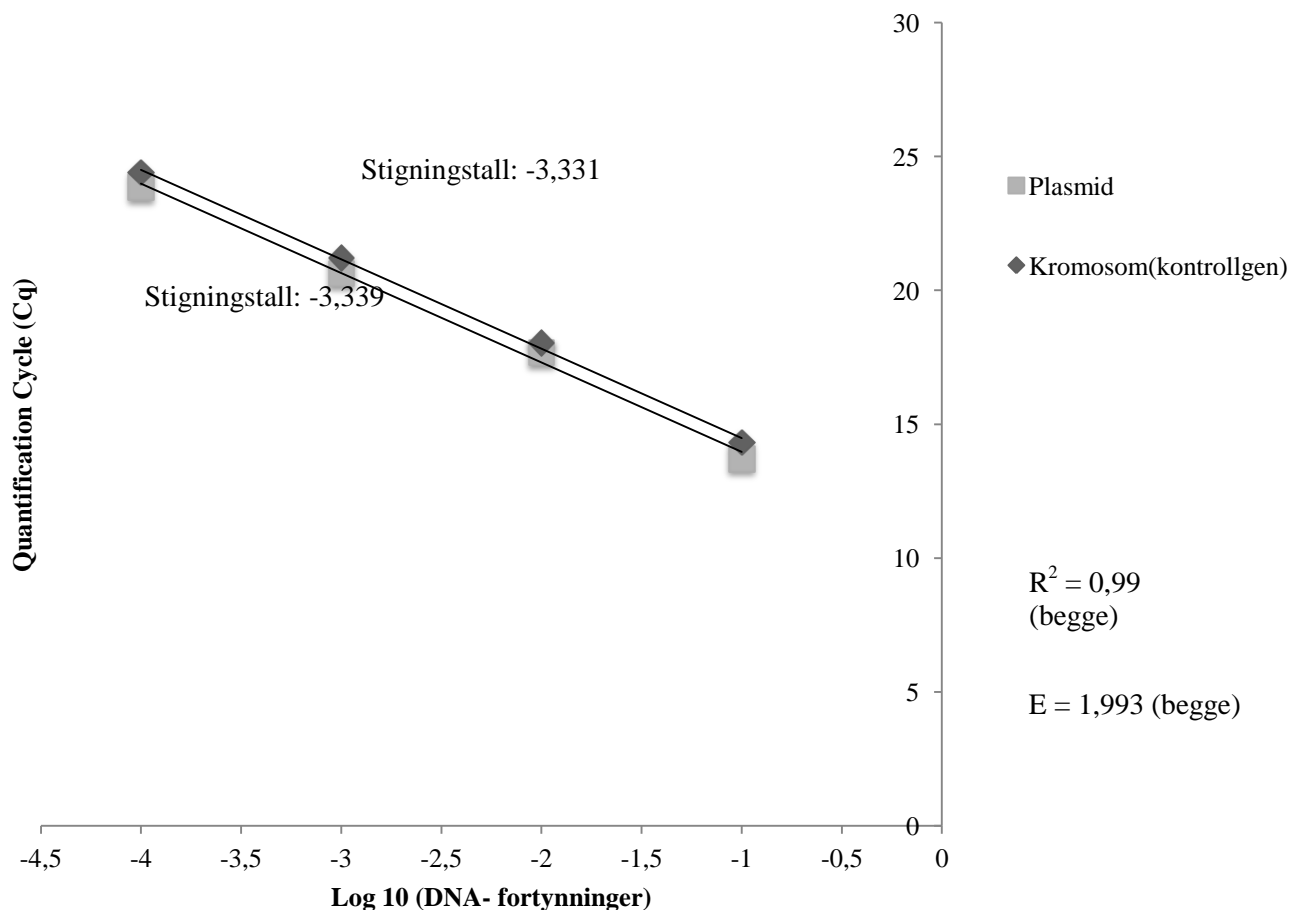
Tabell 4.4. Data fra qPCR-kjøring for *L. plantarum*/pLp3050NucA-sh71 med Gro- El primerparet.
Data er hentet fra Applied Biosystems/Step One Software.

Brønn	DNA- Fortynning	Målgen	Reporter	C _q
A1	10 ⁰	Gro-EL	SYBR	34,08*
A2	10 ⁻¹	Gro-EL	SYBR	12,01
A3	10 ⁻²	Gro-EL	SYBR	14,91
A4	10 ⁻³	Gro-EL	SYBR	17,94
A5	10 ⁻⁴	Gro-EL	SYBR	20,11

*Må betraktes som en ”outliner”

Figur 4.13 viser valideringsresultatene for *L. plantarum*/pLp3050NucA-sh71, for begge primersett (Ery^R-primere og Gro-EL). Stigningstallene ligger på henholdsvis -3,331 og -3,339. Amplifiseringseffektiviteten (E) ble så regnet ut basert på stigningstallet ved bruk av likningen $E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$. For *L. plantarum* ble E-verdi for begge qPCR reaksjonene beregnet til å være 1,993, som tilsvarer en prosentvis amplifiseringseffektivitet på 99,3 %.

Tabell 4.4 og figur 4.13 viser altså eksempler på hvordan amplifiseringseffektiviteten (E) ble bestemt. Amplifiseringseffektiviteten ble bestemt på samme måte for hvert primerpar. Samme prosedyre ble gjort for de fire andre artene, og en oversikt av resultatene er vist i tabell 4.5 (induserte prøver) og tabell 4.6 (uinduserte prøver). Applied Biosystems anbefaler en amplifiseringseffektivitet mellom 1,8-2,2 (90-110 %) for qPCR. Dette ble oppnådd i alle tilfeller med et lite unntak (*L. brevis*, tabell 4.5) og primerne ble derfor benyttet til kjøring i PKN-analysen.



Figur 4.13. Bestemmelse av amplifiseringseffektivitet (E) for plasmid- og genomisk DNA fra *L. plantarum* WCSF1. E-verdiene for erytromycinresistens genen fra plasmid-DNA (E) og Gro-EL fra kromosomalt DNA (E) ble kalkulert basert på stigningstallet med likningen $E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$. Plasmid står for Plasmid-DNA fra *L. plantarum*. Kromosom (kontrollgen) står for kromosomalt DNA fra *L. plantarum*.

Tabell 4.5. Amplifiseringseffektivitet (E) for primersettene for Ery^R og Gro-EL, brukt på DNA fra fem ulike **induserte** *Lactobacillus* stammer. E-verdiene for erytromycinresistens genet fra plasmid-DNA (E_{Ery^R}) og Gro-EL fra kromosomalt DNA (E_{Gro-EL}) ble regnet ut ved hjelp av likningen $E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$.

Indusert Art	Stigningstall		Amplifiseringseffektivitet (E)	
	Plasmid	kromosom	Plasmid	Kromosom
<i>L. plantarum WCFS1</i>	-3,339	-3,331	1,99	1,99
<i>L. curvatus DSM20019</i>	-3,462	-3,457	1,95	1,95
<i>L. brevis DMSZ20556</i>	-2,880	-3,005	2,22*	2,15*
<i>L. gasseri ATCC33323T</i>	-3,264	-3,284	2,03	2,02
<i>L. rhamnosus ATCC53103/GG</i>	-3,377	-3,376	1,98	1,98

*Stigningstallet på regresjonsgrafen er litt under foretrukket nedre grense på 3,1 som kan gi en noe høyere E- verdi.

Tabell 4.6. Amplifiseringseffektivitet (E) for primersettene for Ery^R og Gro-EL, brukt på DNA fra fem ulike **uinduserte** *Lactobacillus* stammer. E-verdiene for erytromycinresistens genet fra plasmid-DNA (E_{Ery^R}) og Gro-EL fra kromosomalt DNA (E_{Gro-EL}) ble regnet ut ved hjelp av likningen $E = 10^{-1/\text{stigningstall}}$.

Uindusert Art	Stigningstall		Amplifiseringseffektivitet (E)	
	Plasmid	kromosom	Plasmid	Kromosom
<i>L. plantarum WCFS1</i>	-3,340	-3,339	1,99	1,99
<i>L. curvatus DSM20019</i>	-3,240	-3,278	2,04	2,02
<i>L. brevis DMSZ20556</i>	-3,174	-3,249	2,07	2,03
<i>L. gasseri ATCC33323T</i>	-3,249	-3,321	2,03	2,00
<i>L. rhamnosus ATCC53103/GG</i>	-3,337	-3,573	1,99	1,91

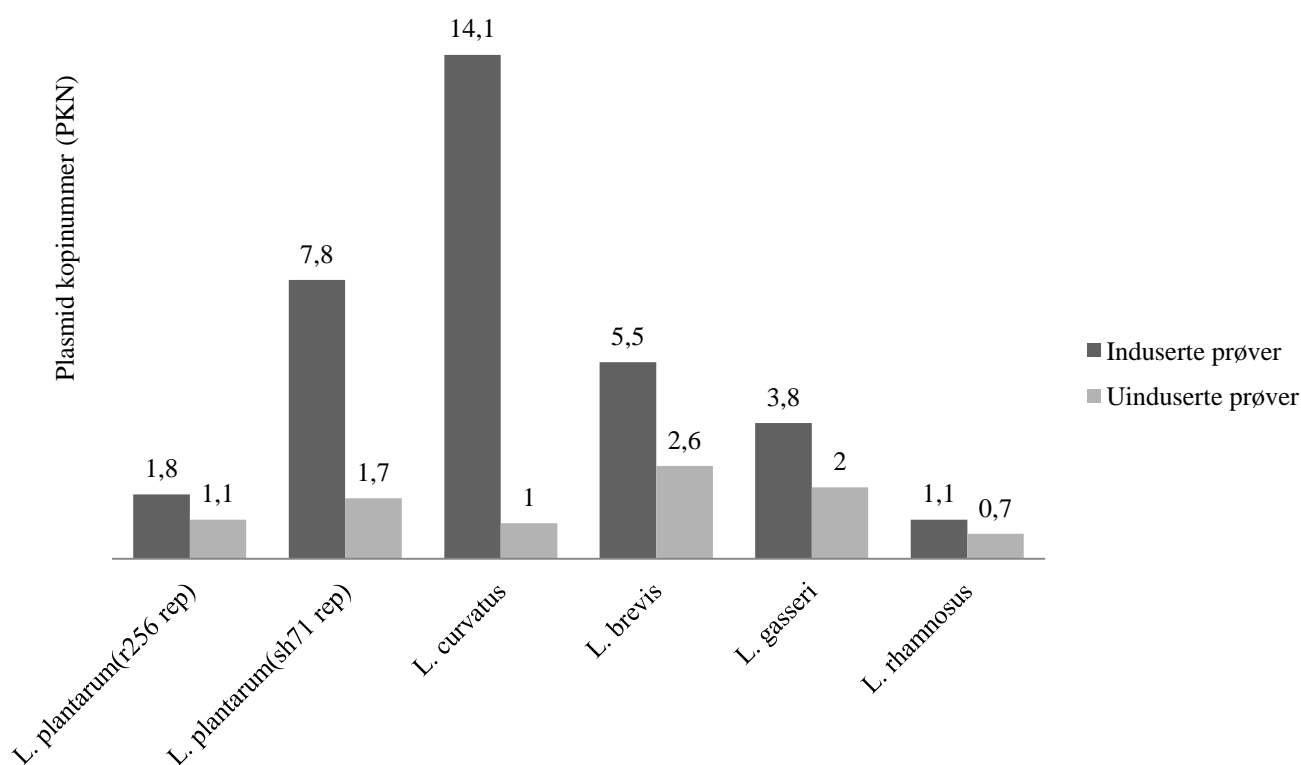
4.6.2 Plasmid kopinummer i *Lactobacillus* spp.

Definisjonen av PKN er antall kopier av plasmidet som er til stede per kromosom i en bakterie (Friebs 2004; Lee et al. 2006). For å finne PKN i de ulike artene ble triplikatprøver kjørt med qPCR på DNA-fortynningen som hadde en C_q -verdi på mellom tolv og tyve sykluser i valideringsforsøket (se kapittel 4.6.1). Dette fortynningsintervallet ble valgt for å unngå for høy eller for lav konsentrasjon av DNA, som kan resultere i feil C_q -verdi. En oversikt over C_q -verdiene benyttet til PKN utregning er vist i tabell 4.7. PKN til de ulike transformantene (figur 4.14) ble regnet ut ved å sammenlikne C_q -verdiene til plasmid-DNA-reaksjoner og C_q -verdiene til den endogene kontrollen (kromosomalt DNA-reaksjoner), der spesifisiteten til primerne (E) benyttet også blir tatt hensyn til (Skulj et al. 2008), som vist i figurteksten til figur 4.14.

Tabell 4.7. "Quantification Cycle" (C_q)- verdier til triplikatprøver av plasmid- og kromosom-reaksjonene for seks forskjellige *Lactobacillus*-transformanter. Gjennomsnittsverdier av triplikatprøvene ble benyttet til utregning av PKN (se figurteksten til figur 4.14). Høstingstidspunktene til gjeldende prøver er rett før (Uindusert) og fire timer etter (Indusert) induksjon av NucA produksjonen.

Art/plasmid	Uindusert		Indusert	
	Plasmid	Kromosom	Plasmid	Kromosom
<i>L. plantarum/pLp3050NucA</i>	14,29	14,92	14,34	15,51
	14,19	14,90	14,24	15,47
	14,30	14,88	14,33	15,41
<i>L. plantarum/pLp3050NucA-sh71</i>	13,94	14,56	12,48	15,25
	13,64	14,49	12,61	15,26
	13,76	14,59	12,42	15,11
<i>L. curvatus/pLp3050NucA-sh71</i>	13,45	13,64	12,88	16,86
	13,27	13,53	12,96	16,85
	13,58	13,63	12,96	16,95
<i>L. brevis/pLp3050NucA-sh71</i>	15,20	16,91	12,45	15,15
	15,14	16,78	12,29	15,12
	15,21	16,95	12,35	15,11
<i>L. gasseri/pLp3050NucA-sh71</i>	13,69	14,86	13,91	15,91
	13,76	15,17	13,28	15,34
	13,94	15,24	13,89	15,87
<i>L. rhamnosus/pLp0373NucA-sh71</i>	19,40	20,05	13,75	13,92
	19,38	19,95	13,85	13,89
	19,35	19,91	13,67	13,95

Figur 4.14 viser PKN til de ulike transformantene, hvor *L. curvatus* har flest og *L. rhamnosus* har færrest plasmider. Samme figur viser at *L. plantarum* har en betydelig høyere PKN etter bytte av replikon. Det ble også observert at PKN generelt er betydelig høyere i induserte celler enn i de uinduserte. Spesielt stor forskjell i kopinummer på induisert og uindusert prøve ble observert hos *L. curvatus*. Tabell 4.8 viser videre en sammenlikning av PKN og estimert mengder NucA produsert totalt i de ulike artene. *L. curvatus* har fått to verdier, der de sterke intracellulære båndene funnet (se figur 4.10) er medregnet i den høyeste verdien. PKN i *L. plantarum* med SH71 replikon, *L. curvatus* og *L. rhamnosus* samsvarer med mengde produsert NucA observert i figur 4.10, der *L. plantarum* med SH71 replikon og *L. curvatus* er de som produserer mest NucA, mens *L. rhamnosus* produserer minst mengde NucA.



Figur 4.14. Plasmid kopinummer (PKN) i seks ulike *Lactobacillus*- transformanter med plasmidene pLp3050NucA (*L. plantarum*(r256rep)) eller pLp0373NucA-sh71 (*L. rhamnosus*) eller pLp3050NucA-sh71 (alle øvrige) for uinduserte celler (lysegrått) og induserte celler (mørkegrått), altså de to høstingstidspunktene rett før og fire timer etter induksjon. PKN er regnet ut ved bruk av likningen $PKN = (E_k)^{C_{qk}} / (E_p)^{C_{qp}}$ hvor E_k og C_{qk} er amplifiseringsverdien (E) og ”quatification cycle”(c_q)- verdien til amplikon som representerer kromosom, og E_p og C_{qp} er amplifiseringsverdien (E) og ”quatification cycle”(C_q)- verdien til amplikon som representerer plasmidet.

Tabell 4.8. Sammenlikning av estimatene på mengde ($\mu\text{g/ml}$) NucA produsert totalt (tabell 4.3) og plasmid kopinummer (PKN) i induerte prøver (figur 4.14). Estimaten på produksjon gjelder følgende plasmider (tilsvarende figur 4.10): pLp3050NucA (*L. plantarum*-r256rep), pLp0373NucA-sh71 (*L. rhamnosus*) og 3050NucA-sh71 (alle øvrige arter).

Arter	Estimat på mengde ($\mu\text{g/ml}$) NucA produsert totalt	PKN (induserte prøver)
<i>L. plantarum</i> (r256 rep)	25 $\mu\text{g/ml}$	1,8
<i>L. plantarum</i> (SH71rep)	32,5 $\mu\text{g/ml}$	7,8
<i>L. curvatus</i>	35 (65) $\mu\text{g/ml}$ *	14,1
<i>L. brevis</i>	27,5 $\mu\text{g/ml}$	5,5
<i>L. gasseri</i>	30 $\mu\text{g/ml}$	3,8
<i>L. rhamnosus</i>	5 $\mu\text{g/ml}$	1,1

*Den høyeste verdien er medregnet de sterke intracellulære bånd observert som var noen kDa større enn de ekstracellulære NucA- båndene.

5. Diskusjon

Det tidligere konstruerte pSIP- vektorsystemet er vist å gi effektiv og regulerbar intracellulær produksjon av proteiner i *Lactobacillus* (Sorvig et al. 2003; Sorvig et al. 2005). Systemet er senere blitt videreutviklet for anvendelse til sekresjon av heterologe proteiner (Mathiesen et al. 2008). pSIP-derivatene benyttet i dette studiet er laget med utbyttbare signalpeptider (SP'er) som er translasjonelt koblet til målproteinene (figur 4.1), og systemet har hittil blitt benyttet til å sekretere proteiner som NucA og Amylase (Mathiesen et al. 2008; Mathiesen et al. 2009), tuberkulose- antigen (Mathiesen et al., upubliserte resultater) og oncofetal antigen (Fredriksen et al. 2010). Systemet i sin nåværende form har en ulempe ved at det kun kan benyttes i et fåtall av *Lactobacillus* arter, slik som *L. plantarum* og *L. sakei*. Målet i dette studiet var derfor og undersøke om man, ved skifte av replikon i et utvalg av pSIP- vektorer fra et nylig konstruert SP- bibliotek med SP'er fra *L. plantarum* WCFS1 (Mathiesen et al. 2009), kan få effektiv produksjon og sekresjon av et heterologt protein i andre arter av *Lactobacillus*. Dette vil utvide bruken av sekresjonsystemet i tillegg til å utvide verktøykassen for levende vektorer til bruk ved *in situ* levering av vaksiner. Resultatene viste at sekresjonsystemet også er anvendelig i andre arter av *Lactobacillus* ved bruk av SP'er fra *L. plantarum* WCFS1 og at enkelte av vektor-vert systemene fører til like bra sekresjon som i *L. plantarum* (figur 4.7, 4.9 og 4.10). Dette er interessant i forhold til at andre arter kan ha ulike immunomodulerende effekter enn hva *L. plantarum* har. Resultatene viser i tillegg at bytte fra r256 replikon til SH71 replikon forbedrer sekresjon i *L. plantarum* (figur 4.5).

5.1 Konstruksjon av sekresjonsvektorer

Som beskrevet over er lactobacilli interessante som celleleverter i dette studiet for å finne nye vektor-vert systemer. Lactobacilli ble også valgt som celleleverter fordi de har GRAS- status, og fordi de er den mest syretolerante gruppen av LAB og kan overleve i fordøyelseskanalen (Seegers 2002), som er en nødvendighet ved *in situ* levering i tarmen. Bakterienes evne til å oppbevare seg over lengre tid i tarmen, slik som *Lactobacillus*, har blitt sett i sammenheng med sterkere immunresponser i vertsorganismen enn ved benyttelse av andre LAB til *in situ* levering i tarmen (Granette et al. 2002). Flere *Lactobacillus* har nå kjente genomsekvenser (Makarova et al. 2006) som åpner muligheten for å studere og utforske lactobacilli, og det finnes tilgjengelige systemer for heterologt genuttrykk som opprinnelig er utviklet for *L. plantarum* og *L. sakei* (Sorvig et al. 2003). pSIP-systemet benyttet her anvender regulatoriske gener som er involvert i produksjonen av klasse II bakteriosinet sakacin P. Mange lactobacilli har regulatoriske gener for sakacin P også i kromosomet, som i teorien kan forstyrre genuttrykket ved at man får kryssaktivering (Maldonado et al. 2004). Arter med forekomst av kryssaktivering ville vist et tilsynelatende konstitutivt uttrykk i uttrykksanalysene. Arter som er uegnet

for pSIP-systemet ble derfor selektert bort før start ved å velge stammer som allerede var sjekket for induserbarhet av Nofima, altså var de utvalgte stammene ikke konstitutive. I tillegg til dette har stammer av de utvalgte *Lactobacillus* artene dokumenterte immunomodulerende effekter (se kapittel 1.1.1) i mennesker og/eller dyr, og er derfor vurdert som gode kandidater for vaksinelevering.

5.1.1 Valg av reporter-gen

I dette studiet ble Nuclease A (NucA) fra *Staphylococcus aureus* benyttet som reporterprotein fordi det tidligere er oppnådd vellykket sekresjon av dette proteinet i LAB (Dieye et al. 2001; Le Loir et al. 1998; Le Loir et al. 2001; Mathiesen et al. 2009; Poquet et al. 1998). NucA er et lite protein på ca 17kDa, med en forholdsvis stabil struktur som gjør det lite utsatt for nedbryting av proteaser (Alexandrescu et al. 1990). NucA- proteinet er stabilt helt opp til 100 grader (Heins et al. 1967). Videre er det tidligere utviklet spesifikke antistoff rettet mot NucA (MacConaill et al. 2003; Mathiesen et al. 2009), som gjør det mulig å studere sekresjonseffektiviteten i de enkelte artene ved bruk av western blott analyse (i tillegg til vanlige fargemetoder for LDS-PAGE geler som coomassie og sølvfarging) (Le Loir et al. 1994). Det er også et poeng at SP- biblioteket med SP'er fra *L. plantarum* allerede inneholdt dette reporter-genet og at genet har vist seg å fungere godt i *L. plantarum* (Mathiesen et al. 2009).

Reporterproteinet NucA er av bakteriell opphav og teoretisk sett enklere å sekretere enn proteiner med fremmed opphav, slik som terapeutiske proteiner. For proteiner med fremmed opphav er det større sannsynlighet at de er dårlig tilpasset vertens sekresjonssystem. NucA kan derved muligens gi et noe urealistisk bra bilde av sekresjon. Likevel, vellykket sekresjon og ankring av kreftantigener som HPV (Human Papilloma Virus)-16 E7 (Cortes-Perez et al. 2007) og oncofetalt antigen (Fredriksen et al. 2010) er allerede utført i *L. plantarum*, hvor det også i begge tilfeller har ført til spesifikke immunresponser i mus. I det sistnevnte studiet ble pSIP- sekresjonssystemet og SP_0373 fra *L. plantarum* benyttet. Forholdsvis store mengder antigen ble funnet ekstracellulært ved å benytte SP_0373, som også vist ved sekresjon av NucA i dette studiet. Disse tidligere observasjonene er oppløftende resultater med tanke på at systemet muligens også kan fungere til sekresjon av terapeutiske proteiner i andre *Lactobacillus* arter ved å benytte SP'er fra *L. plantarum*. Det bør likevel påpekes at sekresjonseffektivitet i *L. plantarum* var forholdsvis lav i det nevnte studiet, og at stammene vokste noe dårligere etter induksjon av antigen-produksjon (Fredriksen et al. 2010). Dette er en av grunnene til at det er interessant å lete etter alternative vektor-vert systemer, som i dette studiet. For å få maksimalt utbytte av sekresjonssystemet bør imidlertid optimalisering av SP'et mest sannsynlig utføres for hvert enkelt protein og for hver cellevert som benyttes siden det er slått fast at effektiv sekresjon avhenger av god tilpasning mellom SP'et og proteinet (Mathiesen et al. 2009), og siden sekresjon er vertsspesifikt (Halbmayer et al. 2008; Perez-Martinez et al. 1992).

5.1.2 Sekresjonsplasmidene

Kloningsprosessen var utfordrende, mest sannsynlig fordi det var vanskelig å få isolert nok DNA fra de ulike Gram-positive cellene. De tre sekresjonsplasmidene, pLp3050NucA-sh71, pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71, ble imidlertid vellykket konstruert ved bruk av restriksjonskutting og T4-ligering (se kapittel 4.2). For å sikre selektiv oppvekst av sekresjonsplasmidene inneholder de et erytromycinresistens gen. Ved bruk av levende vektorer i mennesker og dyr vil det være uheldig om gener for antibiotikaresistens ble overført til patogene mikroorganismer (Detmer & Glenting 2006). Ved utvikling av en vaksine er det derfor ønskelig å finne flere alternativer for stabil opprettholdelse av vektorer enn gener for antibiotikaresistens. Et forslag kan være å bruke genet for ”alanine racemase”, *alr*, som selektiv markør i stedet for et antibiotikaresistens gen. *alr*-genet ble nylig benyttet i et studie hvor en såkalt ”food-grade” variant av pSIP-systemet ble konstruert (Nguyen et al. 2011).

Bruk av vaksiner i mennesker og dyr bør heller ikke være avhengig av indusering av systemet for genuttrykk, som her. Konstitutivt genuttrykk, ved hjelp av konstitutive promotere (eks: (Rud et al. 2006)) bør derfor vurderes.

Et annet sikkerhetstiltak å tenke på ved bruk av genmodifiserte bakterier til vaksinelevering er å hindre spredning. Konsekvensene av spredning av genmodifiserte bakterier er ukjent, og kan være uheldig selv ved bruk av bakterier med GRAS-status. Det er tidligere gjort et forsøk på å hindre spredning av genmodifiserte *L. lactis* ved å fjerne et essensielt gen for overlevelse (Steidler et al. 2003). Dette gjorde stammen avhengig av thymine og thymidine for å overleve, som er stoffer som bakteriene kun får tak i innenfor menneskekroppen. Dette er en mulig strategi å benytte ved utvikling av levende vektorer for vaksinelevering.

5.2 Produksjon av NucA i *Lactobacillus spp.*

For å oppnå vellykket *in situ* levering av terapeutiske proteiner er det viktig med tilstrekkelig produksjon av det aktuelle proteinet i *Lactobacillus* artene. Det er derfor interessant å se på produksjonen av NucA i de forskjellige artene.

For å se på produksjonen av NucA ble SN og lysat fra de induserte kulturene av de forskjellige artene analysert ved å benytte det best fungerende sekresjonsplasmidet for hver art (figur 4.10), som ble funnet i innledende analyser (bl.a. figur 4.9 A og B). Western blott analysen (figur 4.10) viser høy produksjon av NucA i *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis* og *L. gasseri*, hvor totalproduksjonen er høyest i *L. plantarum* med SH71 replikon (figur 4.10, brønn 6 og 7) og i *L. curvatus* (figur 4.10, brønn 8 og 9). Lysatprøven fra de induserte cellene av *L. curvatus* skiller seg ut ved at den viser en del bånd som er noen kDa større enn NucA-båndene (figur 4.10, brønn 9). Dette er en interessant observasjon

fordi de intracellulære båndene kan være uprosessert NucA som enda ikke har blitt translokert eller kuttet av signal peptidaser, f. eks pga for tidlig folding av proteinet. Om dette er tilfelle vil totalproduksjonen av NucA i *L. curvatus* øke betydelig, og *L. curvatus* vil være overlegen i uttrykket av NucA i forhold til de andre artene, mens denne arten da virker dårligst med hensyn til sekresjonseffektivitet. En forklaring på de svake intracellulære NucA-bånd på rundt 20kDa i lysatet fra enkelte av artene kan muligens være en liten fraksjon ferdigprosessert NucA som er kommet med i cellelysatet. Det høye uttrykket av NucA i *L. curvatus* i forhold til de andre artene kan muligens forklares med at PKN var betydelig høyere (14,1 mot 1,1-7,8). Det kan likevel ikke utelukkes at de signalene som kan se ut som lengre NucA-varianter forårsakes av uspesifikk binding av antistoffet.

L. rhamnosus er arten som skiller seg mest ut når det gjelder produksjonen av NucA i dette studiet. Betydelig mindre mengder NucA ble produsert totalt i *L. rhamnosus* i forhold til i de resterende artene (figur 4.10, brønn 18 og 19). Under vekst av *L. rhamnosus* ble det observert en noe "trådet" vekst i mediet. Man kan spekulere i om dette hadde årsak i store mengder ekstracellulære polysakkarider (EPS), som det er kjent at noen lactobacilli produserer. I teorien kan store mengder EPS forstyrre bildet vi ser av uttrykt NucA ved at det "fanger" ferdig prosessert og sekretert NucA og gjør den mindre tilgjengelig for deteksjon. På den annen side er *L. rhamnosus* arten i dette studiet med lavest PKN, på gjennomsnittlig 1,1 (mot 3,8 - 14,1 i de andre SH71_{rep}-baserte stammene). Med færre plasmid per celle er det forventet at produksjonen av NucA kan bli mindre, og dette er mest sannsynlig den viktigste årsaken til det lave uttrykket av NucA i *L. rhamnosus*. Likevel, figur 4.10 viser at *L. plantarum* (r256_{rep}) produserer betydelig mer NucA enn *L. rhamnosus* på tross av en PKN på kun 1,8 i gjennomsnitt, noe som tyder på at flere faktorer enn PKN spiller inn. Én faktor som kan forårsake ulike mengder detektert protein kan være forekomsten av degradering av genproduktet. Produksjon og sekresjon av heterologe proteiner har ofte blitt sett i sammenheng med uheldig proteinfolding (Lulko et al. 2007; Sarvas et al. 2004). Man kan spekulere i om uheldig proteinfolding forekommer i større grad hos *L. rhamnosus* enn hos de andre testede artene. I slike tilfeller vil det være en høyere forekomst av degradering av genprodukt, og dermed mindre produkt tilgjengelig for deteksjon. En annen faktor som kan forårsake ulikt uttrykk kan være ulik tilgjengelighet på mRNA. Ved benyttelse av identiske vektorer i artene er det vanlig å anta at mengdene produsert mRNA er like fordi den samme promoteren benyttes. Derimot er det vist i et nylig studie at mengden mRNA kan variere betraktelig i to forskjellige *Lactobacillus* arter (*L. reuteri* og *L. acidophilus*) etter induksjonen av produksjonssystemet, på tross av at mRNA'et som ble analysert var kodet fra det samme genet (*lacLM* genet) på identiske vektorer (Nguyen et al. 2011). Det er derfor fristende å tro at ulike mengder mRNA likevel kan være en medvirkende årsak til ulikt uttrykk av NucA i dette studiet. Variasjonen i mengde transkript hvor samme promoter benyttes kan ha årsak i translasjonelle effekter, som mest sannsynlig vil påvirke både mRNA syntese og mRNA stabilitet (Nguyen et al. 2011). Translasyonelle effekter kan

forårsakes av små sekvensforskjeller (én eller noen få kodoner) eller ved mindre variasjoner i sekundærstruktur av "translation initiation region" (TIR). Disse variasjonene kan gi ulik tilgjengelighet til ribosom-bindende seter på mRNA'ene i de forskjellige artene, som vil resultere i ulike mengder ribosomer på de voksende mRNA-sekvensene (Deana & Belasco 2005; Kaberdin & Blasi 2006). Mer "nakent" mRNA i enkelte arter vil i de gjeldende artene resultere i en økning av "back-tracking" av RNA polymerase-komplekset, og transkripsjonen forsinkes som et resultat av dette (Proshkin et al. 2010). "Nakent" mRNA er også mer utsatt for degradering utført av ribonukleaser, som vil hindre forekomsten av transkripsjon av målgenet. Mengden transkript av de to komponentene HK og RR påvirker også transkripsjonen av reporterogenet (Kleerebezem et al. 1997; Pavan et al. 2000; Sorvig et al. 2003) og kan muligens også variere fra art til art. En fremtidig kvantitativ transkripsjonsanalyse for både reporterogenet og *sppK-sppR* operonet hos de forskjellige artene kunne muligens ha gitt mer innsikt i dette.

Figur 4.7 viser at *L. rhamnosus* og *L. gasseri* hadde tilfeller hvor det ikke ble detektert ekstracellulær NucA hverken to, tre eller fire timer etter induksjon (figur 4.7D og F). I tillegg hadde *L. plantarum* et tilfelle hvor det ble detektert minimal mengde ekstracellulært NucA (figur 4.5, brønn 7). Totalproduksjonen av NucA for *L. rhamnosus*, *L. gasseri* og *L. plantarum* ble derfor sjekket med western blott analyse av SN og lysat fra kulturer med de tre plasmidkonstruktene, pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 (figur 4.8). Altså ble alle de tre nykonstruerte plasmidene benyttet til produksjonsanalysene i disse artene. Figur 4.8A viser at produksjonen av NucA i *L. rhamnosus* er omtrent lik ved bruk av de ulike plasmidkonstruktene. Derimot ser produksjonen ut til å variere stort ettersom hvilket konstrukt som benyttes hos *L. gasseri* (figur 4.8B) og *L. plantarum* (figur 4.6). Bruk av pLp3050NucA-sh71 i *L. gasseri* viser høy produksjon, mens bruk av pLp0373NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 viser ingen synlig produksjon av NucA (figur 4.8B). Siden de tre sekresjonsplasmidene som benyttes er identiske med unntak av SP-sekvensen, tyder det på at årsaken til den store forskjellen i produksjonen ligger i variasjonen i SP'et. I Mathiesen et al (2009) ble det foreslått at SP'ene er tilknyttet regulering av produksjonen (og sekresjon) av proteiner, som kan være en mulig forklaring på dette. Det er likevel bemerkelsesverdig at *ingen* NucA ble funnet i hverken SN eller lysat av *L. gasseri* ved bruk av to av sekresjonsplasmidene. All dyrking av *L. gasseri* foregikk på erytromycinholdige skåler, og forutsatt at det ikke har skjedd en mutasjon i genomet burde dette tilsi at sekresjonsplasmidene er til stede i *L. gasseri*, også der NucA ikke ble detektert. Det er imidlertid mulighet for at mengden NucA produsert er for liten til at den synes på gelen siden det ikke ble utført noen oppkonsentrering av produktet i dette studiet, noe som ofte trengs ved detektering av proteiner produsert i bakterier. Det faktum at man får forskjellige produksjonsnivå ved å benytte ulike SP'er, slik som observert hos *L. gasseri* (figur 4.8B) og *L. plantarum* (figur 4.6), kan forårsakes av ulik transkripsjon, translasjon og/eller post- translasjonelle prosesser, som alle kan

bli påvirket av en rekke faktorer. Ingen forskjeller i mengder transkript ble derimot observert i et tidligere studie ved bruk av ulike SP'er i *L. plantarum* (Mathiesen et al. 2009). Denne tidligere observasjonen kan tyde på at SP'er muligens kan påvirke translasjonseffektiviteten og/eller post-translasjonelle prosesser på en eller annen måte. Bruk av mer sjeldne kodoner i SP-sekvensen er f. eks vist å kunne gi tregere translasjon i *E. coli* (Sorensen et al. 1989) og kan være en mulig forklaring på den store forskjellen i produksjon ved bruk av ulike SP'er. Det er også helt nylig vist at ikke-optimal kodonbruk i SP-sekvensen kan hindre korrekt folding av pre-protein (Zalucki et al. 2011). Ukorrekt folding kan gi komplikasjoner som intracellulær degradering eller at produktet blir sittende fast i celleveggen. I slike tilfeller vil lite produkt være tilgjengelig for deteksjon, som observert ved bruk av enkelte SP'er hos *L. gasseri* og *L. plantarum*. Likevel, man kan ikke utelukke at forskjellige produksjonsnivå også her kan ha årsak i ulike mRNA-nivå forårsaket av translasjonelle effekter, som diskutert over. Studiet til Mathiesen et al viser imidlertid er at dette mest sannsynlig ikke gjelder for *L. plantarum* WCFS1 (Mathiesen et al. 2009). For å være helt sikre på de noe merkelige resultater for *L. gasseri* er det nødvendig å gjenta eksperimentet og å utføre flere kontrollforsøk. De tre plasmidkonstruktene, pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71, bør transformeres på nytt til *L. gasseri* for å få bekreftet at ingen mutasjon er skjedd i plasmidene eller genomet i dette tilfellet, og DNA sekvensering av plasmidene bør foretas.

Jevnt over viser western blott analysene (se eksempel figur 4.10) at samtlige arter fungerer til produksjon av NucA ved bruk av pSIP- systemet. Ut ifra mengden NucA produsert er kanskje de mest interessante artene for videre arbeid med terapeutiske proteiner *L. curvatus* og *L. plantarum* med SH71 replikon, som ved å benytte pLp3050NucA-sh71 ga de største mengdene produsert NucA fire timer etter induksjon (figur 4.10). *L. brevis* og *L. gasseri* produserer imidlertid også forholdsvis store mengder NucA ved å benytte pLp3050NucA-sh71 (figur 4.10), og bør derfor heller ikke utelukkes i uttesting av terapeutiske proteiner. Derimot kan det se ut som at det trengs en del optimalisering for å kunne benytte *L. rhamnosus* som cellefabrikk på grunn av det lave produksjonsnivået (figur 4.8A). En mulig strategi for å oppnå høyere produksjon i *L. rhamnosus* kunne vært å teste ut et annet replikon. En annen strategi kunne vært å forsøke å etterlikne dens homologe system, som f. eks bruk av homologe SP'er, siden SP'er er foreslått å være tilknyttet reguleringen av produksjonen av ekstracellulære proteiner (Mathiesen et al. 2009). Det skal heller ikke utelukkes at stammer med gunstige immunomodulerende egenskaper og en gunstig økologisk nisje som denne likevel kan være av interesse ved *in situ* levering på tross av en lav produksjon av målgenet.

5.2.1 Effekt av bytte av replikon for produksjon av NucA i *L. plantarum*

Som tidligere beskrevet ble det verts-spesifikke replikonet r256, fra p256 i *L. plantarum* NC7 (Sørvig et al. 2005b), byttet med det mer bredspektret replikonet SH71, fra pSH71 i *L. lactis* (De Vos 1987) i pSIP-vektorene benyttet (se kapittel 4.2). Produksjonen av NucA i r256-baserte *L. curvatus*-, *L. brevis*-, *L. gasseri*- og *L. rhamnosus*-celler kunne imidlertid ikke sammenliknes med produksjonen i de SH71-baserte cellene, fordi vektorer med r256 replikonet ikke replikerer i disse artene. I *L. plantarum* førte derimot replikonbyttet til økt mengde produsert NucA (figur 4.10, brønn 4-7). Sannsynligheten for at den økte produksjonen skyldes SH71-replikonet er stor, fordi sekresjonsplasmidene som sammenliknes er identiske med unntak av replikonet. En økning i produksjon etter replikonbytte fra r256 til SH71 er også observert tidligere for reporterproteinene β -glucuronidase (GusA) og aminopeptidase (PepN) i både *L. plantarum* og *L. sakei* (Sørvig et al. 2005a).

For å få innsikt i årsak til økt produksjon ved bruk av SH71 replikonet i *L. plantarum* ble det utført en plasmidkopinummer (PKN)-analyse ved bruk av det best fungerende sekresjonsplasmidet (figur 4.14, mørkegrå søyle 1 og 2). Figur 4.14 viser at induerte *L. plantarum*-celler har en økning i PKN fra 1,8 til 7,8 etter replikonbyttet. Sett at det ikke påvirker farten på transkripsjon eller overbelaster translokasjonsapparatet på noen måte, vil flere kopier plasmid per celle kunne resultere i et sterkere uttrykk av et gitt protein. Et høyere PKN ved å benytte SH71-replikonet er derfor mest sannsynlig årsaken til den økte produksjon av NucA i *L. plantarum* etter replikonbyttet. Interessant nok har de to replikonene ulik replikasjonsmekanisme, der r256 replikonet replikerer via theta mekanismen (Sørvig et al. 2005b), mens SH71 replikonet har en rullerende (sirkeltype) mekanisme (Sørvig et al 2005a og ref i denne). Det er tidligere foreslått at PKN avhenger av replikerings-mekanismen til et gitt plasmid (Friehts 2004), og dette kan muligens gi en forklaring på økt PKN etter replikonbyttet.

Uinduserte celler ble også analysert for PKN (figur 4.14- lysegrå søyler). Et bemerkelsesverdig funn hos *L. plantarum* er at PKN er betydelig mindre i de uinduserte enn i de induerte SH71- baserte cellene (figur 4.14- søyle 3 og 4), mens PKN var omtrent lik med og uten induering hos de r256-baserte cellene. Dette indikerer at SH71 replikonet muligens påvirker PKN, men at PKN øker først etter induksjonen av NucA-produksjonen i de induerte SH71-baserte cellene. Et høyere PKN i SH71-baserte celler i forhold til r256-baserte celler er også observert tidligere i både *L. plantarum* og *L. sakei* (Sørvig et al. 2005a). PKN funnet hos *L. plantarum* i Sørvig et al (2005a) var imidlertid en del høyere enn hva funnet i dette studiet, med PKN på 6 (mot ~2) med r256 replikonet og PKN på 24 (mot ~8) med SH71 replikonet. Dette har mest sannsynlig årsak i at ulike metoder og ulike stammer er benyttet. I et nylig studie av Nguyen et al (2011) ble derimot lik metode og samme WCFS1- stamme benyttet, hvor PKN i *L. plantarum* ble vist å være mellom 3 og 4 i r256-baserte celler. Disse tallene fra Nguyen et al (2011) samsvarer imidlertid mer med funnene i dette studie.

Effekten av replikonbyttet viser at SH71 replikonet er mer effektivt å benytte i *L. plantarum* enn hva r256 replikonet er. Dette er lovende resultater fordi SH71-baserte *L. plantarum*-celler muligens også kan bedre produksjonen av et terapeutisk protein og derved styrke *L. plantarum* som kandidat til cellefabrikk og leverandør av vaksiner.

5.3 Sekresjon av NucA i *Lactobacillus spp.* ved bruk av SP'er fra *L. plantarum* WCFS1

For å oppnå vellykket *in situ* levering av terapeutiske proteiner er det viktig med tilstrekkelig sekresjon av det aktuelle proteinet i *Lactobacillus* artene. Det er derfor interessant å se på evnen til sekresjon og sekresjonseffektiviteten til de NucA-produserende artene i dette studiet.

Forsøk på å øke sekresjonseffektiviteten har tidligere vært en av de store utfordringene rundt heterolog sekresjon i *L. plantarum* ved benyttelse av pSIP-systemet. Et skritt i riktig retning var konstruksjon av et SP-bibliotek med SP'er fra *L. plantarum* der det ble funnet SP'er med bedre evne til å drive heterolog sekresjon i *L. plantarum* enn de SP'er som til da var mest benyttet for sekresjon i LAB, slik som SP_{M6} og SP_{Usp45} (Mathiesen et al. 2008; Mathiesen et al. 2009). I dette studiet undersøkes det om noen av disse SP'ene kan drive sekresjon i andre lactobacilli. Det ble benyttet tre ulike SP'er fra *L. plantarum* WCFS1 (tabell 4.1) og sekresjon ble testet i *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. gasseri* og *L. rhamnosus*.

5.3.1 Evne til sekresjon i *Lactobacillus spp.*

Med evne til sekresjon menes bakterieartens evne til å sekretere NucA. Dette ble analysert ved å se på mengden NucA detektert på sølvfarget LDS-geler med SN fra de forskjellige kulturene (figur 4.5, figur 4.7 og figur 4.9). SP_0373, SP_3050 og SP_2578 (i pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71) ble testet for evne til å drive sekresjon i *Lactobacillus* artene. Målproteinene NucA ble vellykket sekretert i alle tilfellene det var påvist produksjon (figur 4.5, figur 4.7 og figur 4.9), med et lite unntak hos *L. rhamnosus* (figur 4.7, brønn 7-9 og figur 4.8A). Det ble generelt observert mer NucA i SN fra bakteriekulturene ved å benytte SP_3050 (figur 4.9B) enn ved å benytte SP_0373 (figur 4.9A). Som diskutert over ser dette ut til å ha årsak i ulik produksjon (og/eller post-translasjonelle prosesser som degradering av produktet), som allerede vist for *L. plantarum* (figur 4.6) og *L. gasseri* (figur 4.8B) (sekresjonseffektiviteten ser ut til å stort sett være veldig bra). Det kan likevel ikke utelukkes at mindre mengder ekstracellulært NucA har årsak i interaksjoner mellom SP-sekvensen og cellevertens translokasjonsmaskineri (Stephenson et al. 2000), og/eller effektiviteten av signal peptidasen for dette SP'et (Bolhuis et al. 1999). Det kan også forekomme interaksjoner mellom preproteinets sekundærstruktur og bakteriens cellevegg (Zanen et al. 2006) (bl.a forårsaket SP'ets

ladning) som kan påvirke bakteriens evne til sekresjon negativt. I alle disse tilfellene vil det være en høyere forekomst av degradering av målproduktet fordi det ikke blir korrekt sekretert, som resulterer i at en del NucA blir ”usynlig”.

Effekten av SP_2578 (pLp2578NucA-sh71) på NucA sekresjon i de testede artene er mer varierende i forhold til de to andre SP’ene. Som et eksempel på dette ble store mengder NucA funnet i SN hos *L. curvatus* og *L. brevis* ved å benytte SP_2578 (figur 4.7C), mens ingen NucA ble detektert i SN hos *L. rhamnosus* (figur 4.7F). Disse ulike sekresjonsnivå skyldes mest sannsynlig små forskjeller i sekresjonsapparatet til celleverten, og muligens en mindre gunstig ladning hos SP_2578. Når ett og samme SP kan gi så ulike sekresjonsnivå tyder det på at SP’er sannsynligvis bør optimaliseres for hver cellevert som benyttes. Le Loir et al (1998) har vist at bruken av en syntetisk prosekvens (sekvens mellom SP og reporterprotein) med negativ ladning kan øke sekresjonen av heterologe proteiner i *L. lactis*, og det er mulig at tilføring av en prosekvens kan bedre sekresjonen i tilfeller der SP’ene ikke fungerer som ønsket.

På tross av liten mengde sekretert NucA hos *L. rhamnosus* (figur 4.8A), viser sekresjonsanalysene at samtlige uttestede *Lactobacillus* arter evner å sekretere NucA (figur 4.9). Dette er oppløftende resultater med tanke på å benytte *Lactobacillus* til sekresjon av terapeutiske proteiner fordi det viser at SP’er fra *L. plantarum* fungerer til å drive sekresjon i lactobacilli og at *Lactobacillus* artene kan benyttes til heterolog sekresjon med pSIP-systemet. Det kan imidlertid se ut som at SP_3050 og SP_0373 er bedre å benytte til sekresjon av terapeutiske proteiner enn SP_2578. Videre kan *L. brevis* og *L. curvatus* se ut til å være mindre følsomme for hvilket SP som benyttes til å drive sekresjonen (4.7A,B og C), som muligens kan tyde på at disse artene har et noe enklere sekresjonssystem. Det er ikke å utelukke at *L. curvatus* og *L. brevis* derved vil få mindre komplikasjoner rundt bruk av fremmede genskvenser som terapeutiske proteiner.

5.3.1.1 Effekt av bytte av replikon for evne til sekresjon i *L. plantarum*

Replikonbyttet førte til økt mengde sekretert NucA i *L. plantarum*, hvor mengden sekretert NucA nesten ble fordoblet ved bruk av SH71 replikonet (figur 4.5, brønn 3-6). Figur 4.5 viser en økning av NucA i SN ved bruk av alle tre sekresjonsplasmid, men økningen er liten ved bruk av pLp2578NucA-sh71 (4.5, brønn7 og 8). Dette har mest sannsynlig årsak i at dette siste konstruert gir så små mengder NucA at økningen ikke er fullt ut detekterbar (figur 4.6, brønn 8 og 9). Sekresjonsanalysen (figur 4.5) viser at sekresjonsapparatet i *L. plantarum* kan takle økt produksjon, og at det mest sannsynlig ikke skjer akkumulasjon av NucA intracellulært.

5.3.2 Sekresjonseffektivitet i *Lactobacillus* spp.

Med sekresjonseffektivitet menes det hvor effektivt det produserte målprotein sekreteres ut i mediet. Dette ble analysert ved å sammenlikne ekstracellulær og intracellulær mengde genprodukt fra kulturer som ble høstet fire timer etter induksjon. Det ble benyttet western blott analyse med immunodeteksjon.

Sekresjonseffektiviteten i *L. plantarum* var høy for alle tre SH71_{rep}-baserte vektorer, pLp0373NucA-sh71, pLp3050NucA-sh71 og pLp2578NucA-sh71 (figur 4.6). Ingen NucA ble funnet intracellulært ved bruk av SP_0373, som (mest sannsynlig) tilsier 100 % sekresjonseffektivitet, og kun en liten fraksjon NucA ble funnet intracellulært ved bruk av SP_3050 og SP_2578 (figur 4.6). Siden SP'ene benyttet er homologe i dette tilfellet er det usannsynlig at de svake intracellulære båndene funnet er forårsaket av problemer i interaksjonene mellom SP'et og cellevert. Båndene kan imidlertid tyde på at produksjonen av NucA i de SH71_{rep}-baserte vektorene har økt så mye at sekresjonsmaskineriet er noe overbelastet. En annen teori er at de svake intracellulære båndene er ferdig prosessert NucA-fraksjoner som har kommet med i lysatet.

Det er tenkelig at ethvert SP er evolusjonært tilpasset dens tilhørende celleverts sekresjonssystem for å forsikre effektiv og kontrollert sekresjon. Dette kan forklare den forholdsvis høye sekresjonseffektiviteten vi ser i *L. plantarum* ved bruk av de homologe SP'ene (figur 4.6). I de andre *Lactobacillus* artene ble det imidlertid observert høy sekresjonseffektivitet ved bruk av SP'ene fra *L. plantarum* (se eksempel figur 4.10), muligens med et unntak hos *L. curvatus* (figur 4.10, brønn 8 og 9). Med forbehold om at de noe lengre intracellulære båndene observert hos *L. curvatus* (figur 4.10) er uspesifikk binding av antistoff, kan det se ut som at denne arten har for stor produksjon for at sekresjonsapparatet klarer å sekretere alt genproduktet som er produsert. Sekresjonseffektiviteten ser derved ut til å være dårligst i *L. curvatus*. Som diskutert over viste likevel *L. curvatus* best evne til sekresjon av de testede artene (figur 4.9B), og fungerer derfor utmerket til sekresjon av NucA. *L. rhamnosus* hadde også ett tilfelle med dårlig sekresjonseffektivitet ved benyttelse av SP_2578 (figur 4.8A, brønn 8 og 9). Dette kan ha årsak i en lavere effektivitet av signal peptidase for dette SP'et (Fu et al. 2008; Ravn et al. 2003; Zanen et al. 2005). Lite definerte kuttsteder for signal peptidaser kan forårsake at proteiner blir skutt inn som membranproteiner og tetter sekresjonsmaskineriet (Desvaux et al. 2006; Tjalsma et al. 2000; Tjalsma et al. 2004). Her er SP'et heller ikke homologt, som i tillegg kan gi ugunstige interaksjoner med celleverten i den translokale prosessen og forårsake den intracellulære opphopningen av produktet. Andre faktorer som kan påvirke sekresjonseffektiviteten negativt er forekomsten av intracellulær folding (Harwood & Cranenburgh 2008).

Jevnt over viser sekresjonsanalysene likevel at SP'er fra *L. plantarum* WCFS1 har god tilpasning til komponenter i sekresjonsmaskineriet i andre lactobacilli og kan dirigere effektiv sekresjon i disse. Dette er lovende resultater med tanke på fremtidig uttesting av sekresjon av terapeutiske proteiner i lactobacilli.

5.4 Vekst av *Lactobacillus spp.* med ulike sekresjonsplasmid

Tilstrekkelig produksjon/sekresjon av et heterologt protein til bruk ved *in situ* levering kan være avhengig av hvor godt bakterien vokser. Det er imidlertid vist i flere studier at produksjon og sekresjon av heterologe proteiner i Gram-positive bakterier kan føre til vekst-forstyrrelser av vertsbakterien (Bolhuis et al. 1999; Fredriksen et al. 2010; Lulko et al. 2007; Mathiesen et al. 2008). For å se nærmere på om veksten av cellene påvirkes av produksjonen og/eller sekresjonen av NucA i dette studiet, samt å få en indikasjon på mengden NucA produsert per celle, ble veksthastigheten målt for hver time etter induksjon i både induserte og uinduserte celler.

Når man ser på veksthastigheten for de induserte stammene varierer dette stort, og *L. rhamnosus* og *L. brevis* er de to artene som vokser betydelig saktere enn de andre (figur 4.4A). Veksthastigheten for uinduserte celler fra de to saktevoksende artene er imidlertid tilsvarende de induserte cellene (figur 4.4A og B), som indikerer at høy protein produksjon- og/eller sekresjonstress mest sannsynlig ikke er årsaken til den sakte veksten i disse to artene. Basert på denne observasjonen er det rimelig å anta at den ulike veksten av artene i vekstanalysen (figur 4.4A) har årsak i ulike betingelser for optimal veksthastighet. Det er mulig det hadde vært nyttig med optimalisering av vekstbetingelsene for *L. rhamnosus* og *L. brevis* ved f. eks å teste ut ulike medier. Det kan likevel ikke utelukkes at *L. rhamnosus* og/eller *L. brevis*, uavhengig av vekstbetingelsene, naturlig har lavere veksthastighet enn de andre artene. Hvis man ser på vekstanalysen (figur 4.4A) i sammenheng med produksjon av NucA ser man at *L. brevis* produserer nesten like store mengder NucA som *Lactobacillus* artene med dobbel så høy celletetthet (figur 4.10). Vekstanalysen viser derfor at *L. brevis* mest sannsynlig er arten som produserer mest NucA per celle og er derfor en god kandidat for videre testing av terapeutiske proteiner.

Vekstanalysen (figur 4.4) viser heller ingen forandring i veksten av de andre *Lactobacillus* artene etter indusering av NucA-produksjon, med et lite unntak hos *L. gasseri*, som derimot viste betydelig nedgang i vekst etter indusering (figur 4.4 A, lilla stjerne). På tross av nedgang i veksthastigheten hos induserte *L. gasseri*-celler med pLp3050NucA-sh71, har imidlertid denne arten en like høy veksthastighet som artene med den beste veksten, *L. curvatus* og *L. plantarum* (figur 4.4A). Likevel, variasjonen i vekst av uinduserte og induserte *L. gasseri*-celler kan tyde på produksjons- og/eller sekresjonsstress hos cellene, som igjen kan føre til en høyere forekomst av feil folding og degradering av målproduktet (Bolhuis et al. 1999; Lulko et al. 2007). For tidlig foldet NucA kan muligens være en forklaring på det intracellulære båndet som observeres i figur 4.10 hos *L. gasseri*. Uansett ble forholdsvis stor mengde ekstracellulær NucA funnet hos *L. gasseri*, som viser at stammen fungerer godt til sekresjon av NucA. Vekstanalysen (figur 4.4) viser videre at veksten av de resterende stammene ikke ser ut til å påvirkes av produksjon og sekresjon av NucA, som indikerer at samtlige testede arter fungerer godt med et induserbart produksjonssystem av heterologe proteiner.

5.5 Konklusjon

Denne avhandlingen beskriver vellykket modifisering av pSIP- vektorer slik at de kan benyttes til heterologt genuttrykk i flere *Lactobacillus* arter. Det ble oppnådd høy produksjon og sekresjon av reporterproteinet NucA i samtlige testede arter, med unntak av *L. rhamnosus*. Lav PKN ble påvist hos *L. rhamnosus* i forhold til de andre artene, men ulik produksjon skyldes mest sannsynlig flere faktorer som mengde og/eller stabilitet på transkript, translasjonseffektivitet eller forekomst av uheldig folding/degradering av produkt. En kvantitativ transkripsjonsanalyse kunne muligens ha gitt mer innsikt i dette.

På tross av liten mengde NucA produsert i *L. rhamnosus* viser resultatene at samtlige arter kan benyttes til produksjon og sekresjon av heterologe protein ved bruk av pSIP- systemet og SP'er fra *L. plantarum*. For fire av fem arter ble det funnet høy produksjon, og for alle fem ble det funnet effektiv sekresjon av reporterproteinet som ble testet ut. Dette viser potensialet til disse bakteriene som cellefabrikker. Dette er lovende resultater da artene benyttet i denne oppgaven på ulike måter kan modulere immunsystemet i mennesker og/eller dyr, og det betyr igjen at det i prinsippet er mulig at terapeutiske proteiner kan leveres med forskjellig ”immunomodulerende bakgrunn”. Videre har disse lactobacilli muligens noe forskjellige nisjer (levesteder) i den humane fordøyelseskanalen, som også kan være interessant. Ut ifra mengde NucA sekretert er kanskje de mest interessante artene for videre arbeid med terapeutiske proteiner *L. curvatus* og *L. plantarum* med SH71 replikon, som har høyest produksjon av NucA og høyest mengde ekstracellulært NucA fire timer etter induksjon. I tillegg er *L. brevis* en interessant kandidat for testing av terapeutiske proteiner fordi denne arten produserer mest NucA per celle. *L. gasseri* produserer/sekreterer store mengder NucA ved bruk av pLp3050NucA-sh71 og bør heller ikke utelukkes fra videre arbeid. Optimalisering av SP og replikon bør sannsynligvis utføres for hvert nye protein som uttrykkes i hver cellevert som benyttes. Det bør også påpekes at fokuset på produksjonsmengder ikke nødvendigvis er det eneste viktige i utvikling av LAB-baserte vaksiner. Det kan ikke utelukkes at stammer med gunstige immunomodulerende egenskaper og en gunstig økologisk nisje, men med forholdsvis lav produksjon/sekresjon kan være av interesse, slik som *L. rhamnosus*/GG.

En naturlig videreføring av dette prosjektet vil være å bytte reporterproteinet i de modifiserte sekresjonsvektorene med et terapeutisk protein, og sjekke produksjon, samt sekresjons- og eventuelt ankringseffektivitet av proteinet i de høytproduserende lactobacilli- artene fra dette studiet. Videre kan man sjekke immunresponser i humane cellelinjer eller ved dyreforsøk, som vil gi videre innsikt i de aktuelle stammenes potensial som vektorer for *in situ* produksjon og levering av terapeutiske proteiner.

Referanser

- Alexandrescu, A. T., Hinck, A. P. & Markley, J. L. (1990). Coupling between local structure and global stability of a protein: mutants of staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 29 (19): 4516-25.
- Armuzzi, A., Cremonini, F., Ojetti, V., Bartolozzi, F., Canducci, F., Candelli, M., Santarelli, L., Cammarota, G., De Lorenzo, A., Pola, P., et al. (2001). Effect of Lactobacillus GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during Helicobacter pylori eradication therapy: a pilot study. *Digestion*, 63 (1): 1-7.
- Aukrust, T. W., Brurberg, M. B. & Nes, I. F. (1995). Transformation of Lactobacillus by electroporation. *Methods Mol Biol*, 47: 201-8.
- Axelsson, L., Katla, T., Bjornslett, M., Eijsink, V. G. & Holck, A. (1998). A system for heterologous expression of bacteriocins in Lactobacillus sake. *FEMS Microbiol Lett*, 168 (1): 137-43.
- Axelsson, L., Lindstad, G. & Naterstad, K. (2003). Development of an inducible gene expression system for Lactobacillus sakei. *Lett Appl Microbiol*, 37 (2): 115-20.
- Bermudez-Humaran, L. G., Cortes-Perez, N. G., Lefevre, F., Guimaraes, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J. M., Gratadoux, J. J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R. S., Corthier, G., et al. (2005). A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol*, 175 (11): 7297-302.
- Bessonneau, P., Besson, V., Collinson, I. & Duong, F. (2002). The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J*, 21 (5): 995-1003.
- Beveridge, T. J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol*, 72: 229-317.
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., de Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in Bacillus subtilis. *Appl Environ Microbiol*, 65 (7): 2934-41.
- Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryneck, S., Peppelenbosch, M. P. & Steidler, L. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4 (6): 754-9.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T. & Eggert, T. (2006). Systematic screening of all signal peptides from Bacillus subtilis: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol*, 362 (3): 393-402.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1997). Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in Lactobacillus. *Mol Microbiol*, 26 (2): 347-60.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4): 611-22.
- Carlos, J. L., Paetzel, M., Brubaker, G., Karla, A., Ashwell, C. M., Lively, M. O., Cao, G., Bullinger, P. & Dalbey, R. E. (2000). The role of the membrane-spanning domain of type I signal peptidases in substrate cleavage site selection. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (49): 38813-22.

- Chambert, R. & Petit-Glatron, M. F. (1999). Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 179 (1): 43-7.
- Chang, S. (1987). Engineering for protein secretion in gram-positive bacteria. *Methods Enzymol*, 153: 507-16.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. & Kim, S. H. (2006). Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 42 (5): 452-8.
- Chung, H. J. & Yousef, A. E. (2005). *Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin-like agent active against gram-negative pathogenic bacteria. *Journal of food safety.*, 25 (2): 59-79.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L. & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci*, 70 (1): 1-12.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C. & Gahan, C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (18): 7617-21.
- Cortes-Perez, N. G., Lefevre, F., Corthier, G., Adel-Patient, K., Langella, P. & Bermudez-Humaran, L. G. (2007). Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 25 (36): 6581-8.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, 62 (10): 3662-7.
- De Vos, W. M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 46 (3): 281-295.
- de Vos, W. M. (1999). Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2 (3): 289-95.
- Deana, A. & Belasco, J. G. (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*, 19 (21): 2526-33.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 159-84.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I. & Hebraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett*, 256 (1): 1-15.
- Detmer, A. & Glenting, J. (2006). Live bacterial vaccines--a review and identification of potential hazards. *Microb Cell Fact*, 5: 23.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S. & Nes, I. F. (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol*, 178 (15): 4472-83.
- Diep, D. B., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. & Nes, I. F. (2009). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (1): 62-73.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. & Piard, J. C. (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 183 (14): 4157-66.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem*, 77: 643-67.

- Eijsink, V. G., Brurberg, M. B., Middelhoven, P. H. & Nes, I. F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J Bacteriol*, 178 (8): 2232-7.
- Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Holo, H. & Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81 (1-4): 639-54.
- Exterkate, F. A. (1984). Location of Peptidases Outside and Inside the Membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl Environ Microbiol*, 47 (1): 177-83.
- Fredriksen, L., Mathiesen, G., Sioud, M. & Eijsink, V. G. (2010). Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl Environ Microbiol*, 76 (21): 7359-62.
- Friehs, K. (2004). Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 86: 47-82.
- Fu, L. L., Xu, Z. R., Shuai, J. B., Hu, C. X., Dai, W. & Li, W. F. (2008). High-level secretion of a chimeric thermostable lichenase from *Bacillus subtilis* by screening of site-mutated signal peptides with structural alterations. *Curr Microbiol*, 56 (3): 287-92.
- Gerber, S. D. & Solioz, M. (2007). Efficient transformation of *Lactococcus lactis* IL1403 and generation of knock-out mutants by homologous recombination. *J Basic Microbiol*, 47 (3): 281-6.
- Grangette, C., Muller-Alouf, H., Geoffroy, M., Goudercourt, D., Turneer, M. & Mercenier, A. (2002). Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine*, 20 (27-28): 3304-9.
- Grangette, C., Muller-Alouf, H., Hols, P., Goudercourt, D., Delcour, J., Turneer, M. & Mercenier, A. (2004). Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect Immun*, 72 (5): 2731-7.
- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., et al. (2000). *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 30 (1): 54-60.
- Halbmayer, E., Mathiesen, G., Nguyen, T. H., Maischberger, T., Peterbauer, C. K., Eijsink, V. G. & Haltrich, D. (2008). High-level expression of recombinant beta-galactosidases in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* using a Sakacin P-based expression system. *J Agric Food Chem*, 56 (12): 4710-9.
- Harwood, C. R. & Cranenburgh, R. (2008). *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol*, 16 (2): 73-9.
- Heins, J. N., Suriano, J. R., Taniuchi, H. & Anfinsen, C. B. (1967). Characterization of a nuclease produced by *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 242 (5): 1016-20.
- Holo, H. & Nes, I. F. (1989). High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl Environ Microbiol*, 55 (12): 3119-23.
- Hols, P., Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Chabot, P., Delplace, B., Delcour, J. & Mercenier, A. (1997). Efficient secretion of the model antigen M6-gp41E in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Microbiology*, 143 (Pt 8): 2733-41.
- Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A. N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J. & de Vos, W. M. (1999). Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 17 (6): 588-92.

- Jensen, C. L., Stephenson, K., Jorgensen, S. T. & Harwood, C. (2000). Cell-associated degradation affects the yield of secreted engineered and heterologous proteins in the *Bacillus subtilis* expression system. *Microbiology*, 146 (Pt 10): 2583-94.
- Kaberdin, V. R. & Blasi, U. (2006). Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev*, 30 (6): 967-79.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M. & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 63 (11): 4581-4.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W., et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (4): 1990-5.
- Kleerebezem, M. & Vaughan, E. E. (2009). Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu Rev Microbiol*, 63: 269-90.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J. & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev*, 34 (2): 199-230.
- Kruger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delwar, D., van Dalen, P. J., Pouwels, P. H., Leer, R. J., Kelly, C. G., et al. (2002). In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol*, 20 (7): 702-6.
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G., Kleerebezem, M. & de Vos, W. M. (1997). Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol*, 15 (4): 135-40.
- Lambert, P. A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* (31): 46S-54S.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Langella, P. (1994). Direct screening of recombinants in gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. *Journal of Bacteriology*, 176 (16): 5135-9.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Langella, P. (1998). A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180 (7): 1895-903.
- Le Loir, Y., Nouaille, S., Commissaire, J., Bretigny, L., Gruss, A. & Langella, P. (2001). Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 67 (9): 4119-27.
- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S. C., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L. G., Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Leclercq, S., Gabriel, J. E., et al. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact*, 4 (1): 2.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (4): 728-64, Table of Contents.
- Lee, C. L., Ow, D. S. & Oh, S. K. (2006). Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods*, 65 (2): 258-67.
- Li, W., Zhou, X. & Lu, P. (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*, 155 (8): 605-10.

- Liu, Z., Shen, T., Zhang, P., Ma, Y. & Qin, H. (2011). Lactobacillus plantarum surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Biol Rep*, 38 (5): 3471-80.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4): 402-8.
- Ljungh, A. & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*, 7 (2): 73-89.
- Lulko, A. T., Veening, J. W., Buist, G., Smits, W. K., Blom, E. J., Beekman, A. C., Bron, S. & Kuipers, O. P. (2007). Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous alpha-amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in Bacillus subtilis. *Appl Environ Microbiol*, 73 (16): 5354-62.
- MacConaill, L. E., Fitzgerald, G. F. & Van Sinderen, D. (2003). Investigation of protein export in Bifidobacterium breve UCC2003. *Appl Environ Microbiol*, 69 (12): 6994-7001.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (42): 15611-6.
- Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R. & Ruiz-Barba, J. L. (2004). Induction of plantaricin production in Lactobacillus plantarum NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J Bacteriol*, 186 (5): 1556-64.
- Manley, K. J., Fraenkel, M. B., Mayall, B. C. & Power, D. A. (2007). Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust*, 186 (9): 454-7.
- Marco, M. L., Pavan, S. & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol*, 17 (2): 204-10.
- Mathiesen, G., Sorvig, E., Blatny, J., Naterstad, K., Axelsson, L. & Eijsink, V. G. (2004). High-level gene expression in Lactobacillus plantarum using a pheromone-regulated bacteriocin promoter. *Lett Appl Microbiol*, 39 (2): 137-43.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J. C., Axelsson, L. & Eijsink, V. G. (2008). Heterologous protein secretion by Lactobacillus plantarum using homologous signal peptides. *J Appl Microbiol*, 105 (1): 215-26.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M. B., Fredriksen, L., Axelsson, L. & Eijsink, V. G. (2009). Genome-wide analysis of signal peptide functionality in Lactobacillus plantarum WCFS1. *BMC Genomics*, 10: 425.
- Merchante, R., Pooley, H. M. & Karamata, D. (1995). A periplasm in Bacillus subtilis. *J Bacteriol*, 177 (21): 6176-83.
- Mielcarek, N., Alonso, S. & Loch, C. (2001). Nasal vaccination using live bacterial vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51 (1-3): 55-69.
- Miller, J. F. (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol*, 235: 375-85.
- Murashima, K., Chen, C. L., Kosugi, A., Tamaru, Y., Doi, R. H. & Wong, S. L. (2002). Heterologous production of Clostridium cellulovorans engB, using protease-deficient Bacillus subtilis, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J Bacteriol*, 184 (1): 76-81.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 (2-4): 113-28.
- Nes, I. F. & Eijsink, V. G. H. (1999). Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. *Cell-Cell Signaling in Bacteria*: 175-192.

- Nguyen, T. T., Nguyen, T. H., Maischberger, T., Schmelzer, P., Mathiesen, G., Eijsink, V. G., Haltrich, D. & Peterbauer, C. K. (2011). Quantitative transcript analysis of the inducible expression system pSIP: comparison of the overexpression of *Lactobacillus* spp. beta-galactosidases in *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact*, 10 (1): 46.
- Nouaille, S., Morello, E., Cortez-Peres, N., Le Loir, Y., Commissaire, J., Gratadoux, J. J., Poumerol, E., Gruss, A. & Langella, P. (2006). Complementation of the *Lactococcus lactis* secretion machinery with *Bacillus subtilis* SecDF improves secretion of staphylococcal nuclease. *Appl Environ Microbiol*, 72 (3): 2272-9.
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Prado-Acosta, M., Sanchez-Rivas, C. & Ruzal, S. M. (2010). New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt. *J Microbiol Methods*, 83 (2): 164-7.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*, 100 (6): 1171-85.
- Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M. C., Grangette, C., Kleerebezem, M. & Mercenier, A. (2000). Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol*, 66 (10): 4427-32.
- Pedrosa, M. C., Golner, B. B., Goldin, B. R., Barakat, S., Dallal, G. E. & Russell, R. M. (1995). Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr*, 61 (2): 353-9.
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E. M., Nuutila, J. & Salminen, S. (1998). Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy*, 28 (12): 1474-9.
- Perez-Martinez, G., Kok, J., Venema, G., van Dijl, J. M., Smith, H. & Bron, S. (1992). Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Mol Gen Genet*, 234 (3): 401-11.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. & Ruzal, S. M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol*, 98 (1): 84-95.
- Poquet, I., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1998). An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180 (7): 1904-12.
- Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem*, 174 (2): 361-73.
- Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J. & Conway, P. L. (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol*, 41 (2): 155-67.
- Proshkin, S., Rahmouni, A. R., Mironov, A. & Nudler, E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*, 328 (5977): 504-8.
- Pushnova, E. A., Geier, M. & Zhu, Y. S. (2000). An easy and accurate agarose gel assay for quantitation of bacterial plasmid copy numbers. *Anal Biochem*, 284 (1): 70-6.
- Ravn, P., Arnau, J., Madsen, S. M., Vrang, A. & Israelsen, H. (2003). Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 149 (Pt 8): 2193-201.
- Risøen, P. A., Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. & Nes, I. F. (2000). Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Molecular Microbiology*, 37 (3): 619-28.

- Rud, I., Jensen, P. R., Naterstad, K. & Axelsson, L. (2006). A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology*, 152 (Pt 4): 1011-9.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12): 5463-7.
- Sarvas, M., Harwood, C. R., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2004). Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1694 (1-3): 311-27.
- Saunders, C. W., Schmidt, B. J., Mallonee, R. L. & Guyer, M. S. (1987). Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169 (7): 2917-25.
- Seegers, J. F. (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol*, 20 (12): 508-15.
- Segawa, S., Nakakita, Y., Takata, Y., Wakita, Y., Kaneko, T., Kaneda, H., Watari, J. & Yasui, H. (2008). Effect of oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. *Int J Food Microbiol*, 121 (1): 1-10.
- Sharipova, M. R. (2002). Late stages of protein secretion in bacilli. *Biochemistry (Mosc)*, 67 (11): 1207-16.
- Simonen, M. & Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiology reviews*, 57 (1): 109-37.
- Skulj, M., Okrslar, V., Jalen, S., Jevsevar, S., Slanc, P., Strukelj, B. & Menart, V. (2008). Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact*, 7: 6.
- Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Kleinpeter, P., Prozzi, D., Kieny, M. P., Delcour, J., Mercenier, A. & Hols, P. (1998). Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett*, 169 (1): 29-36.
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G. & Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 207 (2): 365-77.
- Sorvig, E., Gronqvist, S., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*, 229 (1): 119-26.
- Sorvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2005). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*, 151 (Pt 7): 2439-49.
- Spreng, S., Dietrich, G. & Weidinger, G. (2006). Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods*, 38 (2): 133-43.
- Steidler, L., Neiryneck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J. P. & Remaut, E. (2003). Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol*, 21 (7): 785-9.
- Stephenson, K., Jensen, C. L., Jorgensen, S. T., Lakey, J. H. & Harwood, C. R. (2000). The influence of secretory-protein charge on late stages of secretion from the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochem J*, 350 Pt 1: 31-9.
- Straume, D., Axelsson, L., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2006). Improved expression and purification of the correctly folded response regulator PInC from lactobacilli. *J Microbiol Methods*, 67 (2): 193-201.
- Sørvig, E., Gronqvist, S., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett*, 229 (1): 119-26.

- Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2005a). High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology*, 151 (Pt 7): 2439-49.
- Sørvig, E., Skaugen, M., Naterstad, K., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2005b). Plasmid p256 from *Lactobacillus plantarum* represents a new type of replicon in lactic acid bacteria, and contains a toxin-antitoxin-like plasmid maintenance system. *Microbiology*, 151 (Pt 2): 421-31.
- Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Ng, J., Munro, K. & Alatossava, T. (1999). Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol*, 65 (9): 4264-7.
- Tao, L., Pavlova, S. I., Ji, X., Jin, L. & Spear, G. (2011). A novel plasmid for delivering genes into mammalian cells with noninvasive food and commensal lactic acid bacteria. *Plasmid*, 65 (1): 8-14.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijl, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64 (3): 515-47.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J. Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., et al. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68 (2): 207-33.
- Ueno, N., Fujiya, M., Segawa, S., Nata, T., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Kobayashi, N., Ito, K. & Kohgo, Y. (2011). Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*, 17 (11): 2235-50.
- van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R. J., de Vos, W. M. & Simons, G. (1990). Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene*, 95 (1): 155-60.
- van Dijl, J. M., de Jong, A., Vehmaanpera, J., Venema, G. & Bron, S. (1992). Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *Embo journal*, 11 (8): 2819-28.
- van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D., Tjalsma, H., Dubois, J. Y., Bron, S., van Dijl, J. M. & Anne, J. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1694 (1-3): 279-97.
- van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R. & Driessen, A. J. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 25 (4): 437-54.
- Vesa, T., Pochart, P. & Marteau, P. (2000). Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 14 (6): 823-8.
- Vitikainen, M., Hyyrylainen, H. L., Kivimaki, A., Kontinen, V. P. & Sarvas, M. (2005). Secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* can be improved by engineering cell components affecting post-translocational protein folding and degradation. *J Appl Microbiol*, 99 (2): 363-75.
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*, 32 (2): 287-306.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol*, 115 (3): 195-201.
- West, A. H. & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci*, 26 (6): 369-76.

- Wu, S. C., Ye, R., Wu, X. C., Ng, S. C. & Wong, S. L. (1998). Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *Journal of Bacteriology*, 180 (11): 2830-5.
- Zalucki, Y. M., Beacham, I. R. & Jennings, M. P. (2011). Coupling between codon usage, translation and protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 6 (6): 660-7.
- Zanen, G., Houben, E. N., Meima, R., Tjalsma, H., Jongbloed, J. D., Westers, H., Oudega, B., Luirink, J., van Dijl, J. M. & Quax, W. J. (2005). Signal peptide hydrophobicity is critical for early stages in protein export by *Bacillus subtilis*. *FEBS J*, 272 (18): 4617-30.
- Zanen, G., Antelmann, H., Meima, R., Jongbloed, J. D., Kolkman, M., Hecker, M., van Dijl, J. M. & Quax, W. J. (2006). Proteomic dissection of potential signal recognition particle dependence in protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Proteomics*, 6 (12): 3636-48.
- Zuber, B., Haenni, M., Ribeiro, T., Minnig, K., Lopes, F., Moreillon, P. & Dubochet, J. (2006). Granular layer in the periplasmic space of gram-positive bacteria and fine structures of *Enterococcus gallinarum* and *Streptococcus gordonii* septa revealed by cryo-electron microscopy of vitreous sections. *J Bacteriol*, 188 (18): 6652-60.

<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>